

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

KEREN JEMIMA ALMEIDA MACIEL

**ACLIMATIZAÇÃO DE AMOREIRA PRETA-PRETA CV. TUPY COM
RIZOGENESE *IN VITRO* E *EX VITRO* SOB INOCULAÇÃO DE
MICRORGANISMOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO**

PONTA GROSSA – PR

2020

KEREN JEMIMA ALMEIDA MACIEL

**ACCLIMATIZAÇÃO DE AMOREIRA PRETA-PRETA CV. TUPY COM
RIZOGENESE *IN VITRO* E *EX VITRO* SOB INOCULAÇÃO DE
MICRORGANISMOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Área de Concentração: Agricultura. Linha de Pesquisa: Fisiologia, Melhoramento e Manejo de Culturas. Como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agricultura.

Orientador: Prof. Dr. Renato Vasconcelos Botelho
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Ayub

PONTA GROSSA – PR

2020

M152 Maciel, Keren Jemima Almeida
Aclimatização de amoreira preta-preta cv. Tupy com rizogênese *in vitro* e *ex vitro* sob inoculação de microrganismos promotores do crescimento / Keren Jemima Almeida Maciel. Ponta Grossa, 2020.
57 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Renato Vasconcelos Botelho.
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub.

1. Rubus spp.. 2. Rhizoglosum clarum. 3. Azospirillum brasilense. 4. Bactéria diazotrófica. 5. Micorriza arbuscular. I. Botelho, Renato Vasconcelos. II. Ayub, Ricardo Antonio. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Agricultura. IV.T.

CDD: 634



Universidade
Estadual do
Paraná - UEPG

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: Aclimatização de amoreira preta cv. Tupy com rizogenese in vitro e ex vitro
sob inoculação de microrganismos promotores do crescimento.

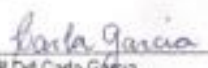
Nome: Keren Jemima Almeida Maciel

Orientador: Renato Vasconcelos Botelho

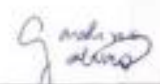
Aprovado pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Renato Vasconcelos Botelho



Prof. Dr. Carla Garcia



Prof. Dr. Carolina Weigert Galvão

Data da Realização: 05 de março de 2020.

AGRADECIMENTOS

Segundo um provérbio chinês, a persistência realiza o impossível e foi por ela que consegui finalizar mais esta etapa, e como disse certa vez Carlos Drummond de Andrade: “nunca me esquecerei desse acontecimento na vida de minhas retinas tão fatigadas”.

Primeiramente, agradeço meus pais, Claudemiro e Marilei, por todo o apoio emocional e incentivo. Sei que nenhuma palavra que for escrita aqui refletirá o tamanho da minha gratidão por tudo que recebi de vocês durante a maior parte da minha vida, mas obrigada mesmo pelo amor incondicional e ajuda para fazer o meu eu nesses vinte e quatro anos vividos.

Aos meus irmãos Letícia, Wilian, Natanael e Thalita e minha cunhada Cristiane pelo apoio, frases de incentivo, ajuda com problemas que não consegui resolver e por estarem sempre presentes. Aos meus avós Olinda e Mariano pelo apoio e preocupação. Ao meu sobrinho Wesley, que é uma das minhas maiores fontes de alegria. Amo todos vocês.

Aos meus amigos Jessé e Luane, que merecem mais que agradecimentos pelas trocas de conhecimento, carinho, preocupação e experiências destas nossas longas vidas e anos de amizade. Espero que continuemos com o “trio parada dura”, mesmo com as distâncias impostas pela vida.

Aos meus amigos Leandro, Marisa, Joaquim, Joceli, Marcelo, Joelma e Aran por me acolherem em Ponta Grossa como sendo da família. Agradeço também aos amigos Ingrid, Victória, Iago, os Luíses, Alexandre, Robson e Danilo pelas boas conversas e gestos de atenção.

Aos amigos que encontrei no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Fruticultura, em especial à Marília, Sr. Wilson, Isabela, Letícia Manuela, Daurimar, Silas, Daniele, Helyemari, Lucas, Michele e Warlyton, que veio do Tocantins me fazer sorrir. Agradeço ainda mais a Kamila Los, Camila Audrey e Lygia Werlang, pela grande amizade, apoio nos trabalhos, incentivos e maravilhosos momentos de descontração.

A professora Carolina Galvão, que juntamente com a Carla Garcia, aceitaram compor minha banca e me ajudaram com algumas decisões para meus trabalhos. Ao Sandoval, professora Cristina Ayub e professor David Jaccoud-Filho pela disponibilidade em auxiliar nas análises e ceder equipamento.

A todos os professores que transmitiram seus conhecimentos e experiências de vida durante o mestrado, em especial ao professor Ricardo Ayub pela coorientação, amizade, puxões de orelha e convívio nesses sete anos. Ao professor Renato Botelho pela orientação e paciência durante a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e a Universidade Estadual de Ponta Grossa pelo espaço concedido.

A todos que, mesmo não citados aqui, de certa forma me impulsionaram a mais esta conquista.

A cada um de vocês, o meu muitíssimo obrigada e emprestando a voz de Dionne Warwick: “Keep smiling, keep shining. Knowing you can always count on me, for sure. That’s what friends are for”.

Semeia um pensamento,
Colhe um ato.
Semeia um ato,
Colhe um hábito.
Semeia um hábito,
Colhe um caráter.
Semeia um caráter,
Colhe um destino

Marion Laurence

RESUMO

Visando mudas de alta qualidade, a micropropagação vem se estabelecendo como uma técnica importante para a produção de mudas. Contudo, por ser onerosa, busca-se protocolos que reduzam custos, sem haver perdas na qualidade. Como exemplo tem-se a prática de realizar o enraizamento e aclimatização concomitante. Por conseguinte, buscou-se neste trabalho avaliar o uso da inoculação da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* e da micorriza arbuscular *Rhizoglyphus clarum* na propagação de amoreira-preta. Para isto, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente aleatorizado, em esquema fatorial 2 x 4. O primeiro fator corresponde as rizogêneses (*in vitro* e *ex vitro*) e o segundo, as formas de inoculação (controle, *A. brasilense* (AZO), *R. clarum* (FMA) e coinoculação desses). Inicialmente, na aclimatização realizada em laboratório, utilizou-se três repetições e cinco plantas por parcela, onde parte dessas foram realocadas para aclimatização em casa de vegetação, compondo uma amostra de três repetições com três plantas. Após 50 dias da aclimatização, a FMA não apresentou diferenças entre as rizogêneses nos parâmetros morfológicos e em *ex vitro* foi superior estatisticamente aos demais tratamentos na massa fresca total, número total de folhas e folhas vivas, comprimento da raiz e da parte aérea, com as demais inoculações não diferindo do controle; em *in vitro*, não houve diferença entre as inoculações. Para a sobrevivência, as inoculações tiveram médias de 90, 66,67, 70 e 40% para FMA, AZO, FMA+AZO e controle, respectivamente. Todas as inoculações beneficiaram a síntese de compostos fenólicos. Quanto a atividade enzimática da peroxidase e fenilalanina amônioliase, a FMA gerou incrementos em relação aos demais tratamentos, não apresentando diferenças entre as rizogêneses. Após 180 dias em casa de vegetação, todas as inoculações foram benéficas para a melhoria no aparato fotossintético, conteúdo de nutrientes e ganhos na biomassa, sendo também confirmada a colonização com FMA. Deste modo, conclui-se que a inoculação isolada de *R. clarum* pode substituir a rizogênese *in vitro* pela *ex vitro*. Já em casa de vegetação, quando as plantas se encontravam em amplo crescimento e maior exigência de nutrientes e metabólitos, todas as inoculações foram benéficas.

Palavras-chave: *Rubus* spp., *Azospirillum brasilense*, *Rhizoglyphus clarum*, Bactéria diazotrófica, Micorriza arbuscular.

ABSTRACT

Aiming at high quality seedlings, micropropagation has established itself as an important technique for seedling production. However, because it is costly, protocols are sought to reduce costs, without loss of quality. As an example, there is the practice of performing rooting and concomitant acclimatization. Therefore, it was sought in this work to evaluate the use of the inoculation of the diazotrophic bacteria *Azospirillum brasilense* and of the arbuscular mycorrhiza *Rhizoglyphus clarum* in the propagation of blackberry. For this, the experimental design adopted was entirely randomized, in a 2 x 4 factorial scheme. The first factor corresponds to rhizogenesis (in vitro and ex vitro) and the second, the forms of inoculation (control, *A. brasilense* (AZO), *R. clarum* (FMA) and coinoculation of these). Initially, in the acclimatization performed in the laboratory, three replicates and five plants per plot were used, where part of these were relocated for acclimatization in a greenhouse, composing a sample of three repetitions with three plants. After 50 days of acclimatization, the FMA showed no differences between the rhizogenesis in the morphological parameters and in ex vitro it was statistically superior to the other treatments in the total fresh mass, total number of leaves and live leaves, length of the root and of the aerial part, with the other inoculations do not differ from the control; in vitro, there was no difference between inoculations. For survival, inoculations averaged 90, 66.67, 70 and 40% for FMA, AZO, FMA + AZO and control, respectively. All inoculations benefited the synthesis of phenolic compounds. As for the enzymatic activity of peroxidase and phenylalanine ammonia, the FMA generated increases in relation to the other treatments, with no differences between the rhizogeneses. After 180 days in the greenhouse, all inoculations were beneficial for improving the photosynthetic apparatus, nutrient content and gains in biomass, and colonization with FMA was also confirmed. Thus, it is concluded that the isolated inoculation of *R. clarum* can replace rhizogenesis in vitro by ex vitro. Already in the greenhouse, when the plants were in ample growth and greater demand for nutrients and metabolites, all inoculations were beneficial.

Key words: *Rubus* spp., *Azospirillum brasilense*, *Rhizoglyphus clarum*, Diazotrophic bacteria, Arbuscular mycorrhiza.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Efeito da inoculação isolada ou combinada de *Azospirillum brasilense* (AZO) e *Rhizoglossum clarum* (FMA) no comprimento da raiz (A), comprimento da parte aérea (B), número de folhas (C), número de folhas vivas (D) e massa fresca (E) de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Tupy, aclimatizadas após rizogênese in vitro e ex vitro. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, não possuem diferença entre as inoculações dentro de cada rizogênese, e as seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre as rizogêneses dentro de cada inoculação pelo teste de Scott Knott (5%). 34
- Figura 2 – Plantas de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Tupy com 50 dias de aclimatização após rizogênese in vitro e ex vitro e sob inoculação isolada ou combinada de *Azospirillum brasilense* (AZO) e *Rhizoglossum clarum* (FMA). Plantas com rizogênese ex vitro sem inoculação (A), inoculadas com AZO (B), FMA (C) e coinoculação (D). Plantas com rizogênese ex vitro sem inoculação (E), inoculadas com AZO (F), FMA (G) e coinoculação (H). 35
- Figura 3 – Raízes de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Tupy sem inoculação (A), inoculadas com *Rhizoglossum clarum* (B-G) e co-inoculadas com *Rhizoglossum clarum* e *Azospirillum brasilense* (H). Estruturas: vesícula (V), arbúsculo (A) e hifas (H). 41
- Figura 4 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das raízes de amoreira-preta (*Rubus* sp.) não inoculadas (A) e inoculadas com *Rhizoglossum clarum* (B-F). Hifas da FMA indicadas pelas setas. 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de sobrevivência de amoreira-preta (<i>Rubus</i> sp.) cv. Tupy, 50 dias após aclimatização com rizogênese <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> sob inoculação simples ou combinada de <i>Azospirillum brasilense</i> (AZO) e <i>Rhizoglosum clarum</i> (FMA).....	35
Tabela 2 – Conteúdo de polifenóis (mgGAE g ⁻¹) de folhas de amoreira-preta (<i>Rubus</i> sp.) cv. Tupy, 50 dias após aclimatização com rizogênese <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> sob inoculação isolada ou combinada de <i>Azospirillum brasilense</i> (AZO) e <i>Rhizoglosum clarum</i> (FMA).	36
Tabela 3 - Atividade da peroxidase (POD - UN gMF ⁻¹ min ⁻¹) e fenilalanina amônia-ase (PAL - UN gMF ⁻¹ h ⁻¹) de amoreira-preta (<i>Rubus</i> sp.) cv. Tupy, 50 dias após aclimatização com rizogênese <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> sob inoculação simples ou combinada de <i>Azospirillum brasilense</i> (AZO) e <i>Rhizoglosum clarum</i> (FMA).	37
Tabela 4 - Assimilação líquida de CO ₂ - A (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) e concentração interna de CO ₂ (Ci) (μmol m ⁻² s ⁻¹) em folhas de amoreira-preta (<i>Rubus</i> sp.) cv. Tupy, 150 dias após aclimatização com rizogênese <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> e aclimatadas em casa de vegetação sob inoculação isolada ou combinada de <i>Azospirillum brasilense</i> (AZO) e <i>Rhizoglosum clarum</i> (FMA) e estabelecidas em casa de vegetação.....	38
Tabela 5 - Condutância estomática – Gs (mol m ⁻² s ⁻¹), eficiência de carboxilação - ECi [(μmol CO ₂ .m ⁻² s ⁻¹). (μmol CO ₂ mol ⁻¹) ⁻¹] e eficiência instantânea do uso da água – EUA [(μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹). (mmol de H ₂ O m ⁻² s ⁻¹) ⁻¹] em folhas de amoreira-preta (<i>Rubus</i> sp.) cv. Tupy, 150 dias após aclimatização com rizogênese <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> e aclimatadas em casa de vegetação sob inoculação isolada ou combinada de <i>Azospirillum brasilense</i> (AZO) e <i>Rhizoglosum clarum</i> (FMA) e estabelecidas em casa de vegetação.....	39
Tabela 6 - Conteúdo de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K) e enxofre (S) de folhas de amoreira-preta (<i>Rubus</i> sp.) cv. Tupy, 180 dias após aclimatização com rizogênese <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> e aclimatadas em casa de vegetação sob inoculação isolada ou combinada de <i>Azospirillum brasilense</i> (AZO) e <i>Rhizoglosum clarum</i> (FMA) e estabelecidas em casa de vegetação.	39
Tabela 7 - Massa fresca (MF) e seca (MS) foliar e radicular de (<i>Rubus</i> sp.) cv. Tupy, 180 dias após aclimatização com rizogênese <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> e aclimatadas em casa de vegetação sob inoculação isolada ou combinada de <i>Azospirillum brasilense</i> (AZO) e <i>Rhizoglosum clarum</i> (FMA) e estabelecidas em casa de vegetação.....	40
Tabela 8 - Porcentagem de colonização de raízes de (<i>Rubus</i> sp.) cv. Tupy, 180 dias após aclimatização com rizogênese <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> e aclimatadas em casa de vegetação sob inoculação isolada ou combinada de <i>Azospirillum brasilense</i> (AZO) e <i>Rhizoglosum clarum</i> (FMA) e estabelecidas em casa de vegetação.....	41

LISTA DE ABREVISTURAS

AIAO - AIA oxidase
A – assimilação líquida de CO₂
AZO – *Azospirillum brasilense*
Ci - concentração de carbono intercelular
ECi – eficiência de carboxilação
EUA – eficiência fotossintética do uso da água
FBN – Fixação Biológica do Nitrogênio
FMAs- fungos micorrizicos arbusculares
Gs - condutância estomática
K - potássio
N – Nitrogênio
P – fosforo
PAL - fenilalanina amônia liase
PPO – polifenoloxidase AIA - ácido indol-3-acético
POD - peroxidase
UEPG – Universidade Estadual de Ponta Grossa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 HIPOTETES.....	16
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
4.1 A AMOREIRA-PRETA	17
4.2 MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS.....	18
4.3 MICRORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO	20
4.3.1 <i>Azospirillum brasilense</i>	20
4.3.2 Fungos micorrizicos arbusculares	23
4.3.3 Interação de FMAs e bactérias diazotróficas	26
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
5.1 LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	28
5.2 MATERIAL VEGETAL E MEIO DE CULTURA	28
5.3 ACLIMATIZAÇÃO EM LABORATÓRIO E INOCULAÇÃO	29
5.4 PARÂMETROS MORFOLÓGICOS APÓS A ACLIMATIZAÇÃO	29
5.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	30
5.6 ACLIMATAÇÃO EM CASA DE VEGETAÇÃO	31
5.7 ÍNDICES DE CLOROFILA E EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA E DO USO DA ÁGUA... ..	31
5.8 ANÁLISE NUTRICIONAL E MORFOLÓGICAS.....	32
5.9 COLONIZAÇÃO DO SISTEMA RADICULAR - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	32
5.10 QUANTIFICAÇÃO DA PORCENTAGEM DE COLONIZAÇÃO MICORRIZICA ...	33
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
6 RESULTADOS.....	34

7 DISCUSSÃO.....	43
8 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

Devido as suas propriedades nutraceuticas, a demanda por frutos de amoreira-preta (*Rubus* spp.) vem crescendo rapidamente, e por ser uma frutífera que se sobressai pela rusticidade, custo módico de implantação, rápido retorno financeiro, possibilidade de produção orgânica e pouca oferta no mercado nacional, possui alto valor de mercado, estimulando os produtores (TULLIO; AYUB, 2013; SILVA *et al.*, 2016).

Assim sendo, a produção brasileira vem apresentando incrementos, pois em 2005 o Brasil produzia cerca de 780 t de amora-preta em 250 ha (STRIK *et al.*, 2007), já em 2014, Antunes *et al.* (2014), verificaram que o Brasil tinha aumentado a área para 527,8 ha, com destaque para o estado do Rio Grande do Sul com produção de 2.209,5 t em 239,2 ha de área plantada, sendo este o maior produtor do país.

A fase inicial para a produção de amora-preta é a sua propagação, sendo que para esta finalidade, usam-se rebentos, estacas caulinares e radiculares, geralmente advindas da poda. No entanto, estes materiais apresentam brotação e enraizamento heterogêneos com pequena produção e amplo espaço. Outro entrave importante, é a não garantia de uma boa qualidade fitossanitária, o que pode onerar a produção. Desta forma, outra técnica que tem se destacado é a micropropagação, que permite a obtenção de material homogêneo e livre de patógenos, com tempo e espaço reduzidos e alta produção (CARVALHO *et al.*, 2006; FRONZA; HAMMAN, 2015; MONTES-CRUZ *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010; VILLA *et al.*, 2008).

Conforme Ahloowalia *et al.* (2004), a micropropagação é realizada em cinco fases, iniciando-se pela esterilização dos explantes e estabelecimento *in vitro*, multiplicação destes, formação de brotações e enraizamento e por fim, a aclimatização das plantas obtidas. Esta última etapa é a mais crítica, pois a planta passa da condição heterotrófica para a autotrófica, apresentando também um sistema radicular de funcionalidade limitada, tornando-se muito suscetível a estresses bióticos e abióticos (COSTA *et al.*, 2009; DUTRA; WENDILING, 2010; HARTMANN *et al.*, 2011; PÁDUA *et al.*, 2014; SHIN *et al.*, 2013).

Apesar dos benefícios supracitados, a micropropagação é uma técnica cara, com o enraizamento *in vitro* correspondendo de 35% a 75% do custo total (WOZNY; MILER, 2016). Logo, procura-se estudar técnicas que eliminem este estágio, realizando o enraizamento e aclimatização simultaneamente, assim, além do custo, o tempo de produção também é reduzido (LEBEDEV *et al.*, 2019). Contudo, esta prática requer o desenvolvimento e estudos de protocolos adequados. Além disto, por ser um método asséptico, há a eliminação de

microrganismos benéficos que poderiam maximizar o desempenho, rendimento e adaptação das plantas, principalmente em condições de estresse, e melhorar o desenvolvimento a campo (ANZANELLO; SOUZA; CASAMALI, 2011; COSTA; NEPOMUCENO; SANTANA, 2010).

Deste modo, estudos vêm buscando avaliar a rizogênese *ex vitro* e *in vitro* sob inoculação com microrganismos promotores do crescimento vegetal, tais como as bactérias diazotróficas e fungos micorrizicos arbusculares (FMA), em diversas culturas. Há relatos de estudos com a jojoba (LARRABURU; BUSUSCOVICH; LLORENTE, 2016), gengibre vermelho (OVANDO-MEDINA *et al.*, 2007), porta-enxertos de ameixeira e macieira (VETTORI *et al.*, 2010), mangabeira (CABRAL, 2016), citros (WU; ZOU; WANG, 2011), amoreira (MONCADA *et al.*, 2015; ROVEDA, 2007), mandioca (LOPES *et al.*, 2019) e bananeira (CARINA *et al.*, 2016).

Os diversos trabalhos mostram que a inoculação destes microrganismos melhora as características morfológicas, absorção de nutrientes, ganhos na biomassa, aparato fotossintético, resistência a patógenos, síntese de enzimas e compostos fenólicos antioxidantes, sobrevivência, entre outros. Embora há na literatura estudos avaliando a rizogênese *in vitro* e posterior aclimatização de amoreira-preta com a inoculação ou não de microrganismos benéficos, não foram encontrados na literatura pesquisas de rizogênese *ex vitro* sob a inoculação destes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a inoculação de microorganismos benéficos na aclimatização de plantas de amoreira-preta cv. Tupy com enraizamento *in vitro* e *ex vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a capacidade dos microrganismos de induzir o enraizamento, melhorar a sobrevivência e outras características morfológicas e bioquímicas de amoreira-preta cv. Tupy durante a aclimatização com rizogênese *in vitro* e *ex vitro* e crescimento em casa de vegetação.

Verificar a eficiência dos inoculantes em promover a formação de mudas de amoreira-preta advindas da multiplicação e enraizamento *in vitro*, para maximizar a produção e diminuir custos.

Analisar a interação entre *Azospirillum brasilense*, *Rhizoglosum clarum* e plantas de amoreira-preta.

3 HIPOTESES

As inoculações com *Azospirillum brasilense* e *Rhizoglosum clarum* promoverão um melhor crescimento e desenvolvimento das plantas de amoreira-preta.

As inoculações com *Azospirillum brasilense* e *Rhizoglosum clarum* permitirão substituir a etapa de rizogênese *in vitro* pela rizogênese *ex vitro*.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 A AMOREIRA-PRETA

A amoreira-preta pertence à família Rosaceae e ao gênero *Rubus* spp. e contém cerca de 740 espécies, divididas em até 15 subgêneros. No que concerne a produção comercial, grande parte das espécies e cultivares são originárias dos Estados Unidos, Uruguai e do Brasil, a exemplo da cultivar brasileira Tupy, que é a mais cultivada nacionalmente (ANTUNES; RASEIRA, 2004; ANTUNES *et al.*, 2014; RASEIRA *et al.*, 2004).

É uma planta frutífera de clima temperado e classificada no grupo das pequenas frutas, juntamente com morango, groselha, framboesa e mirtilo. Reconhecidamente, possui diversas propriedades nutracêuticas, como elevado teor de minerais, vitamina B, A, cálcio, além do ácido elágico, que beneficia o ser humano, por suas propriedades anticancerígenas e possível ação contra a hipertensão. Somado a isso, é também uma cultura que se sobressai pela rusticidade, custo módico de implantação, rápido retorno financeiro, possibilidade de produção orgânica, pouca oferta no mercado nacional e possui alto valor agregado (ANTUNES; RASEIRA, 2004; ANTUNES *et al.*, 2014; JORDÃO, *et al.* 2017; TULLIO; AYUB, 2013; SILVA *et al.*, 2016).

Assim, devido aos inúmeros aspectos citados, a produção brasileira vem tendo um incremento, pois em 2005 o Brasil produzia cerca de 780 t de amora-preta em 250 ha (STRIK *et al.* 2007), já em 2014, Antunes *et al.* (2014), verificaram que o Brasil tinha aumentado a área para 527,8 ha, com destaque para o estado do Rio Grande do Sul com produção de 2.209,5 t em 239,2 ha de área plantada, sendo este o maior produtor do país.

A amoreira-preta é uma planta de hábito ereto ou rasteiro e arbustiva, apresentando hastes com ou sem espinhos. Produz frutos agregados, com coloração negra e sabor que varia de ácido a doce-ácido. O fruto verdadeiro é uma mini drupa, que possui uma semente pequena (RASEIRA; FRANZON, 2012).

As cultivares de amoreira-preta utilizadas no Brasil advém de cultivares americanas, como 'Brazos', 'Cherokee' e 'Comanche', e de sementes provindas de hibridações realizadas nos Estados Unidos da América. Posteriormente, com o Programa de Melhoramento da Embrapa Clima Temperado, novas cultivares foram lançadas, como a 'Ébano' em 1981, 'Negrita' em 1983, 'Tupy' e 'Guarani' em 1988; 'Caingangue' em 1992, 'Xavante' em 2004 e 'Xingu' em 2015 (RASEIRA *et al.*, 2014; RASEIRA; FRANZON, 2012).

A cultivar Tupy é uma das mais cultivadas no país e tem por características frutos com peso de 8 a 10g, a acidez e o açúcar são equilibrados e o teor de sólidos solúveis é de 8 a 9°

Brix. Esta cultivar foi obtida através do cruzamento entre a cultivares Uruguai e Comanche, e como a identidade da primeira é desconhecida (RASEIRA *et al.*, 2004; RASEIRA; FRANZON, 2012), torna-se impossível afirmar exatamente a espécie da cultivar Tupy.

A principal forma de propagação da amoreira-preta é vegetativa, uma vez que suas sementes apresentam baixo índice de germinação e curto período de viabilidade. Esta propagação assexuada pode ocorrer através de rebentos, estacas caulinares (herbáceas e lenhosas) e radiculares. Todavia, estes materiais quando usados na produção de mudas, geralmente apresentam brotação e enraizamento heterogêneos e quantidades muito aquém das necessárias, não tendo também garantia de uma boa qualidade fitossanitária, o que pode trazer mais custos para a produção. Dessa forma, outra técnica que tem se destacado é a micropropagação (FRONZA; HAMMAN, 2015).

4.2 MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS

A propagação vegetativa é uma técnica muito utilizada para a produção de mudas de inúmeras espécies de interesse comercial, através da multiplicação assexuada de partes das plantas, objetivando a geração de indivíduos com material genético idêntico à planta matriz. Isto está intrinsicamente associado com o crescimento vegetal, que é concentrado nos meristemas apicais, localizados nos ápices do caule e raiz e consiste em aumentar e alongar o número de células, e com o desenvolvimento, o qual se refere as mudanças nos tipos de crescimento (HARTMANN *et al.*, 2011; TAIZ *et al.*, 2017).

Essa multiplicação também ocorre graças a duas propriedades das plantas. A primeira diz respeito à aptidão das células vegetais de formarem um novo indivíduo completo, sendo denominada de totipotência celular; A segunda seria a desdiferenciação, que é a capacidade das células se desdiferenciarem e retornarem à condição meristemática, desenvolvendo um novo ponto de crescimento (HARTMANN *et al.*, 2011; TOOGOOD, 2007).

No que concerne a micropropagação, esta técnica garante plantas com qualidade superior de conformidade e sanidade, com a possibilidade de alta produção em um período reduzido de tempo e menor espaço (CARVALHO *et al.*, 2006; MONTES-CRUZ *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010; VILLA *et al.*, 2008).

O processo de micropropagação, de acordo com Ahloowalia *et al.* (2004), divide-se em cinco fases, começando pela esterilização dos explantes e estabelecimento *in vitro*, multiplicação destes, formação de brotações e enraizamento e por fim, a aclimatização das plantas obtidas. Todos estes processos demandam o máximo cuidado, atentando-se para os

seguintes aspectos: 1) escolha assertiva da planta matriz, a qual deve apresentar características como bom vigor e qualidade fitossanitária; 2) esterilização adequada, que deve ser eficiente na eliminação de possíveis patógenos; 3) escolha ideal de meio de cultura, o qual deve maximizar as brotações e enraizamento e; 4) adequada aclimatização, que permite a adaptação *ex vitro* das plantas, buscando diminuir o máximo possível do estresse. Segundo Costa *et al.* (2009), o sucesso da micropropagação é dependente da adaptação da planta *ex vitro*, com baixo custo e altos índices de sobrevivência e crescimento.

Das fases citadas anteriormente, a aclimatização é a mais crítica, pois é nesta etapa que a planta passa da condição heterotrófica para a autotrófica (HARTMANN *et al.*, 2011). Em condições *in vitro*, há a disponibilidade de alta umidade relativa e baixa intensidade de luz, logo suas trocas gasosas são reduzidas, e tendo como consequência baixas taxas de transpiração e eficiência fotossintética. As plantas também sofrem alterações nas folhas, como baixa produção de cera e pouca funcionalidade dos estômatos, sendo assim, muito suscetíveis a perda de água por transpiração (COSTA *et al.*, 2009; SHIN *et al.*, 2013).

Quando alocadas em ambiente *ex vitro*, as plantas se expõem a diversos fatores bióticos e abióticos, podendo sofrer estresses, como a baixa qualidade do substrato e ataque de patógenos, gerando alta mortalidade das plantas. É importante salientar também que o sistema radicular das plantas produzidas *in vitro* tem sua funcionalidade limitada, tendo poucos pelos radiculares, mesmo para a amoreira-preta, a qual tem facilidade para enraizamento *in vitro* (DUTRA; WENDILING, 2010; PÁDUA *et al.*, 2014).

Associado a todas estas questões, outro ponto de grande importância é a eliminação de microrganismos benéficos devido ao fato da micropropagação ser um processo asséptico, como as bactérias e micorrizas arbusculares, os quais possuem alto potencial para maximizar o desempenho e rendimento das plantas em condições de estresse, como a aclimatização (ANZANELLO; SOUZA; CASAMALI, 2011; COSTA; NEPOMUCENO; SANTANA, 2010).

Desta forma, , inúmeros trabalhos vem buscando estudar o uso de microrganismos promotores do crescimento vegetal como ferramenta de auxílio, pois estes aumentam a tolerância a estresses bióticos e abióticos, potencializam o crescimento e desenvolvimento, reduzem o tempo de aclimatização, aumentam a sobrevivência das mudas, geram um material mais homogêneo, permitem o estabelecimento de uma comunidade rizosférica benéfica e proporcionam melhores resultados a campo (ANZANELLO; SOUZA; CASAMALI, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

4.3 MICRORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO

O desenvolvimento das plantas é influenciado por fatores bióticos e abióticos, assim na agricultura, é comum o uso de tecnologias que beneficiem as propriedades e características do solo e consequentemente melhorem a produtividade.

O uso de microrganismos na agricultura requer pesquisas sobre a compatibilidade destes com o hospedeiro, uma vez que a morfologia e a síntese de certos metabólitos secundários podem gerar especificidade pelos organismos. Entretanto, essa situação não diminui a possibilidade de existir microrganismos compatíveis com determinadas plantas, já que a rizosfera é colonizada por um gama de microrganismos e mais de dois terços da população microbiana cultivável apresenta capacidade de influenciar no crescimento vegetal (PAGANO, 2016; SIQUEIRA *et al.*, 2010).

Os microrganismos com atuação conhecida na promoção do crescimento vegetal são as bactérias e fungos promotores do crescimento. Esses microrganismos apresentam benefícios diretos como mineralização dos compostos orgânicos, disponibilização de nutrientes às plantas, como nitrogênio, fósforo e magnésio, transformações inorgânicas, produção de fitormônios, solubilização de fosfato, modulação dos níveis de etileno no solo, secreção de sideróforos. Há também benefícios indiretos, como biocontrole, através da síntese de antibióticos, indução de resistência, entre outros (AGUADO-SANTACRUZ *et al.*, 2012; CARDOSO; ANDREOTE, 2016; MOREIRA; ARAÚJO, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

4.3.1 *Azospirillum brasilense*

As bactérias do gênero *Azospirillum* spp. são conhecidas como bactérias promotoras do crescimento vegetal, denominadas assim por produzirem fitormônios, sideróforos, metabólitos secundários e enzimas antioxidantes, solubilizarem fosfato, fixarem nitrogênio, participarem da modulação da atividade patogênica e aumentarem a resistência a possíveis estresses, como o hídrico, auxiliando assim, no crescimento e desenvolvimento vegetal. Esses microrganismos têm sido isolados na rizosfera de inúmeras plantas, seja em experimentos em casas de vegetação ou a campo, apresentando em ambas as situações, efeitos benéficos (ARORA, 2015; COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; GHOLAMI; SHAHSAVANI; NEZARAT, 2009; KASIM *et al.*, 2013).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são de vida livre e as espécies mais frequentemente citadas na literatura são *A. brasilense* (descoberta na década de 70 no Brasil)

A. lipoferum, *A. amazonense*, *A. halopraeferense* e *A. irakense*, com todas capazes de influenciar no crescimento, desenvolvimento e rendimento de diversas culturas agrícolas. Esses microrganismos não nodulam ao fazerem a associação com as plantas, e colonizam predominantemente a superfície das raízes, mas certas cepas são capazes de adentrar a planta (CARDOSO; ANDREOTE, 2016; DOBBELAERE *et al.*, 2001; OKON; LABANDERA-GONZALES, 1994).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são bactérias diazotróficas e auxiliam na fixação biológica de nitrogênio, processo este que se baseia na conversão de nitrogênio gasoso (N_2), presente em grande quantidade na atmosfera, em amônia (NH_3), forma de N assimilável pelas plantas. Este processo é considerado um dos mais importantes para a manutenção da vida na terra. Esta conversão pelas bactérias diazotróficas ocorre devido à presença da enzima nitrogenase, que rompe as ligações existentes entre os átomos de nitrogênio reduzindo-o a amônia (TAIZ *et al.*, 2017).

O desenvolvimento de *Azospirillum* spp. é influenciado por inúmeros fatores edafoclimáticos. Figueiredo *et al.* (2008), relatam que o ótimo crescimento destas bactérias está na faixa de temperatura de 32 a 37°C. O pH também afeta a sobrevivência das bactérias deste gênero, na Austrália foram encontrados isolados de *Azospirillum* spp. em solos com níveis de pH entre 5,0 e 6,5; na faixa de pH entre 4,5 e 5,0 foram poucos os isolados de *Azospirillum* spp., e abaixo de pH 4,5 não foram encontrados isolados destas bactérias (SKONIESKI, 2015).

Além da fixação de nitrogênio, um importante papel do *Azospirillum* spp. é a produção de fitormônios e outros metabolitos, o que está relacionado diretamente com o crescimento vegetal. Todas as plantas produzem naturalmente hormônios que regulam seu metabolismo, crescimento e desenvolvimento. Os fitormônios, como as auxinas, giberelinas e citocininas, são produzidos em vários locais na planta, como por exemplo folhas, raízes e gemas, movendo-se através de seu sistema até que eles se liguem a seus receptores e desencadeiem respostas nas células, influenciando por exemplo a divisão e expansão celular. A produção dessas substâncias pelas bactérias diazotróficas já é bem conhecida e é utilizada para se obter, entre outros parâmetros, o aumento da iniciação radicular, melhor qualidade e maior sobrevivência das plantas (ARORA, 2015; LLORENTE; ALASIA; LARRABURU, 2016; TAIZ *et al.*, 2016; TIEN; GASKINS; HUBBELL, 1979).

O ácido-indol-3-acético é produzido durante todos os estágios de crescimento do *Azospirillum* spp., incluindo a fase estacionária. Diversas auxinas, incluindo ácido-indol-butírico, já foram relatados em culturas desta mesma bactéria, sendo que a quantidade de auxinas produzidas irá depender da estirpe (MAHESHWARI, 2011; ARORA, 2015).

Pedrinho *et al.* (2010), avaliando a produção de AIA em diversas rizobactérias, obtiveram uma produção de 68 e 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido indol-acético no período de 48 a 72 horas de crescimento para a estirpes AbV5 e AbV6 de *A. brasilense*, respectivamente. Perrig *et al.* (2007) avaliando as linhagens Cd e Az39 de *A. brasilense*, observaram que estas incrementaram a produção de ácido indol-3-acético, ácido giberélico, ácido abscísico, zeatina e etileno, mostrando que esta bactéria pode promover diretamente o crescimento da planta. Mariosa *et al.* (2017), estudando o enraizamento de estacas de oliveira e produção de ácido indol acético (AIA) pelas bactérias *A. brasilense* (BR 11001t), *A. amazonense* (BR 11040t), *H. seropedicae* (BR 11175t) e *B. brasiliensis* (BR 11340t), aferiram que as estirpes apresentaram produção de AIA *in vitro* variando de 200 a 1.406 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Moutia *et al.* (2010), estudando as estirpes Azo 195, 249 e 274 de *A. brasilense*, observaram que aos 103 dias após o plantio de mudas de cultivares de cana-de-açúcar, a cv. M 1176/77 respondeu positivamente à inoculação, com acréscimo de 15% na altura da parte aérea e 75% na massa seca da raiz quando submetida ao estresse hídrico. Resultados positivos também foram encontrados por Venkatesan *et al.* (2010) com estacas de *Gymnema sylvestre*, as quais quando inoculadas com *A. brasilense*, apresentaram maior porcentagem de estacas enraizadas, número de raízes por estaca, comprimento de raiz, número de brotos por corte, comprimento de brotação, número de folhas e área foliar, reduzindo significativamente também, a duração da primeira aparição do broto.

Bartolini *et al.* (2017) também concluíram que a inoculação de *A. brasilense* Sp245 permitiu maior sobrevivência, potencializando o aparato radicular e o desenvolvimento vegetativo em estacas de videira. A associação de concentrações de ácido indolbutírico e *A. brasilense* BR 11001t no enraizamento de estacas herbáceas de mirtilheiro 'Powderblue' aumentou o número de raízes das estacas e o comprimento radicular (KOYAMA *et al.*, 2019).

Larraburu, Bususovich e Llorente (2016) concluíram que *A. brasilense* Az39 ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) melhora a aclimatização e rizogênese *in vitro* e *ex vitro* de jojoba, pois a inoculação com Az39 aumentou a porcentagem de enraizamento e proporcionou melhorias na morfologia, recomendando então, que após a multiplicação do material *in vitro*, as plantas sejam aclimatizadas para rizogênese *ex vitro* sob inoculação. A inoculação com *Azospirillum* sp. e *Azotobacter* sp. na aclimatização de gengibre vermelho gerou os maiores índices de sobrevivência, diâmetro de caule, massa seca de raiz e número de brotações das plantas (OVANDOMEDINA *et al.*, 2007). Em tamareira, a inoculação de *A. brasilense*, *B. megaterium* e *Klebsiella pneumoniae* na aclimatização, proporcionou acréscimos no crescimento e maior sobrevivência (FARRAG, ABEER, DARWESH, 2011).

Outros estudos também mostraram que a inoculação com *A. brasilense in vitro* permite a diminuição do uso de auxinas exógenas e melhora os parâmetros biométricos, como crescimento radicular e número de tricomas em diversas culturas, a exemplo do ipê-rosa (LARRABURU; LLORENTE, 2015), ipê-amarelo (LLORENTE *et al.*, 2016), híbridos do gênero *Prunus*: [Mr.S 2/5 (*Prunus cerasifera* × *P. Spinosa*), GF 677 (*Prunus persica* × *P. amigdalus*)] e o porta-enxerto de macieira ‘MM-106’ (Northen Spy × M1) (VETTORI *et al.*, 2010).

O uso de inoculantes bacterianos, objetivando melhorar o crescimento, desenvolvimento e adaptação vegetal, pode apresentar diversas repostas, pois conforme Di Salvo *et al.* (2018), a interação bactéria-planta é muito complexa e ainda não totalmente elucidada, sendo também influenciada pela especificidade dos indivíduos envolvidos e fatores bióticos a abióticos, como as condições edafoclimáticas, composição da flora microbiana e manejo do solo (GARCIA *et al.*, 2015; VACHERON *et al.*, 2013).

4.3.2 Fungos micorrizicos arbusculares

Dentre os diversos grupos de microrganismos presentes no solo, os fungos micorrízicos possuem relevante destaque devido aos inúmeros papéis que desempenham, como aumento da estabilidade e crescimento das plantas, melhoria da estruturação do solo e retenção de água pela síntese de glomalina e crescimento da rede micelial, maior resistência das plantas contra estresses bióticos, recuperação de áreas degradadas e controle de patógenos (SIQUEIRA *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2013).

As pesquisas mostram que as associações de micorrizas foram importantes na migração das plantas para a terra. As primeiras micorrizas arbusculares têm sua origem nas primeiras plantas terrestres semelhantes a briófitas, há pelo menos 400 milhões de anos. Esse fato sugere que a evolução das associações das micorrizas pode ter sido imprescindível na colonização do ambiente terrestre pelas plantas, uma vez que os solos disponíveis na época das primeiras colonizações eram pouco favoráveis (RAVEN *et al.*, 2014).

Dentre as micorrizas, os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são os mais comuns, não são altamente específicos e ocorrem em cerca de 80% de todas as plantas vasculares. Essa simbiose micorrízica é uma associação entre esses fungos e plantas vasculares terrestres, epífitas e aquáticas e a eficiência dos benefícios dessa associação depende de fatores associados ao hospedeiro, ao microrganismo e às condições edafoclimáticas. Por serem simbiotróficos obrigatórios, os FMAs só completam seu ciclo de vida na presença de um hospedeiro, sendo

este a fonte de carboidratos e outros fatores necessários ao desenvolvimento e esporulação (PAGANO, 2016; CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

As hifas do fungo entram em contato com as raízes das plantas, mais precisamente nos espaços intercelulares e penetram nas células corticais internas produzindo arbúsculos, que são ramificações dicotômicas. Os arbúsculos não penetram no protoplasto, criando um espaço apoplástico e aumentando a área de superfície e facilitando a transferência de metabólitos e nutrientes entre as células da planta e o fungo. A grande maioria ou todas as trocas entre o fungo e a planta ocorrem nos arbúsculos. Também podem ocorrer vesículas, que são intumescimentos terminais, entre as células da planta hospedeira e podem funcionar como compartimentos de reserva para o fungo (RAVEN *et al.*, 2014; SIQUEIRA *et al.*, 2010).

A troca de sinais entre os simbioses, principia-se antes do contato físico através da exsudação pelas raízes de compostos que estimulam a ramificação das hifas esporofíticas dos FMA, onde após entrarem em contato com a superfície das raízes penetram a epiderme por meio do apressório. Já dentro das raízes, o fungo pode crescer inter ou intracelularmente no tecido cortical, mas não há invasão no tecido vascular nem na região meristemática. As hifas intracelulares se diferenciam em arbúsculos, sendo envolvido por uma membrana plasmática diferenciada de origem vegetal nominada periarbuscular (SIQUEIRA *et al.*, 2010).

Fora o crescimento intracelular, há a formação de um micélio externo que se desenvolve no solo formando uma vasta rede micelial, a qual explora microambientes que não são alcançados pelas raízes não colonizadas por FMA. As hifas extracelulares são importantes para a formação de esporos e propágulos, estendendo-se por vários centímetros pelo solo circundante, absorvendo água e captando fosfatos e disponibilizando outros nutrientes essenciais, sendo estes transportados para o micélio intrarradicular e transferidos para a planta hospedeira (LEE *et al.*, 2013; PAGANO, 2016; SIQUEIRA *et al.*, 2010)

A formação da micorrizas arbusculares ocorre através de transformações no metabolismo das plantas hospedeiras e FMA, esse desenvolvimento é complexo e os mecanismos de regulação não são totalmente conhecidos. Entretanto, o conhecimento de que a concentração de fosfato (P) nas plantas tem um papel imprescindível na regulação da ligação entre os organismos simbioses, advém de longa data. Situações de baixa concentração de fosfato favorece grandemente a simbiose e condições contrárias à anterior acarreta uma restrição no seu desenvolvimento (COELHO *et al.*, 2012).

Segundo Siqueira *et al.* (2010), o desenvolvimento dos FMAs é dividido em três fases: (i) fase assimbiótica, que compreende os eventos relacionados à germinação dos esporos e crescimento do tudo germinativo. (ii) fase pré-simbiótica, que engloba os eventos associados à

ramificação das hifas esporofíticas em resposta a fatores de ramificação produzidos pela planta. (iii) fase simbiótica, que compreende os eventos associados à diferenciação do apressório, penetração, colonização intrarradicular e diferenciação e funcionamento do arbúsculo.

Os FMAs são de grande importância para o crescimento dos vegetais, principalmente em relação aos nutrientes de baixa mobilidade no solo, os quais chegam à raiz por difusão, que é um processo lento. Os principais elementos absorvidos são fósforo, zinco, mangânes e cobre. O nitrogênio só tem uma maior absorção por FMA quando se encontra na forma de amônio, sendo este menos móvel que o nitrato (CARDOSO; ANDREOTE, 2016; PAGANO, 2016)

As micorrizas arbusculares são muito importantes nos biomas brasileiros como Amazônia, Floresta Atlântica, Floresta de Araucária e Caatinga. Também estão presentes em dunas marítimas e áreas de mineração. A associação entre FMA com outros microrganismos do solo, tem recebido cada vez mais atenção devido à sua importância no desenvolvimento das plantas. Outros destaques dos FMA, são o seu uso em recuperação em áreas degradadas, produção de mudas, principalmente frutíferas e café, além de proporcionar maior produtividade e resistência das culturas a possíveis estresses (CUI *et al.*, 2015; VÁSQUEZ *et al.*, 2000).

Supõe-se que as benfeitorias supracitadas são mais elevadas quando a colonização ocorre o mais cedo possível durante o crescimento das plantas. Logo, na micropropagação, os benefícios máximos seriam obtidos se o inóculo estivesse presente durante a formação das raízes adventícias, sendo que a adição de FMAs no substrato, pode aumentar o enraizamento em diferentes plantas, porquanto estes microrganismos, além de aumentarem a absorção de nutrientes e de água, também produzem fitormônios e compostos polifenólicos (ABDEL-RAHMAN; EL-NAGGAR, 2014; SIQUEIRA *et al.*, 2010).

Devido a todos os efeitos benéficos no crescimento vegetal, as FMA vem sendo estudadas cada vez mais na aclimatização das plantas micropropagadas, promovendo rápido crescimento destas, reduzindo o tempo de aclimatização, aumentando a absorção de nutrientes e aumentando a resistência aos estresses ocasionados pela transição das condições *in vitro* para *ex vitro*. Contudo, para alcançar todos estes benefícios, é de suma importância que a simbiose seja estabelecida em curto período de tempo. O uso de inoculantes micorrizicos tem se mostrado muito promissor na produção de mudas, não onerando a produção e maximizando o estabelecimento destas a campo (ANZANELLO; SOUZA; CASAMALI, 2011; FARIAS *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Cardona *et al.* (2017), em estudo com plantas de amoreira-preta em condições de salinidade, observaram que a inoculação com *Rhizoglossus proliferum* proporcionou maior seletividade da planta pelo íon potássio do que o sódio, tornando as plantas mais resistentes a

condições de salinidade. Roveda *et al.* (2007) avaliando a aclimatização da mesma frutífera sob inoculação de *Acaulospora* sp. e *Rhizoglosum* sp., observaram uma melhor adaptação, maior acumulação de biomassa foliar e radicular, área da folha e absorção de P, N, Ca. Já para a aclimatização de mangabeira, com inoculação de *R. clarum* (CABRAL, 2016) e de jambú com *R. mosseae* (YADAV; AGGARWAL; SINGH, 2012), houve resultados positivos, como aumento da taxa de sobrevivência, maior crescimento da parte aérea, número de brotações, folhas por planta e área foliar. O uso de *R. mosseae* também foi benéfica para mudas micropropagadas de citros, aumentando a eficiência fotossintética (WU; ZOU; WANG, 2011).

Samarão *et al.* (2011), inoculando *R. clarum*, *Gigaspora margarita*, *R. macrocarpum*, *R. etunicatum* e *Entrophopora colombiana* obtiveram mudas de gravioleira com maior altura, diâmetro de caule, produção de matéria seca e conteúdo de P nas raízes e parte aérea e maior conteúdo de K nas raízes das mudas. Fatemeh e Zaynab (2014) observaram efeitos positivos de *R. intraradices* e *R. mosseae* em *Schefflera arboricola* em estacas de gravioleira, com aumento na iniciação radicular, maior número de estacas enraizadas e número de raízes.

4.3.3 Interação de FMAs e bactérias diazotróficas

Além do uso isolado dos FMAs e bactérias diazotróficas, é importante entender as associações estabelecidas entre estes, pois através de seus usos, é possível diversificar a biota edáfica, otimizar a disponibilidade de nutrientes e outras questões relacionadas ao crescimento e desenvolvimento e diminuir o uso de fertilizantes químicos e regulador de crescimento (SAXENA *et al.*, 2013).

O papel das FMAs nesta simbiose tripartite, dá-se pelo fornecimento de alimento e proteção de possíveis estresses, como dessecação e salinidade, para as bactérias. Já estas, irão favorecer a germinação de esporos de FMAs devido à produção de compostos, a exemplo do dióxido de carbono e etileno, que aumentarão a permeabilidade das células das raízes, facilitando a penetração do fungo e favorecendo a simbiose. A penetração das hifas irá aumentar a exsudação de nutrientes pelo hospedeiro, beneficiando o crescimento das bactérias (LEVY *et al.*, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2010).

A reinoculação destes microrganismos na aclimatização, isolados ou em mistura, que foram extintos durante os estágios *in vitro*, pode aumentar a porcentagem de sobrevivência, crescimento das plantas e produtividade, protegendo as plantas de patógenos e melhorando seu desempenho, através da disponibilidade de nutrientes, fitormônios e outros metabólitos (OLIVEIRA *et al.*, 2010; THOMAS *et al.*, 2010). Inúmeros trabalhos vêm demonstrando os

benefícios do uso em conjunto destes microrganismos, apresentando resultados positivos para absorção de nutrientes (DHAWI *et al.*, 2015), resistência a seca (ARMADA *et al.*, 2016) e estresse salino (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2016), controle de patógenos (HERNÁNDEZ-MONTIEL *et al.*, 2013), entre outros.

Para amoreira-preta, a inoculação combinada de *Rhizoglossus* sp. (GEV02), *Pseudomonas migulae* (Pf014) e *Bacillus amyloliquefaciens* (Bs006) proporcionou maior crescimento, desenvolvimento e sobrevivência na aclimatização das plantas oriundas da micropropagação (MONCADA *et al.*, 2015). A inoculação combinada de *A. amazonense* (BR 11140), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284) e *Streptomyces* sp. (S 30) e *R. clarum* melhoraram o crescimento, vigor e sobrevivência de plantas de mandioca micropropagadas (LOPES *et al.*, 2019). Na aclimatização de bananeira, Carina *et al.* (2016), co-inoculando *Rhizophagus irregularis* e *Azospirillum* sp. (G4b), observaram que as mudas inoculadas apresentaram maior desenvolvimento, altura, área foliar, biomassa e conteúdo de nutrientes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Fruticultura e em casa de vegetação localizados na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa - PR, sob as coordenadas geográficas de 25 ° 05 'S e 50 ° 09' O, com altitude média de 970 m. O clima local é classificado como Cfb pela classificação de Köppen - clima subtropical úmido mesotérmico (PEEL *et al.* 2007).

5.2 MATERIAL VEGETAL E MEIO DE CULTURA

Plantas de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Tupy foram multiplicadas *in vitro*, em ambiente de fluxo laminar, com segmentos de 1.0 cm em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 1 mg L⁻¹ BAP, 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar, sendo ajustado o pH para 5,8 com hidróxido de sódio (1 N). Deste meio, foram colocados 25 mL em frascos de 200 mL, os quais foram fechados com tampas e autoclavados a 120 °C por 20 minutos.

Decorridos 35 dias, estes explantes foram novamente repicados e transferidos para vidros contendo 25 mL de dois meios diferentes, sendo um para multiplicação, com o meio supracitado, e outro para a fase de enraizamento, com meio MS com metade da concentração de sais e vitaminas, suplementado com 0,1 mg L⁻¹ ácido naftalénico acético (ANA), 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar, com pH de 5,8, realizando também, a autoclavagem destes vidros. Os vidros contendo ANA, foram expostos por 4 dias em condições de escuro e finalmente, juntamente com os que continham BAP, organizados em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons do período de luz de 27 µmol m⁻² s⁻¹, permanecendo nestas condições por 35 dias.

5.3 ACLIMATIZAÇÃO EM LABORATÓRIO E INOCULAÇÃO

Com as etapas acima concluídas, os explantes foram removidos dos meios e lavados cuidadosamente em água corrente para total remoção do meio de cultura, estando prontos para a etapa de aclimatização em bancada de laboratório.

Para esta fase, as plantas foram transplantadas para copos plásticos de 180 mL, contendo o substrato Comercial Carolina Soil[®], o qual segundo o fabricante, é constituído de turfa de Sphagno, vermiculita expandida, casca de arroz carbonizada, traços de NPK, gesso agrícola e calcário dolomítico, apresentando pH de 5,5. O substrato foi previamente autoclavado a 120 °C por uma hora.

Para a inoculação das plantas, foi utilizado *Azospirillum brasilense* e *Rhizoglossum clarum*, colocados no sulco de plantio. Todos os copos foram recobertos com plásticos transparentes, umidificados diariamente com borrifador para a manter a umidade relativa mais constante e acondicionados nestas condições por 15 dias. Depois da retirada dos plásticos, as plantas foram mantidas em condições ambiente por mais 35 dias em bancada de laboratório à temperatura ambiente.

Desta forma, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente aleatorizado, em esquema fatorial 2 x 4, com três repetições e cinco plantas por parcela, na aclimatização em laboratório. O primeiro fator corresponde às duas formas da fase de rizogênese (*in vitro* e *ex vitro*) e; o segundo, as formas de inoculação (sem inoculação, inoculação com *A. brasilense* (AZO), inoculação com *R. clarum* (FMA) e inoculação concomitante de AZO e FMA, totalizando oito tratamentos.

A bactéria *A. brasilense*, estirpes AbV5 e AbV6 (2×10^8 Ufc mL⁻¹), corresponde ao produto comercial GRAPNODa, sendo fornecido pela empresa FERTBIO; já o fungo micorrizico *R. clarum* ($\cong 142,86$ esporos g⁻¹) foi oriundo da Coleção de Fungos Micorrízicos Arbusculares da Embrapa Agrobiologia (COFMEA). Para o preparo do inoculante bacteriano, utilizou-se 0,3 mL do produto comercial, acrescentado de 59,7 de água destilada; deste total, pipetou-se 1 mL no sulco de plantio de cada planta, contabilizando então, 10^6 Ufc. Quanto ao inoculante micorrizico, aplicou-se 0,175 g em cada sulco, representando 25 esporos.

5.4 PARÂMETROS MORFOLÓGICOS APÓS A ACLIMATIZAÇÃO

Decorridos 50 dias de aclimatização, os seguintes parâmetros foram avaliados: comprimento da maior raiz e comprimento da parte aérea, ambos em mm, com paquímetro

digital; número total de folhas, folhas vivas, massa fresca total (g), e porcentagem de sobrevivência.

5.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Para determinação da atividade enzimática de peroxidase (POD – E.C.1.11.1.7), polifenoloxidase (PPO – E.C.1.10.3.2), fenilalanina amônia liase (PAL – E.C.4.3.1.5) e AIA oxidase (AIAO - EC. 1.2.3.7), foi utilizada amostra de 0,1 g das folhas, a qual foi macerada em almofariz, utilizando nitrogênio líquido. Este material foi homogeneizado em 3 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7) suplementado com 0,1 mM de ácido etilenodiamino tetraacético, posteriormente foi armazenado em tubo de eppendorf contendo 0,0003g de polivinilpirrolidona (PVP) e centrifugado a 13000 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante, compondo o extrato enzimático, foi armazenado em freezer a -20°C para a realização das análises. Todas as leituras, após os protocolos, foram realizadas em triplicatas utilizando espectrofotômetro modelo UV 1650 PC (Shimadzu, Kyoto, Japão).

A atividade específica da POD foi determinada de acordo com metodologia adaptada de Urbanek *et al.* (1991). Primeiramente, adicionou-se 100 µL de extrato enzimático em 2,9 mL de solução contendo tampão acetato de sódio 50 (mM) pH 5,2, peróxido de hidrogênio (60 mM) e guaiacol (20 mM). Essa solução foi incubada em banho-maria por 10 minutos a 30°C. Após, efetuou-se a leitura à 480 nm. Uma unidade de atividade de POD é equivalente a um aumento em 0,01 vezes a quantidade de enzima para 1 g de peso fresco min⁻¹, conforme Fu *et al.* (2011).

Para determinação da atividade da PPO (GAUILLARD; RICHARD-FORGET; NICOLAS, 1993), o substrato enzimático foi composto por 50 mL de tampão fosfato de potássio (0,1M) pH 6,0 contendo catecol (25 mM). Logo após, foi adicionado 200 µL do extrato enzimático em 2,8 mL do substrato enzimático em tubos de ensaio, os quais permaneceram em banho-maria por 10 minutos a 30°C. A leitura foi realizada com comprimento de onda de 410 nm. Uma unidade de atividade de PPO é equivalente a um aumento em 0,01 vezes a quantidade de enzima para 1 g de peso fresco min⁻¹, conforme Fu *et al.* (2011).

A determinação da atividade da PAL seguiu a metodologia de Fu *et al.* (2011) com modificações. Adicionou-se 25 µL de extrato enzimático com 475 µL de tampão TRIS e 500 µL de L-fenilalanina, ficando em banho-maria por 1 hora à 40°C, adicionando por fim, 60 µL de HCl (0,5 M) com o intuito de paralisar a reação, realizando então a leitura com comprimento

de onda de 290 nm. Uma unidade de atividade PAL é equivalente a um aumento de 0,01 vezes quantidade de enzima para 1 g de peso fresco h^{-1} , conforme Fu *et al.* (2011).

Para a AIAO, determinada pela metodologia proposta por Zhang (1990), adicionou-se 100 μL do extrato enzimático em uma solução composta por 200 μL de cloreto de manganês (1mM), 100 μL de 2,4-diclorofenol (1mM), 200 μL de AIA (1mM) e 500 μL de tampão fosfato pH 6, incubando em banho-maria por 30 min a 30°C. Depois, 200 μL desta mistura foi adicionada em 400 μL da solução de Salkoviski (1 mL de cloreto de ferro (0.5M) com 50 mL de ácido perclórico (35%)) e colocada em banho-maria por 30 min à 30°C e realizando a leitura a 530 nm. Uma unidade da AIAO foi expressa em μg de AIA degradado g de peso fresco $^{-1}$ h^{-1} , conforme Fu *et al.* (2011).

Para determinação do conteúdo total de polifenóis, moeu-se 0,5 g das folhas em 5 mL de metanol a 40% e esta solução foi incubada em banho-maria a 55 °C durante 30 minutos. Em seguida, para obtenção do extrato de polifenóis, esta solução foi centrifugada a 3000 g por 10 minutos (GORINSTEIN; HARUENKIT, 2004). O conteúdo de polifenóis foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965), usando 1,0 mL do extrato de polifenóis, 1,0 mL de água destilada, 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 0,5 mL de Na_2CO_3 a 7,5%. As amostras foram homogeneizadas e armazenadas no escuro por 1 hora. Para a construção da curva de calibração, foi utilizado o ácido gálico como padrão. A leitura foi realizada a 765 nm e o conteúdo de polifenóis expresso em mg g^{-1} de peso fresco.

5.6 ACLIMATAÇÃO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Após as avaliações não destrutivas em laboratório, as plantas foram realocadas em casa de vegetação, com a amostra sendo composta por três repetições e três plantas por parcela. Realizou-se o transplântio das plantas para vasos de três litros contendo o substrato Carolina Soil®, mantidos em casa de vegetação coberta com filme de EVA de 150 microns e com irrigação diária.

5.7 ÍNDICES DE CLOROFILA E EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA E DO USO DA ÁGUA

Decorridos 150 dias foi determinado os valores de clorofila a (Clo.a), clorofila b (Clo.b) e clorofila total (Clo.t), pelo método indireto, com o uso do clorofilômetro, marca ClorofiLOG®, modelo CFL 1030 (Falker, Porto Alegre, RS). A leitura com o clorofilômetro foi realizada em três folhas, uma em cada terço da planta e contabilizada a média.

As trocas gasosas foram determinadas com o analisador portátil de CO₂ por infravermelho modelo LI-6400XT (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, EUA), configurado com fluxo de ar contínuo em 500 $\mu\text{mol s}^{-1}$, misturador CO₂ de referência em 380 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, temperatura do bloco em 25°C e fluxo de intensidade luminosa em 1.200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, entre as 10:30h e 14:30h com o dia em pleno sol e sem nuvens. Esta avaliação foi realizada através de método não destrutivo do limbo foliar, selecionando três folhas por planta, uma mais antiga (mais rígida), uma mediana (em plena atividade fotossintética) e uma mais nova (ápices foliares), avaliou-se a assimilação líquida de CO₂ ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática ($\text{mol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração de carbono intercelular ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ mol}^{-1}$), eficiência fotossintética do uso da água [$(\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}).(\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1})^{-1}$] e a eficiência de carboxilação [$(\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}).(\mu\text{mol de CO}_2 \text{ mol}^{-1})^{-1}$].

5.8 ANÁLISE NUTRICIONAL E MORFOLÓGICAS

Aos 180 dias, realizou-se a análise nutricional, massa fresca e massa seca da parte aérea e das raízes. Após pesagem em balança analítica, as diferentes partes da planta foram colocadas em sacos de papel e secadas em estufa com ventilação forçada a 60°C por 48 horas.

Para a análise nutricional de macro e micronutrientes, folhas secas foram processadas em moinho tipo Willey, com peneiras de 0,85 mm. Os teores de N foram determinados mediante digestão sulfúrica e leitura pelo método semi-micro-Kjeldahl. As concentrações de P, K e S foram verificadas por meio de digestão nítrico-perclórica e leitura por espectrometria de absorção molecular (EAM) para P, espectrofotometria de emissão em chama (EEC) para K e turbidimetria para S (MALAVOLTA *et al.*, 1997).

5.9 COLONIZAÇÃO DO SISTEMA RADICULAR - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para a visualização da interação entre as micorrizas e as raízes de amoreira-preta, foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura. As amostras de raízes foram cortadas à mão com bisturi, lavadas em água destilada e fixadas em glutaraldeído a 2,5 % e tampão fosfato 0,1 M por 16 horas a temperatura ambiente. Após a fixação, realizou-se a lavagem e desidratação das raízes em gradientes de álcool etílico de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100% por 15 minutos em cada solução.

Após a desidratação e secagem das raízes, estas foram montadas em suportes de alumínio devidamente polido e posteriormente recobertas com uma fina camada de ouro. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de alta resolução (FEG) Tescan, modelo MIRA3 LM, no complexo de Laboratórios Multiusuários (C-Labmu) da Universidade Estadual de Ponta Grossa

5.10 QUANTIFICAÇÃO DA PORCENTAGEM DE COLONIZAÇÃO MICORRIZICA

Para a porcentagem de colonização micorrizica, seguindo protocolo proposto por Phillips e Hayman (1970), amostras de raízes saudáveis e de até 2 mm foram coletadas, lavadas com água corrente e colocadas em solução de KOH 10% em banho-maria por 30 minutos. Posteriormente, as raízes foram transferidas para solução de HCL 5% por 1 minuto, depois coloridas com azul de tripan 0,05% em lactoglicerol (solução de ácido acético, glicerina e água destilada na razão 1:1:1) e incubadas em banho-maria a 90 °C por 15 minutos. Em seguida as raízes foram preservadas em glicerol ácido até a montagem das lâminas. Então, montou-se 10 lâminas por repetição, com cada uma contendo 10 segmentos de 1 cm, e observadas em microscópio estereoscópio com aumento de 100 x, verificando a colonização da FMA.

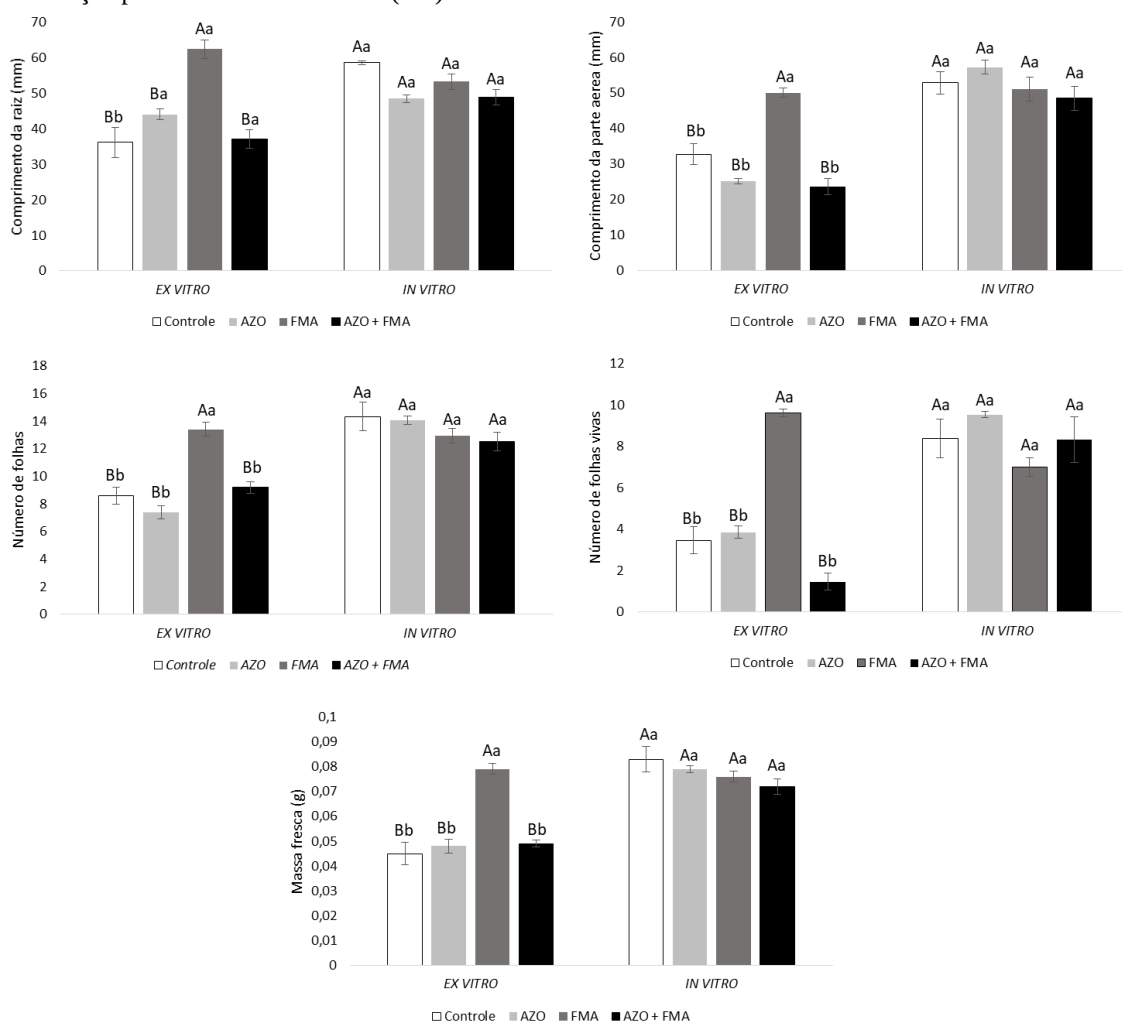
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para normalidade dos resíduos e quando necessário, transformados. Satisfeita essa pressuposição, realizou-se o teste F (5%) da análise de variância para verificar a significância dos fatores e interação, e quando significativo, às médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott ($p > 0,05$) através do pacote ExpDes do software R CORE TEAM (2018).

6 RESULTADOS

Após a aclimatização das plantas, todas as variáveis morfológicas analisadas apresentaram interação significativa entre os fatores. Com a rizogênese *in vitro* e inoculação na aclimatização, não houve diferença entre os tratamentos para nenhuma das variáveis aferidas (figura 1).

Figura 1 – Efeito da inoculação isolada ou combinada de *Azospirillum brasilense* (AZO) e *Rhizoglossum clarum* (FMA) no comprimento da raiz (A), comprimento da parte aérea (B), número de folhas (C), número de folhas vivas (D) e massa fresca (E) de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Tupy, aclimatizadas após rizogênese *in vitro* e *ex vitro*. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, não possuem diferença entre as inoculações dentro de cada rizogênese, e as seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre as rizogêneses dentro de cada inoculação pelo teste de Scott Knott (5%).

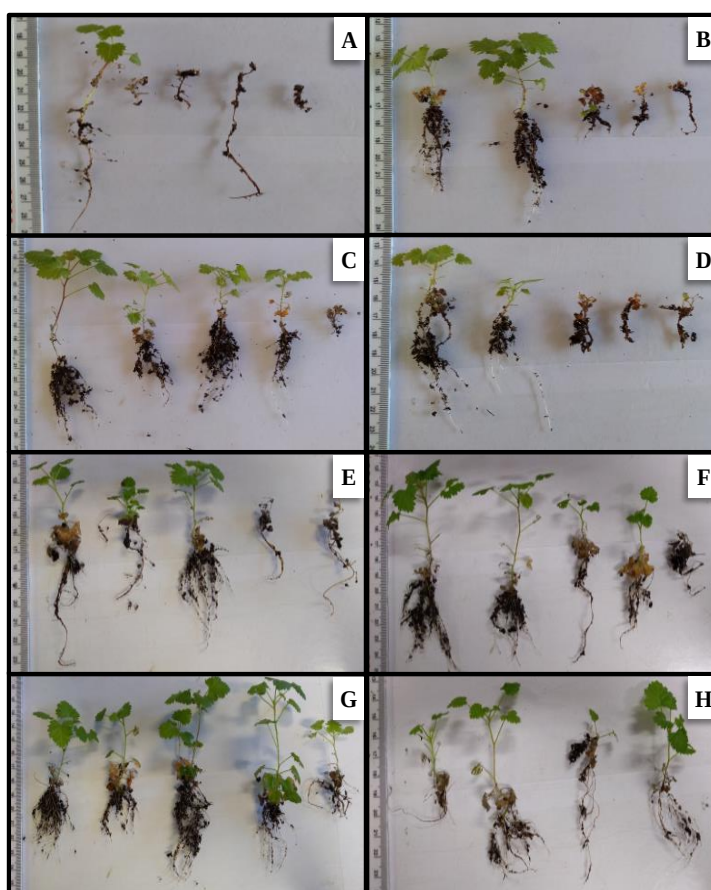


Na rizogênese *ex vitro*, para o comprimento de raiz, a FMA proporcionou o maior valor em comparação aos demais tratamentos, sendo 72,64% maior que o controle e as demais inoculações também não diferiram entre as rizogêneses. Para o comprimento da parte aérea, número de folhas, número de folhas vivas e massa fresca, a inoculação micorrizica também gerou valores superiores estatisticamente aos demais níveis deste fator, com acréscimo de

53,04%, 55,81%, 177,46% e 75,55% em relação ao controle, respectivamente (figura 1). Evidencia-se então, o efeito positivo da inoculação com a FMA, pois para todas as características avaliadas, não diferiu entre a rizogênese *in vitro* e *ex vitro*, podendo então substituir o uso de fitormônios indutores do enraizamento.

Para a porcentagem de sobrevivência, não houve interação entre os fatores. Para o fator rizogênese, as plantas que foram enraizadas *in vitro* apresentaram média de 80% e as *ex vitro*, 53,33%. Em relação a inoculação, a FMA proporcionou os maiores valores, incrementando em até 34% as demais inoculações e em 125% o controle.

Figura 2 – Plantas de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Tupy com 50 dias de aclimatização após rizogênese *in vitro* e *ex vitro* e sob inoculação isolada ou combinada de *Azospirillum brasilense* (AZO) e *Rhizoglomus clarum* (FMA).



Plantas com rizogênese *ex vitro* sem inoculação (A), inoculadas com AZO (B), FMA (C) e coinoculação (D). Plantas com rizogênese *ex vitro* sem inoculação (E), inoculadas com AZO (F), FMA (G) e coinoculação (H).

Tabela 1 - Porcentagem de sobrevivência de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Tupy, 50 dias após aclimatização com rizogênese *in vitro* e *ex vitro* sob inoculação simples ou combinada de *Azospirillum brasilense* (AZO) e *Rhizoglomus clarum* (FMA).

Fator de variação		Porcentagem de sobrevivência
Rizogênese	<i>Ex vitro</i>	53,33 B
	<i>In vitro</i>	80,0 A

Teste F		0,0001*
Inoculação	Sem	40,0 C
	AZO	66,67 B
	FMA	90,0 A
	AZO + FMA	70,0 B
Teste F		0,00006*
C.V. (%)		19,36

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott (5%).

*Significativo a $p < 0,05$.

CV: coeficiente de variação.

Quanto ao conteúdo de polifenóis (tabela 2), este não apresentou interação significativa entre os fatores, contudo seus respectivos níveis apresentaram diferenças. As plantas com rizogênese *in vitro* apresentaram a maior média, superando em média 3 mgGAE g⁻¹ as demais. Em relação as inoculações, a FMA foi superior a todos as demais, com acréscimo de 28,94% em relação ao controle. A inoculação isolada com o *A. brasilense* e a coinoculação não diferiram entre si, apresentando conteúdo de polifenóis de até 14,27% a mais que os das plantas não inoculadas.

Tabela 2 – Conteúdo de polifenóis (mgGAE g⁻¹) de folhas de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Tupy, 50 após aclimatização com rizogênese *in vitro* e *ex vitro* sob inoculação isolada ou combinada de *Azospirillum brasilense* (AZO) e *Rhizoglossum clarum* (FMA).

Fator de variação	Conteúdo de polifenóis	
Rizogênese	<i>Ex vitro</i>	28,98 B
	<i>In vitro</i>	31,98 A
Teste F		0,00016*
Inoculação	Sem	26,71 C
	AZO	30,51 B
	FMA	34,44 A
	AZO + FMA	30,27 B
Teste F		0,0000*
C.V. (%)		4,93

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott (5%).

*Significativo a $p < 0,05$.

CV: coeficiente de variação.

A atividade das enzimas PPO e AIAO não apresentaram interação significativa, não havendo também, efeitos dos fatores isolados. Para a PPO e AIAO, os valores médios aferidos foram 4,06 UN gMF⁻¹ min⁻¹ e 12,015 UN gMF⁻¹ h⁻¹, respectivamente.

Para as enzimas POD e PAL, houve interação significativa (tabela 3). Para a primeira, com a rizogênese *ex vitro*, a inoculação com a FMA proporcionou maior atividade de 239,62% em relação ao controle, seguida da com *A. brasilense* e inoculação combinada, as quais superaram o controle em 49,06% e 87,73%, nesta ordem. Na rizogênese *in vitro*, a inoculação micorrízica e combinada alcançaram maior média que o controle e AZO. Quanto à resposta das inoculações entre as rizogêneses, excetuando-se a FMA, que não diferiu entre elas, todas apresentaram maior atividade na *ex vitro*.

Na atividade da PAL (tabela 3), os níveis de inoculação apresentaram diferença somente na rizogênese *in vitro*, sendo que a maior atividade foi encontrada para a inoculação com FMA, incrementando o controle em 57,67%. Todas as inoculações não diferiram entre as rizogêneses, no entanto, as plântulas não inoculadas tiveram o valor máximo na rizogênese *in vitro*.

Tabela 3 - Atividade da peroxidase (POD - UN gMF⁻¹ min⁻¹) e fenilalanina amônialiase (PAL - UN gMF⁻¹ h⁻¹) de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Tupy, 50 dias após aclimatização com rizogênese *in vitro* e *ex vitro* sob inoculação simples ou combinada de *Azospirillum brasilense* (AZO) e *Rhizoglossum clarum* (FMA).

	POD ^T		PAL	
	<i>Ex vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>Ex vitro</i>	<i>In vitro</i>
Sem inoculação	10,6 Cb	20,6 Ba	1297 Bb	2162 Aa
AZO	15,8 Bb	23,5 Ba	1507 Ba	1951 Aa
FMA	36,0 Aa	28,7 Aa	2045 Aa	1693 Aa
AZO + FMA	19,9 Bb	27,0 Aa	1482 Ba	1679 Aa
Teste F	0,002*		0,009*	
CV (%)	15,22		15,64	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na coluna, e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott (5%).

*Significativo a $p < 0,05$.

CV: coeficiente de variação.

T: dados transformados por $\log(x)$.

Para os teores de clorofila, nenhuma delas apresentou interação significativa, com os níveis também não diferindo entre si. Os valores médios encontrados para Clo.a, Clo.b e Clo.t foram 21,118, 7,917 e 29,025 nesta ordem.

A assimilação líquida de CO₂ e concentração interna de CO₂ não apresentaram interação significativa, mas houve diferenças entre os níveis de inoculação para ambas as variáveis (tabela 4). Para a assimilação líquida, as inoculações superaram o controle em 14,49%, 23,13% e 9,63% para *A. brasilense*, FMA coinoculação, respectivamente. Para a eficiência de carboxilação, observou-se resposta semelhante, com a FMA gerando os maiores valores, sendo 16,66 % maior que o controle, seguida pela com *A. brasilense*, coinoculação e controle, que teve média inferior das inoculações.

Tabela 4 - Assimilação líquida de CO₂ - A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e concentração interna de CO₂ (Ci) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em folhas de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Tupy, 150 dias após aclimatização com rizogênese *in vitro* e *ex vitro* e aclimatadas em casa de vegetação sob inoculação isolada ou combinada de *Azospirillum brasilense* (AZO) e *Rhizoglomus clarum* (FMA) e estabelecidas em casa de vegetação.

Fator de variação		A	Ci
Rizogênese	<i>Ex vitro</i>	10,906	0,034
	<i>In vitro</i>	10,876	0,034
Teste F		0,895 ^{ns}	0,988 ^{ns}
Inoculação	Sem	9,732 D	0,030 D
	AZO	11,143 B	0,038 B
	FMA	12,013 A	0,035 A
	AZO + FMA	10,676 C	0,032 C
Teste F		0,00002*	0,00001*
C.V. (%)		4,92	5,34

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott (5%).

CV: coeficiente de variação.

*Significativo a $p < 0,05$.

NS: Não significativo.

Depreende-se da tabela 5, que a interação foi significativa para a condutância estomática, eficiência de carboxilação e eficiência instantânea do uso da água. Para a condutância estomática, na rizogênese *in vitro*, as inoculações com *A. brasilense* e combinada, juntamente com a FMA, superaram o controle, mas não diferiram entre si; na *ex vitro*, todos os níveis não apresentaram diferença estatística. Entre as rizogêneses, os índices da FMA não diferiram, mas inoculações com AZO e combinada, foram maiores na rizogênese *ex vitro* que na *in vitro*, comportamento inverso do controle.

Para a eficiência de carboxilação, na rizogênese *ex vitro*, as plantas não inoculadas apresentaram os maiores teores e as com a FMA, os menores. Na rizogênese *in vitro*, a inoculação com AZO apresentou o menor valor que as demais, com essas não diferindo entre si. As plantas controle não apresentaram diferença entre as rizogêneses, mas as inoculadas com FMA, tiveram maiores valores na *ex vitro*, comportamento inverso para as demais inoculações. Quanto a eficiência instantânea do uso da água, as inoculações isoladas apresentaram as maiores médias nas duas rizogêneses, com a FMA tendo a maior. Entre as rizogêneses, as inoculações geraram diferenças, com AZO e AZO+FMA sendo maior na *in vitro* e FMA na *ex vitro* (tabela 5).

Tabela 5 - Condutância estomática – Gs ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), eficiência de carboxilação - ECI [$(\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}) \cdot (\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1})^{-1}$] e eficiência instantânea do uso da água – EUA [$(\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}) \cdot (\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1})^{-1}$] em folhas de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Tupy, 150 dias após aclimatização com rizogênese in vitro e ex vitro e aclimatadas em casa de vegetação sob inoculação isolada ou combinada de *Azospirillum brasilense* (AZO) e *Rhizoglosum clarum* (FMA) e estabelecidas em casa de vegetação.

	Gs		ECi		EUA	
	<i>Ex vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>Ex vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>Ex vitro</i>	<i>In vitro</i>
Sem inoculação	0,34 Cb	0,39 Aa	327,45 Aa	322,24 Aa	1,00 Ca	1,07 Ca
AZO	0,45 Aa	0,39 Ab	316,56 Bb	312,31 Ba	1,15 Bb	1,24 Ba
FMA	0,38 Ba	0,39 Aa	312,35 Ca	317,53 Ab	1,22 Aa	1,16 Aba
AZO + FMA	0,48 Aa	0,41 Ab	319,04 Bb	320,09 Aa	1,05 Cb	1,10 Ca
Teste F	0,000479*		0,00074*		0,037*	
CV (%)	5,48		0,74		3,02	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na coluna, e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott (5%).

*Significativo a $p < 0,05$.

CV: coeficiente de variação.

Para o conteúdo de macronutrientes nas folhas, não houve interação entre os fatores para nenhum dos elementos analisados. Quanto às rizogêneses, somente o nitrogênio apresentou diferença significativa, com as plantas enraizadas *in vitro* tendo maior conteúdo que as *ex vitro*. Em relação as inoculações, para o nitrogênio e fosforo, todos os tratamentos não diferiram entre si e superaram o controle. Para o potássio, as inoculações contendo FMA superaram o controle e AZO (tabela 6).

Tabela 6 - Conteúdo de nitrogênio (N), fosforo (P), potássio (K) e enxofre (S) de folhas de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Tupy, 180 dias após aclimatização com rizogênese in vitro e ex vitro e aclimatadas em casa de vegetação sob inoculação isolada ou combinada de *Azospirillum brasilense* (AZO) e *Rhizoglosum clarum* (FMA) e estabelecidas em casa de vegetação.

Fator de variação		N	P	K	S
		(g kg ⁻¹)			
Rizogênese	<i>Ex vitro</i>	18,07 B	1,88	15,0	3,88
	<i>In vitro</i>	21,30 A	1,80	15,25	4,14
Teste F		0,00002*	0,6569 ^{ns}	0,1089 ^{ns}	0,3391 ^{ns}
Inoculação	Sem	17,15 B	1,41 B	14,79 B	4,27
	AZO	20,17 A	1,97 A	14,93 B	3,87
	FMA	21,25 A	2,08 A	15,53 A	3,98
	AZO + FMA	20,18 A	1,90 A	15,25 A	3,93
Teste F		0,00053*	0,0480*	0,0131*	0,7161 ^{ns}
C.V. (%)		6,87	21,52	2,42	16,11

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott (5%).

CV: coeficiente de variação.

*Significativo a $p < 0,05$.

NS: Não significativo.

A tabela 7 mostra que para as variáveis de massa fresca e seca foliar e radicular não houveram interação entre os fatores e também entre as rizogêneses, mostrando que o enraizamento *ex vitro* e aclimação das mudas em casa de vegetação é um protocolo efetivo de propagação. Já para a inoculação, excetuando a massa fresca radicular, que não apresentou diferença estatística entre os níveis, todas as inoculações superaram o controle, mas diferiram entre si.

Tabela 7 - Massa fresca (MF) e seca (MS) foliar e radicular de (*Rubus* sp.) cv. Tupy, 180 dias após aclimação com rizogênese *in vitro* e *ex vitro* e aclimatadas em casa de vegetação sob inoculação isolada ou combinada de *Azospirillum brasilense* (AZO) e *Rhizoglosum clarum* (FMA) e estabelecidas em casa de vegetação.

Fator de variação		MF foliar	MS foliar	MF radicular	MS radicular
		(g)			
Rizogênese	<i>Ex vitro</i>	20,73	8,45	27,24	11,64
	<i>In vitro</i>	22,56	7,77	27,12	11,80
Teste F		0,233 ^{ns}	0,224 ^{ns}	0,83 ^{ns}	0,524 ^{ns}
Inoculação	Sem	17,10 B	6,54 B	26,70	10,46 B
	AZO	22,58 A	8,42 A	26,89	12,10 A
	FMA	24,49 A	9,13 A	27,49	12,19 A
	AZO + FMA	22,41 A	8,35 A	27,66	12,13 A
Teste F		0,016*	0,022*	0,59 ^{ns}	0,000*
C.V. (%)		16,71	16,3	5,16	5,15

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott (5%).

CV: coeficiente de variação.

*Significativo a $p < 0,05$.

NS: Não significativo.

A porcentagem de colonização não apresentou interação entre os fatores e diferença entre as rizogêneses. As raízes das plantas de amoreira-preta inoculadas isoladamente com *R. clarum* e combinada com *A. brasilense*, após aclimação em casa de vegetação, apresentaram colonização da FMA de 65% e 60%, respectivamente, com ambos os tratamentos não diferindo (tabela 8 e figuras 3 e 4).

Tabela 8 - Porcentagem de colonização de raízes de (*Rubus* sp.) cv. Tupy, 180 dias após aclimatização com rizogênese *in vitro* e *ex vitro* e aclimatadas em casa de vegetação sob inoculação isolada ou combinada de *Azospirillum brasilense* (AZO) e *Rhizoglosum clarum* (FMA) e estabelecidas em casa de vegetação.

Fator de variação		Porcentagem de colonização ^T
Rizogênese	<i>Ex vitro</i>	30,83
	<i>In vitro</i>	31,66
Teste F		0.705 ^{ns}
Inoculação	Sem	0 B
	AZO	0 B
	FMA	65 A
	AZO + FMA	60 A
Teste F		0.000*
C.V. (%)		12,21

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott (5%).
CV: coeficiente de variação.

*Significativo a $p < 0,05$.

NS: Não significativo.

T: dados transformados por arcseno $((x/100)^{1/2})$.

Figura 3 – Raízes de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Tupy sem inoculação (A), inoculadas com *Rhizoglosum clarum* (B-G) e co-inoculadas com *Rhizoglosum clarum* e *Azospirillum brasilense* (H). Estruturas: vesícula (V), arbúsculo (A) e hifas (H)

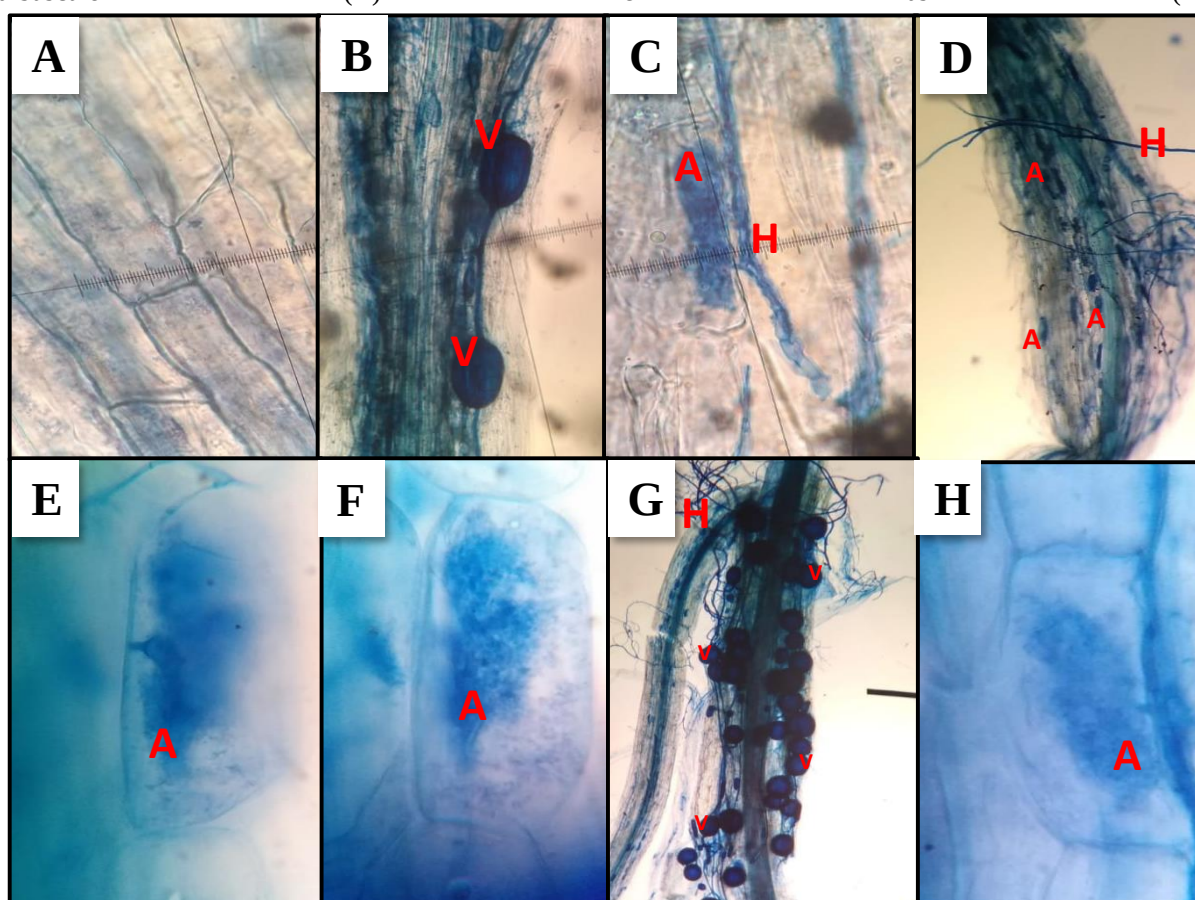
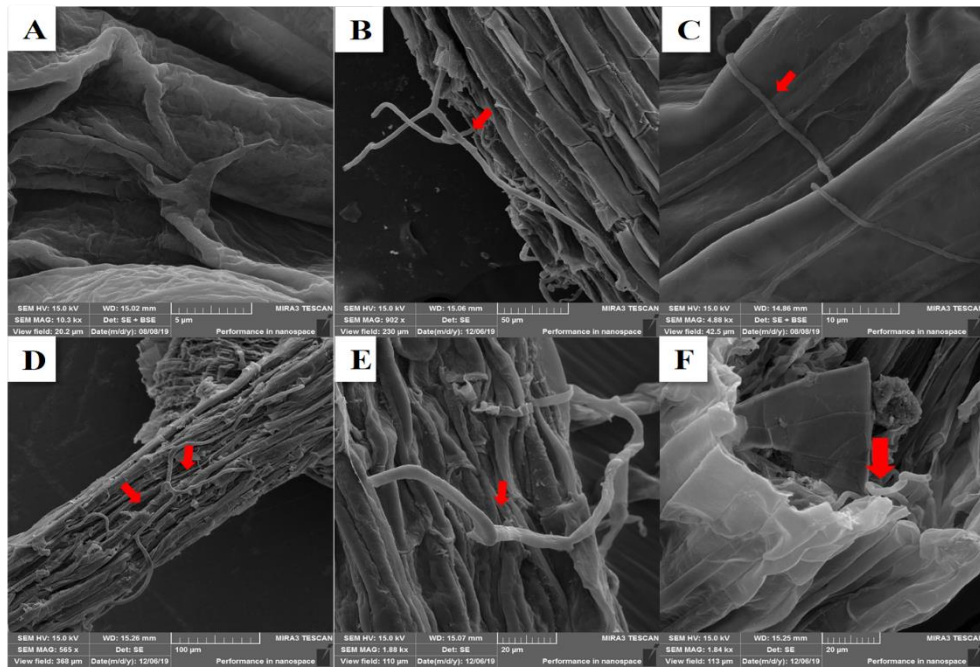


Figura 4 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das raízes de amoreira-preta (*Rubus*. sp.) não inoculadas (A) e inoculadas com *Rizhoglomus clarum* (B-F). Hifas da FMA indicadas pelas setas.



7 DISCUSSÃO

O crescimento radicular, beneficiado pela inoculação micorrizica e com *A. brasilense*, e a melhoria das outras características que não diferiram entre as rizogêneses para as plântulas inoculadas com FMA, pode ser explicado pela modulação dos níveis de etileno no solo e produção de fitormônios, como auxinas, que induzem o rápido estabelecimento das raízes, melhorando sua fixação no solo e a captação de nutrientes. Além disso, poderia estar relacionado à secreção de sideróforos, produção de antibióticos para combater fitopatógenos e indução de resistência, e como consequência, maior sobrevivência das plântulas (AGUADO-SANTACRUZ *et al.*, 2012; MOREIRA; ARAÚJO, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Os maiores benefícios encontrados na rizogênese *ex vitro*, podem ter ocorrido devido a colonização da FMA ter ocorrido no início da formação das raízes adventícias (ABDEL-RAHMAN; EL-NAGGAR, 2014; SIQUEIRA *et al.*, 2010).

Vettori *et al.* (2010) inoculando *A. brasilense* Sp245 na aclimatização de porta-enxertos de ameixeira Mr.S 2/5 (*Prunus cerasifera* x *P. spinosa*) e GF 677 (*Prunus persica* x *P. amigdalus*) e de macieira ‘MM 106’ (NorthenSpy x M1), observaram que a bactéria promoveu maior crescimento das mudas. Contudo, os efeitos não foram tão expressivos no porta-enxerto ‘MM 106’. Larraburu, Bususovich e Llorente (2016) concluíram que *A. brasilense* Az39 melhora a aclimatização e rizogênese *in vitro* e *ex vitro* de jojoba, aumentando a porcentagem de enraizamento e proporcionando melhorias na morfologia. A inoculação com *Azospirillum* sp. e *Azotobacter* sp. na aclimatização de gengibre vermelho também gerou os maiores índices de sobrevivência, diâmetro de caule, massa seca de raiz e número de brotações das plantas (OVANDOMEDINA *et al.*, 2007).

Em todas as variáveis avaliadas, na rizogênese *in vitro* e *ex vitro*, a inoculação com a FMA proporcionou valores superiores ou aproximados aos encontrados por Wagner Júnior *et al.* (2012), que estudando diferentes níveis de vermiculita na aclimatização de amoreira-preta cv. Tupy, após o enraizamento *in vitro* com ANA, aferiu valores entre 24,5 e 34,60 mm para comprimento da parte aérea, média de 70 mm para o comprimento de raiz e número total de folhas de 9 a 10. Os valores também foram superiores aos encontrados por Ismaini e Destri (2017) com enraizamento *in vitro*, utilizando 10 mg L⁻¹ de ácido indol butírico, e aclimatização aos 56 dias para *Rubus chrysophyllus* e *R. fraxinifolius*.

A porcentagem de sobrevivência encontrada neste trabalho para a FMA foi maior que aos relatados por Lebedev *et al.* (2019) avaliando o desempenho de sete cultivares de *Rubus*

idaeus após o enraizamento *in vitro* e *ex vitro*. Os explantes não enraizados alcançaram médias de 43% a 76%

Os benefícios proporcionados pela FMA também foram encontrados por Moncada *et al.* (2015) trabalhando com três genótipos de amoreira-preta aclimatizadas após rizogênese *in vitro* e com inoculação isolada e combinada com *Pseudomonas migulae* e *Bacillus amyloliquefaciens*, tendo cada cultivar apresentado respostas diferentes às inoculações, as quais proporcionaram resultados similares ou superiores a fertilização convencional das mudas. Estes resultados mostram que para cada genótipo, condições edafoclimáticas e estágio de crescimento das plantas, as respostas são diferentes para as diversas interações entre os microrganismos, porquanto a rizosfera é um ambiente dinâmico, modulando as interações planta-microrganismos e microrganismos-microrganismos.

Lima *et al.* (2011), avaliando a interação entre as bactérias *Stenotrophomonas maltophilia* e *Azospirillum* sp. e FMAs *Rhizoglomus clarum* e *Gigaspora margarita*, observaram que somente as micorrizas promoveram acréscimos nas variáveis de crescimento e desenvolvimento de mudas de mamoeiro, não dependendo da presença da bactéria. Constantino *et al.* (2008) também verificaram que a inoculação isolada das rizobactérias *Azotobacter chroococcum* e *Azospirillum brasilense* e FMAs, proporcionou maior crescimento do que a coinoculação em pimenta chili. Sala, Freitas e Silveira (2007), avaliando a inoculação isolada e combinada de bactérias diazotróficas e FMAs em trigo, observaram que a inoculação isolada com *Rhizoglomus* sp. foi mais eficiente na absorção de nitrogênio e fósforo e no crescimento das plantas.

Os melhores resultados apresentados pela inoculação isolada de FMA podem ser explicados pela possível competição entre os diversos inóculos por compostos fotossintetizantes, espaço e nutrientes, considerando que as plantas se encontravam em situação de adaptação, exigindo nutrientes e fotoassimilados para um bom desenvolvimento, tendo que além de satisfazer seus requisitos fisiológicos, partilhar com os microrganismos, demandando um alto gasto energético (BANDARA *et al.*, 2006, CONSTANTINO *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2011; SALA, FREITAS, SILVEIRA, 2007). Salienta-se também, que segundo Frey-Klett *et al.* (2005), a micorrizosfera seleciona as bactérias que mais proverão benefícios para o hospedeiro, estabelecendo com êxito a simbiose tripartite.

Foi possível observar que o inóculo de *A. brasilense* apresentou um desempenho aquém do esperado nas plantas com rizogênese *ex vitro*, possivelmente devido à funcionalidade limitada das raízes para absorção de nutrientes e fitormônios produzidos pela bactéria. Além disso, a interação entre as bactérias e a planta é associativa, não dependendo do hospedeiro para

sobreviver. A fixação biológica de nitrogênio também é um processo muito custoso energeticamente, e que a planta em seu início de desenvolvimento não se beneficiaria (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; TAIZ *et al.*, 2017).

O aumento do teor de polifenóis nas plantas inoculadas, também foi observado por Sharma e Sharma (2016), que analisando as alterações fisiológicas e bioquímicas da cultivar de tomate PT-3 com inoculação de *Rhizophagus irregulares*, *Pseudomonas jessenii* R62 e *Pseudomonas synxantha* R81, observaram um aumento de 28% em relação ao controle. Estas melhorias também foram encontradas em folhas de oliveira cv. Arbequina por Malik, Nuñez e Mckeever (2017) com a inoculação de FMAs. A inoculação micorrízica com *Diversispora versiformis*, *Rhizophagus intraradices*, *Funneliformis mosseae* também aumentou o conteúdo de polifenóis em cultivares de cebola (MOLLAVALI *et al.*, 2015).

Conforme revisado por Souza e Pereira (2007), os fenóis são benéficos para o enraizamento, atuando como co-fatores, os quais agem protegendo as auxinas endógenas, sendo substrato alternativo para a AIA-oxidase, estimulando assim, sua síntese e aumentando sua liberação. Este complexo auxina-fenol é importante para a formação do primórdio radicular.

A síntese de compostos fenólicos vegetais pode ser ocasionada pela interação entre as plantas e os microrganismos e além da indução de produção de auxina, também pode modular outros processos fisiológicos, como a regulação transcricional e transdução de sinal e indicar situações de estresse, contribuindo na redução geral das espécies reativas de oxigênio. Portanto, o fato dos FMAs e das bactérias promotoras do crescimento serem capazes de modificar a síntese de fenóis, eles podem, além de influenciar no crescimento das plantas, auxiliar no biocontrole, permitindo que a planta responda melhor a possíveis patógenos, seja pela produção de antibióticos ou pelo espessamento da parede da planta (CHEYNIER *et al.*, 2013).

Assim como neste trabalho, Ntengna *et al.* (2019), inoculando *Acaulospora tuberculata* e *Gigaspora margarita* em *Xanthosoma sagittifolium*, verificaram que as micorrizas ocasionaram um aumento na atividade da enzima de defesa PAL e no teor de fenóis. Hajiboland *et al.* (2010) também encontraram maior atividade de enzimas de defesa, como a POD em plantas expostas a salinidade e inoculadas com *R. intraradices*.

As enzimas de defesa da planta, como a POD, PPO, PAL e AIAO, modulam diversas respostas das plantas, como o enraizamento, lignificação e síntese de metabólitos, sendo bem documentado seu aumento em plantas inoculadas, uma vez que a colonização induz respostas de defesa das plantas, a exemplo do início da simbiose com FMA, quando ocorre a penetração da hifa. O aumento da atividade da POD mostra que esta tem grande participação no enraizamento e sua redução, inibe a divisão celular e formação adequada da parede celular. Ela

está ligada ao metabolismo de auxinas e na lignificação da parede celular na presença de fenóis. Com o aumento de lignina, há uma maior resistência da planta a possíveis estresses (KOSE *et al.*, 2011; FU *et al.*, 2011; TAIZ *et al.*, 2017).

Os principais compostos fenólicos vegetais são derivados da fenilalanina, sendo esta reação catalisada pela PAL, sendo esta a primeira enzima que desencadeia a síntese de flavonoides, inclusive os que ativam a defesa da planta. A atividade desta enzima é dependente de fatores ambientais, a exemplo da infecção por fungos, que desencadeia a transcrição do RNA mensageiro que codifica a PAL, elevando assim, sua atividade e consequentemente, a síntese de compostos fenólicos, que no caso das infecções, são chamados de fitoalexinas. Este processo, denominado de resposta imune, gera um espessamento da parede devido ao depósito de lignina, aumentando a resistência das plantas (ABDEL-FATTAH *et al.*, 2011; TAIZ *et al.*, 2017).

Estas melhorias na eficiência fotossintética e no uso da água ocasionado pelas inoculações, pode ser explicado pelo aumento da absorção de nutrientes, maior exigência e captação de carbono devido a colonização das raízes, extração de água pelas hifas, regulação estomática devido a síntese de hormônios, maior ajuste osmótico, condutividade hidráulica das raízes e maior atividade de enzimas, como a ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase, indicada pela menor concentração intracelular de CO₂ (TAIZ *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2012). As melhorias ocasionadas no aparato fotossintético podem ser revertidas nas diversas características fisiológicas, a exemplo do acréscimo na biomassa das plantas, como relatado na tabela 7.

Plantas de citros com rizogênese *in vitro* e aclimatizadas por 170 dias, apresentaram aumentos significativos na assimilação líquida de CO₂ e condutância estomática quando inoculadas com *R. mossae* (WU; ZOU; WANG, 2011). Yang *et al.* (2015), submetendo plantas de *Robinia pseudoacacia* a concentrações crescentes de cobre e inoculação *Funneliformis mosseae* e *Rhizophagus intraradices*, observaram que as FMAs, em condições de estresse, melhoraram a eficiência fotossintética das plantas, aumentando a assimilação líquida de CO₂ e condutância de estomática, e diminuindo a concentração intercelular de CO₂.

Hernandez-Perez *et al.* (2017), avaliando a resposta da inoculação combinada de *A. brasilense* e *R. intraradices* e fertilização convencional em plantas de tomate, observaram que a biofertilização aos 15 e 30 dias após o transplante, proporcionou um aumento na taxa de assimilação de CO₂ e condutância estomática em 17,0 e 20,4 % respectivamente, em relação as plantas não inoculadas. Hajiboland *et al.* (2010), submetendo plantas de tomate à salinidade e inoculação com *R. intraradices*, concluíram que a micorrização melhorou as taxas de

assimilação líquida e elevou a condutância estomática. Bulegon *et al.* (2019) inoculando *A. brasilense* AbV5/V6 em *Urochloa ruziziensis* em condições de seca, e concluíram que a bactéria promoveu menores alterações na assimilação líquida de CO₂.

Soares *et al.* (2012) inoculando *R. clarum*, *R. etunicatum*, *R. manihots*, *Gigaspora albida*, *Acaulospora scrobiculata* e *Scutellospora heterogama* em mudas de jenipapeiro, concluíram que os FMAs favoreceram o crescimento e a absorção de nutrientes, apresentando também, boa colonização das raízes. Farias *et al.* (2014) avaliando a inoculação de *R. clarum*, *R. etunicatum*, *G. margarita* e *Scutellospora heterogama* em mudas de mirtilheiro cv. Woodard, concluíram que as plantas inoculadas tiveram maior altura, biomassa seca e maiores teores de N e P.

Roveda (2007), inoculando FMAs na aclimatização de amoreira-preta, observaram que as plantas inoculadas mostraram melhor adaptação ao ambiente, com ganhos no porte, acúmulo de biomassa foliar e radicular e absorção de nitrogênio, fósforo, cálcio e magnésio, até os 80 dias após a aclimatização. Moncada *et al.* (2015), realizando a inoculação simples e combinada de *Rhizoglossus* sp. (GEV02), *P. migulae* Pf014 e *B. amyloliquefaciens* Bs006 também na aclimatização de amoreira-preta, observaram que depois de 120 dias, o sinergismo entre os microrganismos permitiu maiores valores para todas as variáveis avaliadas, garantindo um melhor estabelecimento, desenvolvimento, vigor e sobrevivência. Hernandez-Perez *et al.* (2017) obtiveram os mesmos resultados benéficos da inoculação combinada de *A. brasilense* e *R. intraradices* em contraste com a fertilização convencional, pois a primeira proporcionou aumento de 10,5% da biomassa seca das plantas de tomate.

Observa-se que ao contrário do início da aclimatização, aos 180 dias pode-se observar que ocorreu uma interação sinérgica entre os microrganismos. Isto pode ser explicado pelo melhor estabelecimento das plantas, tendo estas um melhor balanço nutricional/energético, conseguindo suprir suas demandas por fotoassimilados e compartilhar estes com os microrganismos, ter maior volume de raízes e devido ao crescimento, ter uma maior demanda por nutrientes, favorecendo assim, a simbiose tripartite (BANDARA *et al.*, 2006, CONSTANTINO *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2011; SALA; FREITAS; SILVEIRA, 2007). Artusso *et al.* (2006) também cita que devido ao incremento da absorção de fósforo das plantas micorrizadas, ocorre um melhor estabelecimento da associação com as bactérias diazotróficas, a qual representa alto custo energético.

A maior absorção de nutrientes, resultado das inoculações simples e combinada, principalmente para o nitrogênio, pode ter contribuído para os ganhos na biomassa da parte aérea e das raízes das plantas inoculadas em relação ao controle.

À medida que a inoculação simples e combinada aumenta o conteúdo de nutrientes essenciais, a exemplo do nitrogênio, também ocorre a síntese de metabólitos secundários, os quais são derivados dos metabólitos primários. Desta forma, pode gerar um aumento no teor de aminoácidos, proteínas, entre outros, proporcionando um metabolismo secundário aprimorado e modificando o equilíbrio hormonal das plantas, principalmente na simbiose micorrízica (KAPOOR *et al.*, 2007; SANGWAN *et al.*, 2001; TEJAVATHI *et al.*, 2011).

As porcentagens de colonização estão condizentes com Moncada *et al.* (2015) que, trabalhando com aclimatização de amora e inoculação de *R. clarum* e *Pseudomonas migulae* e *Bacillus amyloliquefaciens*, de forma simples e combinada, também observaram a colonização das raízes.

8 CONCLUSÕES

A rizogênese *in vitro* pode ser substituída pela *ex vitro* quando os explantes forem inoculados com *R. clarum*, pois esta simbiose resulta em plantas com qualidades morfológicas satisfatórias e bom índice de sobrevivência. Contudo, a inoculação isolada com *A. brasilense* e coinoculação, não diferiram do controle.

Após o estabelecimento das plantas em casa de vegetação, todas as inoculações apresentaram melhorias nas variáveis analisadas, como absorção de nutrientes, ganhos na biomassa e no aparelho fotossintético.

O desenvolvimento da planta e maior exigência nutricional e de metabólitos beneficia a simbiose tripartite.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAH, S. S. A.; EL-NAGGAR, A. I. Promotion of rooting and growth of some types of bougainvilleas cutting by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in combination whit indole-3-butyric acid (IBA). **International Journal of Science and Research**, v. 3, p. 97-108, 2014.
- AGUADO-SANTACRUZ, G. A.; MORENO-GOMEZ, B.; JIMENEZ-FRANCISCO, B.; GARCIA-MOYA, E.; PRECIADO-ORTIZ, R. E. Impact of the microbial siderophores and phytosiderophores on the iron assimilation by plants: a synthesis. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 35, n. 1, p. 9-21, 2012.
- AHLOOWALIA, B. S.; PRAKASH, J.; SAVANGIKAR, V. A.; SAVANGIKAR, C. Plant tissue culture. In: AHLOOWALIA, B. S.; PRAKASH, J.; SAVANGIKAR, V. A.; SAVANGIKAR, C. **Low cost options for tissue culture technology in developing countries**. Vienna: International atomic energy agency.; 2004. Cap. 1, p. 3 – 10.
- ANTUNES, L. E. C.; PEREIRA, I. dos S.; PICOLOTTO, L.; VIGNOLO, G. K.; GONÇALVES, M. A. Produção de amoreira-preta no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, n.1, p. 100-111, 2014.
- ANTUNES, L.E.C.; RASEIRA, M.do C.B. **Documento, 122: Aspectos técnicos da cultura da amora-preta**. Pelotas – RS: Embrapa Clima Temperado, 2004. 54 p.
- ANZANELLO, R.; SOUZA, P.; CASAMALI, B. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em porta-enxertos micropropagados de videira. **Bragantia**, v. 70, n. 2, p. 409-415, 2011.
- ARMADA, E.; PROBANZA, A.; ROLDÁN, A.; AZCÓN, R. Native plant growth promoting bacteria *Bacillus thuringiensis* and mixed or individual mycorrhizal species improved drought tolerance and oxidative metabolism in *Lavandula dentata* plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 192, n.1, p. 1-12, 2016.
- ARORA, N. K. (Ed.). **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets**. New Delhi: Springer India, 2015. 381 p.
- BASLAM, M.; GARMENDIA, I.; GOICOECHEA, N. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) improved growth and nutritional quality of greenhouse-grown lettuce. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 10, p. 5504–5515, 2011.
- BARTOLINI, S.; CARROZZA, G. P.; SCALABRELLI, G.; TOFFANIN, A. Effectiveness of *Azospirillum brasilense* Sp245 on young plants of *Vitis vinifera* L. **Open Life Sciences**, v. 12, n. 1, p. 365-372, 2010.
- BULEGON, L. G.; GUIMARÃES, V. F.; JÚNIOR, R. C.; BATTISTUS, A. G.; INAGAKI, A. M.; SUSS, A. D. Photosynthetic and Production of *Urochloa ruziziensis* Inoculated with *Azospirillum brasilense* under Drought. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 38, n. 6, p. 1-9, 2019.
- CARDOSO, E.J.B.N.; ANDREOTE, F.D. (Ed) **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba, São Paulo. 2016, 221p.

CARDONA, W. A.; GUTIÉRREZ, J.S.; MONSALVE, O.I.; BONILLA, C. R. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento vegetativo de plantas de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth.) micorrizadas y sin micorrizar. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, v. 11, n. 2, p. 253–266, 2017.

CARINA, V. T.; EMILIA, M. M.; MIGUEL, U. S.; ORTIZ, D. R.; MANJUNATHA, B.; THANGASWAMY, S.; MULLA, S. I. Effect of Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and Azospirillum on growth and nutrition of banana plantlets during acclimatization phase. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 6, p. 131-138, 2016.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. de A. MEDEIROS, M. J. L. e. **Documentos 148: Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 2006. 28 p.

CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K. M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 1-20, 2013.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M. D.; SANTOS, A. M. Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 39, n. 3, p. 742-748, 2009.

COSTA, G. M. da; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. de. Propagação in vitro de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1090-1096, 2010.

CONSTANTINO, M.; GÓMEZ-ÁLVAREZ, R.; ÁLVAREZ-SOLÍS, J. D.; GEISSEN, V.; HUERTA, E.; BARBA, E. Effect of inoculation with rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on growth and yield of *Capsicum chinense* Jacquin. **Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics**, v. 109, n. 2, p. 169-180, 2008.

DHAWI, F.; DATTA, R.; RAMAKRISHNA, W. Mycorrhiza and PGPB modulate maize biomass, nutrient uptake and metabolic pathways in maize grown in mining-impacted soil. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 97, n.1, p. 390-399, 2015.

DIAS, P. C.; PEREIRA, M. da S. F. P.; KASUYA, M. C. C.; PAIVA, H. N. de; OLIVEIRA, L. S. de; XAVIER, A. Micorriza arbuscular e rizóbios no enraizamento e nutrição de mudas de angico-vermelho. **Revista Árvore**, v. 36, n. 6, p. 1027–1038, 2012.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I. Micropropagação e microestaquia de eucalipto. In WENDLING, I.; DUTRA, L. F. **Produção de mudas de eucalipto**. Cap. 3, Colombo – PR: EMBRAPA, 2010. p.83-120.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA Ltda. **Manual do medidor eletrônico de teor clorofila (ClorofiLOG / CFL 1030)**. Falker Automação Agrícola.2008. 33p.

FARIAS, D. D. H.; PINTO, M. A. B.; CARRA, B.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, P. V. D. D. Desenvolvimento de mudas de mirtilheiro inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 3, p. 655-663, 2014.

FATEMEH, B.; ZAYNAB, M. Enhanced rooting of leaf bud cuttings of *Schefflera arboricola* using mycorrhizal fungi. **Annual Research, Review in Biology**, v. 4, n. 18, p. 2892, 2014.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. p. 568.

FOLLI-PEREIRA, M. S.; MEIRA-HADDAD, L. S. A.; BAZZOLLI, D. M. S.; KASUYA, M. C. M. Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, n. 1, p. 1663–1679, 2012.

FREY-KLETT, P.; CHAVATTE, M.; CLAUSSE, M. L.; COURRIER, S.; ROUX, C. L.; RAAIJMAKERS, J.; GARBAYE, J. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. **New phytologist**, v. 165, n. 1, p. 317-328, 2005.

FRONZA, D.; HAMANN, J. J. **Viveiros e propagação de mudas**. Santa Maria: UFSM, Colégio Politécnico: Rede e-Tec Brasil, 2015. p. 142.

FU, Z.; XU, P.; HE, S.; SILVA, J. A. T. da; TANAKA, M. Dynamic changes in enzyme activities and phenolic content during in vitro rooting of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) plantlets. **Maejo International Journal of Science and Technology**, v. 5, n. 2, p. 252-265, 2011.

GAUILLARD, F.; RICHARDFORGET, F.; NICOLAS, J. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 215, n. 1, p. 59-65, 1993.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Oxford, v. 84, n. 3, p. 489-500, 1980.

GOTH, L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. **Clinica Chimica Acta**, v. 196, n. 2-3, p. 143-151, 1991.

HAJIBOLAND, R.; ALIASGHARZADEH, N.; LAIEGH, S. F.; POSCHENRIEDER, C. Colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improves salinity tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 313-327, 2010.

HARTMANN, HT; KESTER, DE; DAVIES, RT; GENEVE, RL. (Ed). **Plant propagation: principles and practices**. 8^a ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011, 915p.

HERNÁNDEZ-MONTIEL, L. G.; RUEDA-PUENTE, E. O.; CORDOBA-MATSON, M. V.; HOLGUÍN-PEÑA, J. R.; ZULUETA-RODRÍGUEZ, R. Mutualistic interaction of rhizobacteria with arbuscular mycorrhizal fungi and its antagonistic effect on *Fusarium oxysporum* in *Carica papaya* seedlings. **Crop Protection**, v. 47, n.1, p. 61-66, 2013.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A.; VALDÉS-AGUILAR, L. A.; CÁRDENAS-FLORES, A.; IBARRA-JIMÉNEZ, L.; MÉNDEZARGUELLO, B.; VERA-REYES, I.; LIRA-SALDIVAR, R. H. Photosynthesis, growth and yield of *Solanum lycopersicum* as influenced by the use of microbial biofertilizers. **AGROCHIMICA**, v. 61, n. 2, p. 95-109, 2017.

HUSSAIN, I.; ASSIS, A.M.; YAMAMOTO, L.Y.; KOYAMA, R.; ROBERTO, S.R. Indole butyric acid and substrates influence on multiplication of blackberry 'Xavante'. **Ciência Rural**, n. 44, p. 1761–1765, 2014.

ISMAINI, L.; DESTRI, D.; SURYA, M. I. Micropropagation of *Rubus chrysophyllus* Reinw. ex Miq. and *Rubus fraxinifolius* Poir. **Journal of Tropical Life Science**, v. 7, n. 1, p. 72-76, 2017.

JORDÃO, J. B. R.; PORTO, H. K. P.; LOPES, F. M.; BATISTA, A.C.; ROCHA, M. L. Protective effects of ellagic acid on cardiovascular injuries caused by hypertension in rats. **Planta Medica**, Stuttgart, v.2, 2017.

KAPOOR, R.; CHAUDARY, V.; BHATNAGAR, A.K. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. **Mycorrhiza**, v. 17, n. 1, p. 581-587, 2007.

KOSE, C.; ERDAL, S.; KAYA, O.; ATICI, O. Comparative evaluation of oxidative enzyme activities during adventitious rooting in the cuttings of grapevine rootstocks. **Journal Science Food Agriculture**, v. 91, p. 738-741, 2011.

KRISHNAMOORTHY, R.; KIM, K.; SUBRAMANIAN, P.; SENTHILKUMAR, M.; ANANDHAM, R.; SA, T. Arbuscular mycorrhizal fungi and associated bacteria isolated from salt-affected soil enhances the tolerance of maize to salinity in coastal reclamation soil. **Agriculture, Ecosystems, Environment**, v. 231, n.1, p. 233- 239, 2016.

LARRABURU, E. E.; LLORENTE, B. E. *Azospirillum brasilense* enhances in vitro rhizogenesis of *Handroanthus impetiginosus* (pink lapacho) in different culture media. **Annals of Forest Science**, v.72, p.219–229, 2015.

Larraburu, E. E.; Bususovich, A. C.; & Llorente, B. E. *Azospirillum brasilense* improves in vitro and ex vitro rooting-acclimatization of jojoba. **Scientia Horticulturae**, 209, 139-147, 2016.

LEBEDEV, V.; ARKAEV, M.; DREMOVA, M.; POZDNIAKOV, I.; SHESTIBRATOV, K. Effects of growth regulators and gelling agents on ex vitro rooting of raspberry. **Plants**, v. 8, n. 1, p. 3, 2019.

LEE, E. H.; EO, J. K.; KA, K. H.; EOM, A. H. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their roles in ecosystems. **Mycobiology**, v. 41, n. 3, p. 121-125, 2013.

LEVY, A.; MERRITT, A. J.; MAYO, M. J.; CHANG, B. J.; ABBOTT, L. K.; INGLIS, T. J.J. Association between *Burkholderia* species and arbuscular mycorrhizal fungus spores in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1757- 1759, 2009.

LIMA, D. M.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; BONA, C.; MAYER, J. L. S. Capacidade de enraizamento de estacas de *Maytenus muelleri* Schwacke com a aplicação de ácido indol butírico relacionada aos aspectos anatômicos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 4, p. 422-438, 2011.

MAIA, A. J.; BOTELHO, R. V. Reguladores vegetais no enraizamento de estacas lenhosas da amoreira-preta cv. Xavante. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 323-330, 2008

MAHESHWARI, D. K. (Ed.). **Bacteria in agrobiolgy: plant growth responses**. Berlin: Springer, 2011. 370 p

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

MARIOSIA, DE N. T.; MELLONI, E. G. P.; MELLONI, R.; FERREIRA, G. M. DOS R.; SOUZA, S. M. P. DE; SILVA, L. F. D. O. DA. Rizobactérias e desenvolvimento de mudas a partir de estacas semilenhosas de oliveira. **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 60, n. 4, p. 302-306, 2017.

MOLLAVALI, M.; BOLANDNAZAR, S. A.; SCHWARZ, D.; ROHN, S.; RIEHLE, P.; ZAARE NAHANDI, F. Flavonol glucoside and antioxidant enzyme biosynthesis affected by mycorrhizal fungi in various cultivars of onion (*Allium cepa* L.). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 6, n. 1, p. 71-77, 2016.

MONCADA, U. A. P.; GOMEZ, M. M. R.; NARVÁEZ, Y. A. Z.; SÁNCHEZ, I. M. C. Efecto de la inoculación simple y combinada con Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular (HFMA) y Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV) en plántulas micropropagadas de mora (*Rubus glaucus* L.). **Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 16, n. 1, p. 95, 2015.

MONTES-CRUZ, S.; LALAMA-AGUIRRE, J.; ECHEVERRÍA-FÉLIX, J. M.; SALAZAR-TORRES, S. M. Factores bióticos y abióticos que influyen em la aclimatación de lãs vitroplantas em invernadero. **Dominio de las Ciencias**, v. 2, n. 1, p. 63-89, 2016.

MOREIRA, A. L. D. L.; ARAÚJO, F. F. D. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* spp. como potenciais promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. **Revista Árvore**, v. 37, n. 5, p. 933-943, 2013.

MOUTIA, J. F. Y.; SAUMTALLY, S.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1-2, p. 233-242, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, 437-496, 1962.

NTENGNA, Y. F.; TCHAMENI, N. S.; FOKOM, R.; SAMEZA, M. L.; MINYAKA, E.; NGONKEU, M. E. L.; NWAGA, D. Effects of arbuscular mycorrhiza fungi on stimulation of nutrient content and induction of biochemical defense response in *Xanthosoma sagittifolium* plants against root rot disease caused by *Pythium myriotylum*. **International Journal of Advance Agricultural Research**, p.98-107, 2019.

OVANDO-MEDINA, I.; ADRIANO-ANAYA, L.; CHAVEZ-AGUILAR, A.; OLIVALLAVEN, A.; AYORA-TALAVERA, T.; DENDOOVEN, L.; GUTIÉRREZ-MICELI, F.; SALVADOR-FIGUEROA, M. Ex vitro survival and early growth of *Alpinia*

purpurata plantlets inoculated with *Azotobacter* and *Azospirillum*. **Pakistan Journal Biological Sciences**, v. 10, n. 19, p. 3454-3457, 2007.

PÁDUA, M.S.S.; PAIVA, L.V.; DA SILVA, L.G.T.; SILVA, L.C; STEIN, V.C. In vitro development and acclimatization of dendezeiro (*Elaeis guineensis*). **Revista Árvore**, v. 38, n. 6, p. 1095-1102, 2014.

PAGANO, M.C. **Recent Advances on Mycorrhizal Fungi, Fungal Biology**. Springer International Publishing Switzerland. 2016. p. 148.

PEDRINHO, E. A. N.; GALDINO JÚNIOR, R. F.; CAMPANHARO, J. C.; ALVES, J. M. C. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 905–911, 2010.

PERRIG, D.; RUIZ, O. A.; MASCIARELLI, O.; CASSAN, F.D. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 5, p. 1143–1150, 2007.

R CORE TEAM. R: **A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2018.

RASEIRA, M. do C. B.; FRANZON, R. C. Melhoramento genético e cultivares de amora-preta e mirtilo. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 33, n. 268, p. 11-20, maio/jun. 2012.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 728p.

RODRIGUES, P. H. V.; TEIXEIRA, F. M.; LIMA, A. M. L. P.; AMBROSANO, G. M. B.; Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. **Bragantia**, v. 65, n.1, p. 29-35, 2006.

ROVEDA, G.; CABRA, L.; RAMÍREZ, M. M.; PEÑARANDA, A. Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la aclimatación y endurecimiento de microplántulas de mora (*Rubus glaucus*). **Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, n. 8, v. 1, p. 28-36, 2007.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. D. S.; SILVEIRA, A. P. D. D. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 11, p. 1593-1600, 2007.

SAMARÃO, S. S.; RODRIGUES, L. A.; MARTINS, M. A.; MANHÃES, T. N.; ALVIM, L. A. M. Desempenho de mudas de gravioleira inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares em solo não-esterilizado, com diferentes doses de fósforo. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 1, p. 81-88, 2011.

SANGWAN, N. S.; A. H. A. FAROOQI, F. SHABIH, AND R. S. SANGWAN. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 1, p. 3–21, 2001.

SAXENA, J. S.; CHANDRA, S.; NAIN, L. Synergistic effect of phosphate solubilizing rhizobacteria and arbuscular mycorrhiza on growth and yield of wheat plants. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 13, n. 2, p. 511-525, 2013.

SHARMA, I. P.; SHARMA, A. K. Physiological and biochemical changes in tomato cultivar PT-3 with dual inoculation of mycorrhiza and PGPR against root-knot nematode. **Symbiosis**, v. 71, n. 3, p. 175-183, 2017.

SHIN, K.; PARK, S.Y.; PAEK, K. Sugar metabolism, photosynthesis, and growth of in vitro plantlets of *Doritaenopsis* under controlled microenvironmental conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 49, n. 4, p. 445-454, 2013.

SILVA, A. B. da; MELLO, M. R. F. de; SENA, A. R. de; LIMA FILHO, R. M.; LEITE, T. C. C. Efeito do extrato de *Cyperus rotundus* L. no enraizamento de estacas de amoreira preta. **Revista CIENTEC**, Recife, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2016.

SIQUEIRA, J.O; SOUZA, F. A.; CARDOSO, E. J.B.N.; TSAI, S. M. **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. Lavras: Editora UFLA, 2010. 716 p.

SKONIESKI, F. R. **Inoculação de *Azospirillum brasilense* e doses de nitrogênio em milho para produção de silagem e grãos**. 2015, 93 p. Tese (Doutorado) – Universidade de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

SOARES, A. C. F.; SOUSA, C. D. S.; GARRIDO, M. D. S.; & LIMA, F. D. S. Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e nutrição de mudas de jenipapeiro. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, n. 1, p. 47-54, 2012.

STRIK, B. C.; CLARK, J. R.; FINN, C. E.; BAÑADO, M. P. Worldwide blackberry production. **HortTechnology**, Alexandria, v. 17, n. 2, p. 205-213, 2007.

Souza, A. V.; Pereira, A. Enraizamento de plantas cultivadas in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 103-116, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. (Ed). **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, 888 p.

TEJAVATHI, D. H.; ANITHA, P.; MURTHY, S. M.; NIJAGUNAIAH, R. Effect of AM fungal association with normal and micropropagated plants of *Andrographis paniculata* Nees on biomass, primary and secondary metabolites. **International Research Journal of Plant Science**, v. 2, n. 12, p. 338-348, 2011.

TOOGOOD, A. **Enciclopédia de la propagación de plantas**. Barcelona: Blume, 2007. 320 p.

TULLIO, L.; AYUB, R. A. Produção de amora-preta c.v. tupy, em função da intensidade da poda. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n.3, p. 1147-1152, 2013.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, Poland, v. 13, p. 43–50, 1991.

VENKATESAN, S.; SUDHAGAR, R. Effect of potting media and *Azospirillum* on the rooting of *Gymnema sylvestre* cuttings. **Asian Journal of Horticulture**, v. 5; n. 2, p. 260-262, 2010.

VETTORI, L.; RUSSO, A.; FELICI, C.; FIASCHI, G.; MORINI, S.; TOFFANIN, A. Improving micropropagation: effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on acclimatization of rootstocks of fruit tree. **Journal of Plant Interactions**, v. 5, n. 4, p. 249-259, 2010.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; ASSIS, F. A. de; PIO, L. A. S.; ASSIS, G. A. de. Crescimento in vitro de amoreira-preta: efeito de reguladores de crescimento e da cultivar. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32. n. 6, p. 1754-1759, 2008

VOS, C.; VAN DEN BROUCKE, D.; LOMBI, F. M.; DE WAELE, D.; ELSEN, A. Mycorrhiza-induced resistance in banana acts on nematode host location and penetration. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 47, p. 60–66, 2012.

WAGNER JÚNIOR, A.; FRANZON, R. C.; COUTO, M.; CONEÇÃO, P. C.; FORTES, G. R. DE L. Levels of vermiculite substrate mixture in the acclimatization of Tupy blackberry plants. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.18 n.2-4, p.188-195, 2012.

WOZNY, A.; MILER, N. LEDs application in *ex vitro* rooting and acclimatization of chrysanthemum (*Chrysanthemum x grandiflorum*/Ramat./Kitam). **Electron. J. Pol. Agric. Univ.**; v. 19, n. 1, p 1–8, 2016.

WU, Q. S.; ZOU, Y. N.; WANG, G. Y. Arbuscular mycorrhizal fungi and acclimatization of micropropagated citrus. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 42, n. 15, p. 1825-1832, 2011.

YADAV, K.; AGGARWAL, A.; SINGH, N. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) induced acclimatization, growth enhancement and colchicine content of micropropagated *Gloriosa superba* L. plantlets. **Industrial crops and products**, v. 45, n. 1, p. 88-93, 2013.

YANG, Y.; HAN, X.; LIANG, Y.; GHOSH, A.; CHEN, J.; TANG, M. The combined effects of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and lead (Pb) stress on Pb accumulation, plant growth parameters, photosynthesis, and antioxidant enzymes in *Robinia pseudoacacia* L. **PloS One**, v. 10, n. 12, 2015.

ZHU, X. C.; SONG, F. B.; LIU, S. Q.; LIU, T. D.; ZHOU, X. Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. **Plant, Soil and Environment**, v. 58, n. 4, p. 186-191, 2012.