

Fungos micorrízicos-arbusculares no desenvolvimento de mudas de helicônia e gérbera micropropagadas.

Aurora Yoshiko Sato¹; Dulcimara de Carvalho Nannetti²; José Eduardo Brasil Pereira Pinto³; José Oswaldo Siqueira⁴; Maria de Fátima Arrigoni Blank⁵

¹UFV, 36571-000 Viçosa - MG; ^{2,3,4,5}UFLA, CP.37, 37200-000 Lavras-MG

RESUMO

Plântulas micropropagadas de helicônia (*Heliconia* sp.) gérbera (*Gerbera* sp.) de vaso, foram aclimatadas em substrato (torta de filtro 50%, solo 30% e areia 20%), inoculado com três espécies de fungo micorrízico (*Glomus clarum* Nicolson. & Schenck, *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann e *Gigaspora margarita* Becker & Hall) e uma mistura destas espécies (inóculo múltiplo). As avaliações quanto ao desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular e porcentagem de colonização, foram feitas aos 60 dias para gérbera e aos 90 dias para helicônia, após transplante. As duas espécies comportaram-se de modo diferente em resposta à micorrização. *Glomus etunicatum* não colonizou bem nenhuma das duas espécies estudadas. Apesar da elevada colonização, a helicônia não se beneficiou da inoculação, enquanto que a gérbera beneficiou-se da inoculação com *G. clarum*, *G. etunicatum* e do inóculo misto.

Palavras-chave: *Heliconia* sp., *Gerbera* sp., micropropagação, aclimação, micorrizas.

ABSTRACT

Application of arbuscular mycorrhiza to micropropagated heliconia and gerbera plants during acclimatization period.

Heliconia (*Heliconia* sp.) and pot gerbera plantlets (*Gerbera* sp.) obtained by in vitro micropropagation on Murashige and Skoog (MS) medium were inoculated with 3 vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) species and a mixture of three species. A control treatment without inoculation was also included. The plantlets were acclimated in a mixture of soil 30%, sand 20% and "torta de filtro" 50%. The fungal species were *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum* and *Gigaspora margarita*. At 60 days for gerbera and 90 days for heliconia after the inoculation, fresh and dry matter of the aerial and root parts were determined, and the percentage of mycorrhizal colonization of the roots was obtained. Both species behaved different to mycorrhization. *Glomus etunicatum* did not show to be effective in colonization of heliconia and gerbera. Colonization was high, but heliconia did not benefit from this inoculation, however Gerbera was benefited by *G. clarum*, *G. etunicatum* and mixture inoculation.

Keywords: *Heliconia* sp., *Gerbera* sp., micropropagation, acclimatization, mycorrhizas.

(Aceito para publicação em 05 de novembro de 1998)

A floricultura apresenta-se como uma das formas mais especializadas da agricultura, pois exige alta tecnologia, um sistema eficiente e rápido de distribuição e comercialização de seus produtos. Esta atividade apresenta alta rentabilidade por área, exige grande quantidade de mão-de-obra, sendo portanto importante fonte de geração de empregos. Por esta razão, a floricultura é uma opção de fixação de mão-de-obra e de aproveitamento dos minifúndios, considerados impróprios para certas atividades agropecuárias (Saturnino, 1979).

Dentre as inúmeras espécies vegetais de interesse da floricultura, destacam-se a helicônia (*Heliconia* sp., Heliconiaceae) e a gérbera (*Gerbera* sp., Compositae). A helicônia é uma planta tropical, originária da América Central e América do Sul, mas é encontrada também na Ásia e na Índia Ocidental (Keng, 1978; Donselman & Broschat, 1986), sendo denominada popularmente por

bananeira-de-jardim, bananeirinha-de-jardim, pacová, bananeira-do-brejo, bananeira-do-mato, bananeira-brava, caeté, pacavira e falsa ave-do-paraíso (Medina, 1959; Correa, 1984). As gérberas cultivadas atualmente, são híbridas de *Gerbera jamesonii* e *Gerbera viridis* com 50 espécies originárias da África e Ásia (Barbosa, 1991). Estas ornamentais tem grande expressão na Europa onde os maiores produtores, Holanda, França e Itália, perfazem 62% do total da produção do Oeste Europeu.

A propagação destas duas espécies para fins comerciais, é feita vegetativamente, o que favorece a disseminação de doenças através de gerações sucessivas e propagação clonal. Deste modo, a cultura de tecidos tem sido utilizada como um meio rápido de multiplicação na indústria da horticultura ornamental, possibilitando a produção de propágulos livres de doenças que podem ser facilmente disseminadas (Chu,

1985). O sucesso do sistema de micropropagação depende da eficiência da transferência de plantas regeneradas através da cultura de tecidos para a casa-de-vegetação. Grande número de plantas micropropagadas não sobrevive quando transferido de condições in vitro para as condições ambientais da casa-de-vegetação ou campo, o que contribui para a baixa eficiência do processo. Baixa umidade relativa, alta luminosidade, ambiente não asséptico, são condições inadequadas para plantas micropropagadas, que sofrem um grande estresse quando aclimatadas (Preece & Sutter, 1991).

Uma das possibilidades para aumentar a sobrevivência de plantas micropropagadas é a utilização de fungos micorrízicos arbusculares, que melhoram a adaptação das plântulas no período de aclimação através de diversos mecanismos (Huiming *et al.*, 1993; Lovato *et al.*, 1996). O efeito mais co-

nhecido das micorrizas é o aumento do crescimento devido à melhoria na absorção de diversos nutrientes. O fósforo é o nutriente que tem sido estudado mais extensivamente, devido à sua importância na nutrição de plantas e à confiabilidade dos métodos para estudar sua dinâmica no solo e na planta.

As plantas absorvem e utilizam mais eficientemente o fósforo do solo, podendo as adubações serem reduzidas quando se faz a inoculação de plântulas micropropagadas, com fungos micorrízicos (Lovato *et al.*, 1996).

Neste trabalho verificou-se o efeito de alguns fungos micorrízico - arbusculares (FMAs) na aclimação de plântulas micropropagadas de helicônia e gérbera de vaso.

MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas de helicônia (*Heliconia* sp.) e gérbera de vaso (*Gerbera* sp., Clones 800X), foram obtidas através da cultura de ápices caulinares, em meio de cultura contendo sais minerais de Murashige & Skoog (1962) acrescidos de 6g/L de agar (agar-agar DAB-6 Merck), 3% de sacarose, suplementado com 2,0 mg/L de BAP (Benzilaminopurina) e 0,5 mg/L de AIA (Ácido indol acético), pH 5,7 ± 0,1, e incubadas em sala de crescimento à temperatura de 26 ± 1°C e 2.000 lux de luminosidade com luz fluorescente branca fria, por um período de aproximadamente 30 dias.

As plântulas obtidas *in vitro* foram homogeneizadas pelo tamanho aproximado de 50 mm, aos 30 dias de idade,

transplantadas para bandejas de isopor com 72 células contendo substrato composto por 50% de torta de filtro, 30% de solo Latossolo distrófico, proveniente de mata nativa do Campus da UFLA e 20% de areia, esterilizado com brometo de metila por dois dias, infestado ou não com propágulos de FMAs as quais não sofreram nenhum tratamento com fungicidas antes de serem transplantadas.

A inoculação foi feita no momento do transplante, com o auxílio de pipetas volumétricas, utilizando-se 5 ml de suspensão de esporos, obtidas segundo o método do peneiramento úmido de Gerdemann & Nicolson (1983). Aplicou-se por planta em média 95 esporos de três espécies de fungos FMAs: *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum*, *Gigaspora margarita*. Incluindo ainda um tratamento múltiplo (mistura dos três fungos) e o controle não inoculado. A utilização destas espécies de fungos micorrízicos, deve-se a uma maior eficiência de inoculação e uma resposta mais ampla nas espécies vegetais.

Após a inoculação, as plântulas foram levadas para casa-de-vegetação à temperatura de 26 ± 1°C e umidade relativa em torno de 90%, sob sombrite (60%), a fim de favorecer a aclimação.

O ensaio foi em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições para gérbera e cinco plantas por parcela, e seis repetições para helicônia com seis plantas por parcela.

Os parâmetros avaliados foram: comprimento da parte aérea e de raízes, peso da matéria fresca e seca da parte aérea e das raízes (secas em estufa à temperatura de cerca de 60°C até alcançarem peso constante), teor de fósforo (P) na parte aérea. A porcentagem de colonização micorrízica das raízes foi feita, retirando as raízes mais novas e tenras, lavando-as para retirada de solo e restos de matéria orgânica. Pesou-se 1 g

de matéria fresca (PMF) e seca (PMS), comprimento da parte aérea e da raiz, número de folhas e porcentagem de colonização de plantas de helicônia micropropagadas em função dos fungos *Gigaspora margarita*, *Glomus clarum*, *G. etunicatum* e inóculo múltiplo - mistura dos três, 90 dias após transplante, Lavras-MG, UFLA 1994.

Tabela 1. Peso de matéria fresca (PMF) e seca (PMS), comprimento da parte aérea e da raiz, número de folhas e porcentagem de colonização de plantas de helicônia micropropagadas em função dos fungos *Gigaspora margarita*, *Glomus clarum*, *G. etunicatum* e inóculo múltiplo - mistura dos três, 90 dias após transplante, Lavras-MG, UFLA 1994.

FMA	Colonização (%)		Nº Folhas	Comprimento (mm)		Sist. Radicular (mg) PMS
				Raiz		
Testemunha	0,0	c ¹	6,31ab	149,7ab		125ab
<i>G. clarum</i>	40,36ab		5,68 bc	139,3ab		125ab
<i>G. etunicatum</i>	28,71	b	6,47a	126,0 b		108 b
<i>G. margarita</i>	55,95a		5,19 c	179,9a		173a
Inóculo múltiplo	46,95a		5,18 c	134,2ab		104 b

¹Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

Tabela 2. Peso de matérias fresca (PMF) e seca (PMS), comprimento da parte aérea e da raiz, número de folhas e porcentagem de colonização de gérbera de vaso Clone 800X em função dos fungos *Gigaspora margarita*, *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum* e inóculo múltiplo - mistura dos três, 60 dias após o transplante, Lavras-MG, UFLA 1994.

FMA	Colonização (%)		Nº Folhas	Comprimento(mm)		Parte Aérea(mg)		Sist. Radicular(mg) PMF
				P.Aérea	PMF	PMS		
Testemunha	0,0	d ¹	7,38 c	51,3 b	480 b	70 c	56 b	
<i>G. clarum</i>	27,97	b	10,59abc	77,8a	1720 a	196 b	94 ab	
<i>G. etunicatum</i>	16,84	c	12,59ab	80,0a	1770 a	214 ab	98 ab	
<i>G. margarita</i>	31,29ab		8,89 bc	53,0 b	790 b	107 c	57 b	
Inóculo múltiplo	40,47a		13,67a	85,6a	2430 a	271 a	118 a	

¹Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

de raízes limpas que foram colocadas em cápsulas plásticas e identificadas. As cápsulas, em becker contendo KOH 10%, foram aquecidas a 90°C em capela por 1 hora, ou autoclavadas (15 PSI) por 10 minutos. Drenou-se o KOH e lavou-se com água a cápsula com o material. Em seguida colocou-se água acidificada (HCl 1%) e agitou-se por 3 a 4 minutos. Derramou-se o HCl e aplicou-se o corante (Tripán blue em lactofenol 0,05%). Aqueceu-se (90°C) em capela, por 10 a 60 minutos, ou autoclavou-se (15 PSI) por 10 minutos. Transferiu-se o material da cápsula plástica para placa de Petri, e observou-se as raízes coradas em microscópio estereoscópico (ampliação de 10 e 40 x) para a avaliação da porcentagem de colonização (Giovannetti & Mosse, 1980). As avaliações foram feitas aos 60 dias para gérbera e aos 90 dias para helicônia após transplante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar da elevada colonização micorrizica, as plântulas de helicônia não se beneficiaram da inoculação enquanto que gérbera foi beneficiada com a inoculação de *G. clarum*, *G. etunicatum* e inóculo misto (Tabela 1 e 2). Para as plantas de helicônia não houve diferença significativa no peso de matéria fresca da parte aérea e de raiz, bem como no ganho de matéria seca da parte aérea. O peso da matéria seca da parte aérea de gérbera foi influenciado pela micorrização. O tratamento com inóculo múltiplo aumentou a produção de matéria seca em 387% quando comparado com a testemunha. Segundo Abbott & Robson (1981), o crescimento e peso da matéria seca da parte aérea do trevo está intimamente relacionado com a porcentagem de raízes colonizadas em cada estágio de desenvolvimento da planta. Para peso da matéria seca da raiz de gérbera não houve diferença significativa entre os tratamentos, entretanto, o inóculo múltiplo (166,0 mg) apresentou um ganho de 73%. Para o peso da matéria fresca de gérbera, da parte aérea e da raiz, observou-se diferença significativa entre os tratamentos.

Silva et al. (1991) testando *Acaulospora scrobiculata*, *G. margarita*,

Tabela 3. Teor médio de fósforo (P) obtidos na análise química foliar e relação peso de matéria seca da parte aérea/peso de matéria seca de raízes de helicônia e gérbera, Lavras-MG, UFLA 1994.

FMA	Helicônia		Gérbera	
	P (g.kg ⁻¹)	PMSPA/PMSR	P (g.kg ⁻¹)	PMSPA/PMSR
Testemunha	1,10	1,90	0,90	0,73
<i>G. clarum</i>	1,80	1,84	1,50	1,34
<i>G. etunicatum</i>	1,40	2,43	1,60	1,83
<i>G. margarita</i>	1,80	1,51	1,00	1,53
Inóculo múltiplo	1,80	2,31	1,80	1,63

G. clarum e *G. etunicatum* em plântulas de gérbera micropropagadas, obtiveram melhores resultados com *G. etunicatum* e *G. clarum* em peso de matéria fresca e seca da parte aérea. Enquanto neste trabalho, os melhores resultados foram obtidos com inóculo múltiplo. Trabalhando com um outro clone, denominado Clone II de gérbera, observou-se um ganho significativo em peso seco e fresco da parte aérea utilizando *G. clarum*, *G. etunicatum* ou *G. margarita* (dados não publicados). Esta especificidade também foi observada entre cultivares de morangueiro (Corsato *et al.*, 1993).

Em relação ao comprimento da parte aérea e de raízes, houve uma tendência para gérbera apresentar um maior ganho com fungos micorrizicos em relação à testemunha. Enquanto para helicônia não houve grande diferença com respeito a estes parâmetros.

A colonização de raízes por fungos FMA ocorreu em ambas as espécies. Para helicônia, as maiores porcentagens de colonização foram observadas nos tratamentos inoculados com *Gigaspora margarita* (55,95%), inóculo múltiplo (46,95%) e *G. clarum* (40,36%), para gérbera foram o inóculo múltiplo (40,47%) e *G. margarita* (31,29%), que mostraram maior efeito sem diferença significativa entre eles. Para as duas espécies vegetais, *G. etunicatum* foi o fungo FMA que causou menor porcentagem de colonização (28,71% - Helicônia e 16,84% - Gerbera). Através de montagem de lâminas de fragmentos de raízes dos tratamentos inoculados, foi possível observar grande número de células auxiliares, esporos vegetativos, arbusculos, vesículas e micélio externo e interno.

Segundo Janos (1983), embora não haja especificidade na formação de

micorrizas vesículo-arbusculares, pode existir uma certa habilidade discriminatória de espécies de fungos FMA por determinadas espécies de plantas. Todos os fungos FMA testados colonizaram helicônia e gérbera. Os benefícios da micorrização, observados neste trabalho, estão relacionados à melhoria da nutrição, especialmente por uma maior absorção de fósforo (Tabela 3), considerando as condições de baixa fertilidade do substrato utilizado. O aumento do crescimento das plantas, associado a maior absorção de fósforo devido aos FMA, tem sido demonstrado para diferentes espécies vegetais e condições de cultivo (Tinker, 1975), além de uma maior resistência ao estresse do ambiente e melhor absorção e utilização de água (Paula & Siqueira, 1987).

Segundo Silveira (1992), as micorrizas na maioria dos casos, estimulam o crescimento da planta, como consequência de seu efeito sobre a nutrição mineral de planta. A simbiose não aumenta a biomassa vegetal e nem a proporção parte aérea e raiz. O estímulo da captação de nutrientes e posterior translocação à parte aérea da planta reduz a transferência de fotoassimilados à raiz e sua maior retenção na parte aérea, sendo utilizado na produção de matéria verde. Dessa maneira, Silveira (1992) cita como consequência a relação peso da matéria seca da parte aérea/peso da matéria seca da raiz ser mais elevada em plantas micorrizadas, o que foi observado também em plantas de gérbera. A testemunha apresentou uma relação de 0,73 e as plantas micorrizadas apresentaram uma relação média de 1,58 (Tabela 3).

A micorrização possui grande potencial para a otimização da fase de

aclimação de plântulas obtidas in vitro. A diferença observada entre os parâmetros avaliados como o crescimento (PA/SR) de helicônia e gérbera, possivelmente, tenha ocorrido devido à especificidade das espécies de fungos FMA testadas. As duas espécies comportaram-se de modo diferente em resposta à micorrização. *Glomus etunicatum* não colonizou bem nenhuma das duas espécies estudadas. Apesar da elevada colonização, a helicônia não beneficiou-se da inoculação, enquanto a gérbera beneficiou-se da inoculação com *G. clarum*, *G. etunicatum* e do inóculo misto. Deve-se considerar a especificidade fungo-planta, o que pode explicar a baixa eficiência dos fungos testados nas duas espécies estudadas.

LITERATURA CITADA

- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. Infectivity and effectiveness of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi: effect of inoculum types. *Journal of Agriculture*, p. 631-639, 1981.
- BARBOSA, M.H.P. *Propagação in vitro de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook através de capitulos jovens*. ESAL Lavras, 1991. 48 p. (Tese mestrado).
- CHU, I.Y.E. The application of tissue culture to plant improvement and propagation in the ornamental horticulture industry. In: ZIMMERMAN, R.H.; GRIESBACH, R.J.; HAMMERSCHLAG, F.A.; LAWSON, R.H. *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p. 15-135.
- CORREA, P.M. *Dicionário das plantas úteis e exóticas do Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério / Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal / Imprensa Nacional, 1984. v. 1, p. 253-256.
- CORSATO, C.E.; ROMANI, V.L.M.; OLIVEIRA, E.T.; CROCOMO, O.J. Aclimação de plantas de morangueiro micropropagadas utilizando-se fungos endomicorrizicos. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, Brasília, 1993. *Programa e Resumos...*, Brasília: EMBRAPA, 1993. p. 160.
- DONSELMAN, H.; BROSCHE, T.K. Production of *Heliconia psittacorum* for cut flowers in South Florida. Fort Landerdale Res. Educ. Ctr. Ornamental Ornamentals Res. Rpt., EUA, p. 86-91, 1986.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogene species extracted from soil by sieving and decanting. *Transactions British Mycological Society*, London, v. 46, p. 235-246, 1983.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytology*, v. 84, p. 489-500, 1980.
- HUIMING, W.; PARENT, S.; DUVAL, A.; GOSELIN, A.; DESJARDINS, Y. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza (VAM) on micropropagated gerbera, fern and miniature rose plantlets. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 9, Ontario, 1993. *Abstracts...*, Ontario, 1993.
- JANOS, D.P. Tropical mycorrhizas, nutrient cycles and plant growth. In: SUTTON, S.L.; WHITEMORE, T.C.; CHADWICK, A.C. (eds.) *Tropical rain forest: ecology and management*. Oxford: Blackwell, 1983. p. 327-345.
- KENG, H. *Orders and families of Malayan seed plants*. Singapore: Singapore University Press, 1978. 97 p.
- KRUCKELMANN, H.W. Effects of fertilizers, soils, soil tillage, and plant species on the frequency of endogene chlamydozoospores and mycorrhizal infection in arable soils. In SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B. *Endomycorrhizas*. London: Academic Press, 1975. p. 511-525.
- LOPES, E.S.; SIQUEIRA, J.O.; ZAMBOLIM, L. Caracterização das micorrizas vesicular-arbusculares (MVA) e seus efeitos no crescimento das plantas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v. 7, p. 1-19, 1983.
- LOVATO, P.E.; TROUVELOT, A.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Micorrização de plantas micropropagadas. In: SIQUEIRA, J.O. (ed.) *Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas*. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1996. p. 175-201.
- MEDINA, J.C. *Plantas fibrosas da flora mundial*. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 1959. p. 356-359.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth an bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Madison, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O. Efeitos da umidade do solo sobre a simbiose endomicorrizica em soja. II. Crescimento, nutrição e relação água-planta. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v. 11, p. 289-293, 1987.
- PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Aclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. *Micropropagation: technology and application*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 71-93.
- SATURNINO, H.M. A floricultura no Brasil. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 1, Viçosa, 1979. *Primeiro...* Viçosa: UFV, 1979. p. 11-18.
- SILVA, L.R.C.; ARELLO, E.F.; SILVA, M.A. Efeito de fungos micorrizicos vesiculo-arbusculares sobre o desenvolvimento de mudas micropropagadas de Gerbera jamesonii. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 4, Mendes, 1991. *Anais...* Mendes: CNPDS/UFRRJ, 1991. p. 151.
- SILVEIRA, A.P. Micorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (eds.) *Microbiologia do solo*. Campinas: SBSC, 1992. p. 257-282.
- TINKER, P.B. Soil chemistry of phosphorus effect on plant growth. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B. (eds.) *Endomycorrhizas*. London: Academic Press, 1975. p. 353-371.