

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

CULTIVO *in vitro* DE RAÍZES DE TOMATEIRO, MENTA E VIDEIRA PARA
PRODUÇÃO DE INÓCULO DE FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR

Precila Zambotto Lopes
Eng^a Agrônoma (CEFET-PR/Unidade de Pato Branco)

Dissertação apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Fitossanidade

Porto Alegre (RS), Brasil
Setembro de 2003

“Não há nada mais difícil de manejar, mais perigoso de conduzir ou mais incerto de suceder do que levar adiante a introdução de uma nova ordem de coisas, pois a inovação tem por inimigos todos os que se deram bem nas condições antigas, e por defensores frágeis todos aqueles que talvez possam se dar bem nas novas.” (Maquiavel, O príncipe, 1532).

AGRADECIMENTOS

Muito agradeço,

A Deus, mais importante que o lugar que ocupas em mim é a intensidade de sua presença em tudo o que faço.

A meus pais, João Batista Lopes e Alderina Zambotto Lopes, e a meus irmãos Júnior, Estefânia e Evandro, pelo amor e apoio que tanto me tem dirigido ao longo da vida, especialmente, pelo exemplo na perseverança pelo aprimoramento do intelecto.

Ao professor Paulo Vitor Dutra de Souza, pela amizade, por sua orientação, seu apoio e sua contribuição na realização e conclusão deste trabalho.

Ao professor Fábio Kessler Dal Soglio, pela amizade, paciência, apoio e especial contribuição na realização deste trabalho e, principalmente pela co-orientação; por acreditar que sempre é possível melhorar nosso potencial quando definimos as metas de estudo a serem alcançadas, mesmo no pouco tempo de trabalho em conjunto; e pelas risadas que me fizeram descontraír nos momentos de dificuldade no decorrer deste trabalho.

A Adriane Leite do Amaral, pelo apoio incondicional, pela amizade que me tem dedicado, pelo auxílio a esclarecer dúvidas e resolver problemas estatísticos deste trabalho. Além de transmitir confiança, carinho, por nunca duvidar que conseguiria vencer todos os obstáculos, que, de certa forma, a mim foram impostos. E por ser mãe da Sofia, uma criança que com seu jeitinho angelical me fez rir nos momentos de lazer.

Agradeço a Sirlei Ferreira Reis, pela amizade, carinho e, principalmente pela ajuda na construção da estrutura emocional necessária para a realização deste trabalho.

Ao amigo Sandro Souza Focchi, pela amizade e atenção, auxiliando na solução de dúvidas estatísticas.

Aos amigos César Prestes, Edgar Carniel, Jéssica Schmidt, Márcia Silva Barbosa, Jussara Medeiros, Celson Weiler, Cristian André Padre e Nestor Valtir Panzenhagen, pela amizade, apoio. De uma forma ou de outra, todos colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho partilhando seus conhecimentos e experiências.

Ao CNPq pela concessão da Bolsa de Mestrado, a qual tornou viável minha pós-graduação.

Pela grande demonstração de carinho, amor, paciência, amizade e cumplicidade, abdicando de nossa convivência, por apoiar minha formação e por sempre acreditar que eu conseguiria, meu grande amor Eduardo Alberto Cardoso.

CULTIVO *in vitro* DE RAÍZES DE TOMATEIRO, MENTA E Videira PARA PRODUÇÃO DE INÓCULO DE FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR ^{1/}

Autora: Precila Zambotto Lopes
Orientador: Paulo Vitor Dutra de Souza
Co-orientador: Fábio Kessler Dal Soglio

RESUMO

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) desempenham um papel importante na sustentabilidade dos ecossistemas, devido a importância da simbiose que formam com a maioria das plantas. A associação destes fungos com as raízes possibilita uma melhor nutrição das plantas, além de promover o crescimento e a resistência a fatores causadores de estresse. Desta forma, auxiliam no aumento da produtividade das mesmas, e na redução do uso de insumos químicos, como fertilizantes e agrotóxicos, na agricultura. Em função ao caráter de simbioses obrigatórios, é de grande interesse o desenvolvimento de processos que permitam o isolamento, caracterização, manutenção de isolados e produção de inóculo desses fungos. Assim, com o objetivo de produzir um método de cultivo axênico, e que também possa auxiliar o estudo destes em áreas como a biologia molecular, testou-se protocolos de micropropagação para a produção *in vitro* de *Glomus etunicatum* W. N. Becker & Gerd., utilizando-se como hospedeiro raízes de tomateiro, videira e menta. Além destas culturas, que foram propagadas vegetativamente para a manutenção das culturas estoques e enraizadas *in vitro* com a aplicação exógena do regulador de crescimento ácido indolbutírico (AIB), trabalhou-se também com a cultura da menta, mas devido a problemas que ocorreram durante a etapa de enraizamento, não foi possível efetivar a associação do inóculo. Na inoculação de esporos em raízes da videira cultivadas *in vitro*, não se obteve êxito. Com o cultivo *in vitro* de raízes de tomateiro foi possível conduzir os trabalhos até a etapa de colonização do FMA. No enraizamento *in vitro* das três culturas trabalhadas foi avaliado o número e o comprimento médio das raízes cultivadas nos meios de enraizamento nas doses de 0, 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de AIB. Para o tomateiro e a menta, o número e o comprimento médio de raízes por explante foram significativamente maiores com a dose de 1,0 mg.L⁻¹ de AIB. Entretanto, para a cultura da videira, embora o uso de AIB, em ambas as doses de 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ induziram um maior número de raízes, o comprimento médio de raízes foi maior quando AIB não foi adicionado no meio de enraizamento.

^{1/}Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (68p.) Setembro, 2003.

***In vitro* ROOT CULTURE OF TOMATO, MINT AND GRAPEVINE FOR INOCULUM PRODUCTION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAE FUNGI^{1/}**

Author: Precila Zambotto Lopes
Adviser: Paulo Vitor Dutra de Souza
Co-adviser: Fábio Kessler Dal Soglio

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) play an important role in ecosystems sustainability, due to the importance of the symbiosis they form with plants. The association of these fungi with roots allows plants a better nutrition, besides the effect on growth promotion and the increase of resistance to stress factors. Thus, AMF help to increase plant productivity and to reduce the use of chemical inputs, such as fertilizers and pesticides, in the agriculture. Because AMF are obligate simbioses, it is important to develop methodologies that allow the isolation, characterization, isolates maintenance and inoculum production of these fungi. Hence, aiming to develop an axenic culture of AMF, which can also help studies on several research areas, such as molecular biology, a protocol for *in vitro* production of *Glomus etunicatum* W. N. Becker & Gerd. was developed, using *in vitro* grown roots of tomato and grapevine as hosts. These cultures were vegetatively propagated *in vitro* to maintain stock cultures, and *in vitro* root cultures were developed by exogenous application of indolbutiric acid (IBA). Besides of that, mint was also tried as a host, but due to several problems that occurred during the experimental phase of this project, it was not possible to inoculate *G. etunicatum* in mint roots cultured *in vitro*. The inoculation of *in vitro* grown roots of grapevine did not succeed. In the other hand, it was possible to observe root colonization by *G. etunicatum* at inoculated tomato roots cultures. The number and the length of roots was evaluated, for the *in vitro* root culture of mint, grapevine and tomato, with rooting medium with 0, 1,0 and 2,0 mg.L⁻¹ of IBA. For tomato and mint, the number of roots/explant and average root length were significantly higher when IBA dose was 1.0 mg.L⁻¹. However, for grapevine, although the use of IBA, in both 1.0 and 2.0 mg.L⁻¹ doses, induced a higher number of roots, the root length was higher when IBA was not added to the rooting medium.

^{1/}Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (68p.) September, 2003.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 Importância dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs).....	03
2.2 Classificação dos FMAs.....	06
2.3 Modo de ação dos FMAs.....	06
2.4 Utilização de FMAs em sistemas de produção de culturas hortícolas.....	08
2.5 Produção dos FMAs.....	12
2.6 Produção <i>in vitro</i> de FMAs.....	14
2.7 Enraizamento de plantas micropropagadas <i>in vitro</i>	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Localização do experimento.....	21
3.2 Meio de cultura para manutenção dos tecidos <i>in vitro</i>	21
3.3 Desinfestação de explantes.....	22
3.3.1 Tomateiro.....	22
3.3.2 Videira.....	22
3.3.3 Menta.....	23
3.4 Teste de enraizamento <i>in vitro</i> com a presença de regulador de crescimento..	23
3.5 Testes preliminares para a seleção de explantes.....	24
3.5.1 Explantes de tomateiro.....	24
3.5.2 Explantes de videira.....	24
3.5.3 Explantes de menta.....	25
3.6 Desenvolvimento de raízes de tomateiro, videira e menta <i>in vitro</i>	25
3.6.1 Tomateiro.....	26
3.6.2 Videira.....	26
3.6.3 Menta.....	27
3.7 Preparo do inóculo de <i>G. etunicatum</i>	27
3.7.1 Extração dos esporos de <i>G. etunicatum</i>	28
3.7.2 Desinfestação e germinação <i>in vitro</i> dos esporos de <i>G. etunicatum</i>	28
3.8 Inoculação e micorrização em raízes excisadas em meios diferentes.....	29
3.8.1 Avaliação da colonização radicular <i>in vitro</i> nos diferentes meios.....	30
3.9 Análise Estatística.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Resposta dos explantes das culturas ao maio de manutenção DSD1.....	33
4.2 Desinfestação dos explantes de tomate e de menta.....	36

4.3	Teste de enraizamento <i>in vitro</i> de videira com a presença de regulador de crescimento.....	37
4.4	Testes preliminares para a seleção de explantes das culturas de tomateiro, videira e menta.....	38
4.5	Desenvolvimento de raízes de tomateiro, videira e menta <i>in vitro</i>	39
4.6	Desinfestação e germinação <i>in vitro</i> dos esporos de <i>G. etunicatum</i>	47
4.7	Avaliação da colonização dos segmentos radiculares pelos esporos de <i>G. etunicatum</i> em meios diferentes.....	48
5.	CONCLUSÕES.....	51
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
7.	ANEXOS.....	57

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Valores médios de número e comprimento médio de raízes de explantes de tomateiro, Segmento Basal (SB) e Segmento Nodal (SN), nas diferentes doses de ácido indolbutírico (AIB).....	40
2. Valores médios de número e comprimento médio de raízes, nas diferentes doses de ácido indolbutírico (AIB) nos explantes de videira, Meia Folha com Pecíolo (MFP) e Segmento Basal com Raiz Primária (SBRP).....	43
3. Valores médios de número e comprimento médio de raízes de explantes de menta, Segmento Basal (SB) e Segmento Nodal (SN), nas diferentes doses de ácido indolbutírico (AIB).....	45

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Explante de videira, formado por dois segmentos basais com raiz primária em placa de Petri.....	39
2. Enraizamento de segmento basal de tomateiro na ausência de ácido indolbutírico.....	41
3. Enraizamento de segmento basal de tomateiro na presença de ácido indolbutírico.....	42
4. Explante de videira, meia folha com pecíolo, com incremento no número de raízes e a formação de calos em meio com presença de ácido indolbutírico.....	44
5. Explante de videira, meia folha com pecíolo, com a elongação de uma raiz em meio com ausência de ácido indolbutírico.....	44
6. Segmento nodal de menta com contaminação por microrganismo, principalmente bactéria.....	46
7. Formação de calos e raízes em segmento nodal de menta.....	46
8. Segmento de raiz de tomateiro, mostrando microscopicamente a penetração e colonização do córtex por hifas (h) do fungo micorrízico arbuscular (Aumento de 100x).....	49
9. Segmento radicular de tomateiro com a presença de uma rede de micélio externo (me) do fungo micorrízico arbuscular (Aumento de 16x).....	49

1. INTRODUÇÃO

Desde a origem da agricultura, esforços têm sido direcionados à seleção de plantas baseada em características do sistema caulinar, porém muitas das cultivares desenvolvidas apresentam deficiências importantes no sistema radicular (Peres & Kerbauy, 2000).

A possibilidade de se manipular o sistema radicular das plantas de forma a se conseguir um maior aproveitamento de nutrientes que são disponibilizados no solo e que muitas vezes o sistema radicular por si só não consegue capturá-los, é de grande importância para o desenvolvimento de plantas e isso pode ser obtido com o auxílio de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) que têm a capacidade de aumentar a área de absorção das raízes, possibilitando uma maior absorção de água e de nutrientes poucos móveis no solo.

Muitos são os benefícios proporcionados pela micorrização das raízes das plantas por FMAs nos ecossistemas, benefícios estes que são demonstrados principalmente no desenvolvimento, na nutrição e na sanidade das plantas (resistência a estresses bióticos e abióticos).

Além disso, o uso dos FMAs na agricultura é de grande importância nos países em desenvolvimento, onde os gastos com fertilizantes são proibitivos, o uso de áreas marginais é necessário e a sustentabilidade dos agroecossistemas é fundamental para garantir a segurança alimentar das futuras gerações (Cripps, 2001).

Portanto, fica evidente o interesse na produção em larga escala dos FMAs visando incorporá-los em um sistema hortícola de produção de plantas. O método tradicional de produção desses fungos se baseia, principalmente, no cultivo em vasos associados às raízes da cultura hospedeira.

Contudo, para a aplicação de uma fonte de inóculo eficiente e de qualidade em um sistema de produção de plantas é interessante o cultivo do FMA em condições axênicas. Tendo em vista que os FMAs são simbioses obrigatórios, sendo produzidos somente em raízes vivas, o presente trabalho teve por objetivo testar protocolos de micropropagação com a utilização do meio de cultura básico DSD1 para a obtenção de raízes *in vitro*, não transformadas, das culturas de tomateiro, de videira e de menta para seu posterior teste na produção de inóculo de FMA *Glomus etunicatum* em condições axênicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs)

As micorrizas são associações mutualísticas formadas por certos fungos do solo e as raízes da maioria das plantas vasculares, tanto selvagens como cultivadas e de importância agrícola (Ludwig-Müller et al., 1997). Em plantas micorrízicas de *Allium porrum* L., mudanças morfológicas foram observadas nas raízes adventícias, as quais tornaram-se mais numerosas e mais curtas do que as plantas não micorrizadas (Berta et al., 1990). Essa associação é normalmente considerada uma simbiose mutualística devido ao seu alto relacionamento de interdependência estabelecido entre ambos os associados, ou seja, a planta hospedeira recebe nutrientes minerais por via micélio fúngico (micotrofismo), enquanto o fungo (heterotrófico) obtém os compostos de carbono fotossintetizados via hospedeiro (Azcón-Aguilar & Barea, 1997; Raven et al., 2001). Raven et al. (2001) ressaltam que essa associação íntima, simbiótica, mutualística e benéfica, é a mais comum e, possivelmente, a mais importante no reino das plantas. Eles, também observaram que quando mudas de espécies florestais que crescem em solução nutritiva estéril na ausência de fungos micorrízicos e são logo em seguida transplantadas para solo de campo, elas se desenvolvem pobremente e podem, eventualmente, morrer por má nutrição. Mas se crescerem em solo de floresta na presença de fungos, antes de serem transplantadas, apresentam um melhor desenvolvimento radicular e de parte aérea.

Newsham et al. (1995) ressaltam que as raízes das plantas em ecossistemas naturais são tipicamente colonizadas por uma ampla gama de fungos; alguns desses são patogênicos, outros parecem ser oportunistas e não têm um impacto evidente, enquanto fungos micorrízicos são, em geral, considerados mutualistas. Entre os vários tipos de

fungos micorrízicos, a associação micorrízica arbuscular (FMA) é, consideravelmente, a mais abundante e difundida.

Hildebrandt et al. (2002) e Alexopoulos et al. (1996) citam que mais de 80% das raízes de plantas terrestres são colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), que são encontrados associados às raízes de angiospermas, gimnospermas, pteridófitas, briófitas, e até mesmo, algumas algas.

Para Cripps (2001), a relação entre os associados é considerada não patogênica e gera muitos benefícios para as plantas envolvidas. No caráter mutualístico podem ser agrupados vários tipos de micorrizas que diferem em estrutura, micobiontes (fungos), fotobiontes (planta), fisiologia, ecologia, distribuição e evolução. O estabelecimento, o crescimento e a sanidade das plantas são aumentados sob muitas condições com a formação micorrízica, para aumentar a absorção de nutrientes inorgânicos (NPK) e água, a micorrização fornece às plantas proteção contra seca, altas temperaturas do solo, acidificação, metais pesados, patógenos, nematóides, insetos e outros organismos do solo. As propriedades benéficas da micorrização têm sido exploradas para aplicações na agricultura, silvicultura, horticultura, revegetação e biocontrole. Ecologicamente as micorrizas são responsáveis pela ciclagem de nutrientes, absorção mineral e agregação do solo, e servem como um elo na teia alimentar e entre plantas. Para Lovato et al. (1996), os FMAs beneficiam os hospedeiros associados atuando como fitorreguladores, bioprotetores e biofertilizadores.

Na agricultura, o aumento da absorção de minerais do solo por meio de plantas colonizadas possibilita considerável redução nas aplicações de fertilizantes e pesticidas e, ao mesmo tempo, a obtenção do rendimento da cultura equivalente ou mesmo superior. Tendo-se um manejo apropriado da micorriza na agricultura é, também, possível a

manutenção da qualidade do solo e a sustentabilidade, enquanto se protege o ambiente a longo prazo e se reduzem os custos de produção (Dalpé & Building, 1997).

Burleigh & Jakobsen (2002) ressaltam que os fungos micorrízicos são componentes essenciais da interface planta/solo. Embora alguns destes fungos pareçam ser mais benéficos para seus hospedeiros do que outros, tem se sugerido que sem associações micorrízicas muitas plantas não são capazes de sobreviver em comunidades competitivas estabelecidas em habitats naturais do solo (Alexopoulos et al., 1996).

No Brasil, o primeiro trabalho documentado na micorrizologia foi realizado em 1970 pela Dra. Lílian Tomazini, da UNESP de Rio Claro em São Paulo. Os estudos sobre a ocorrência de fungos e condições micorrízicas das plantas abrangeram plantas invasoras, culturas anuais, forrageiras, espécies frutíferas e hortaliças, cafeeiro e florestas exóticas de pinos e eucaliptos, de várias regiões brasileiras, indicando a ocorrência generalizada dos fungos micorrízicos arbusculares (Berbara & Fonseca, 1996).

O desenvolvimento de novos métodos baseados na biologia da célula, e especialmente a biologia molecular, tem aumentado consideravelmente o conhecimento dos FMAs. As primeiras contribuições da biologia molecular com relação a esse assunto tem abordado tópicos mais relacionados à taxonomia, ecologia molecular e filogenia (Bonfante & Perotto, 1995).

2.2 Classificação dos FMAs

Segundo Siqueira et al. (2002) entre os sete tipos de micorrizas conhecidos, os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são formados por fungos da ordem *Glomales*. Embora tradicionalmente classificados na divisão *Zygomycota*, os FMAs apresentam divergências suficientes para formarem uma nova divisão com base na análise do RNA

ribossômico 18S. De acordo com Schübler et al. (2001), a divisão Glomeromycota foi proposta para abrigar os organismos formadores de MAs.

Segundo Declerck et al. (1998), os FMAs são microrganismos do solo que aparentemente podem produzir esporos e completar seu ciclo de vida apenas com a colonização de raízes hospedeiras, ou seja, durante seu ciclo de vida o fungo produz esporos, que germinam e formam um micélio vegetativo e quando entram em contato com a superfície de raízes hospedeiras produzem apressório. A taxonomia dos FMAs é baseada principalmente na estrutura e morfologia de seus esporos reprodutivos. Para Cripps (2001) a reprodução dos FMAs é assexuada por clamidosporos ou azigosporos anexados diretamente às hifas. Os esporos são multinucleados, contêm milhares de núcleos e, são heterocarióticos segundo evidências levantadas por Zezé et al. (1997) com a amplificação de DNA, com o uso de microssatélites, de culturas de único esporo.

2.3 Modo de ação dos FMAs

Segundo Alexopoulos et al. (1996), os FMAs não alteram significativamente a morfologia externa das raízes das plantas superiores a eles associadas e nem produzem um manto, nem uma rede de Hartig. A hifa, não septada, cresce entre e dentro das células corticais da raiz, penetrando a parede e causando invaginações na membrana plasmática. Observações morfológicas têm demonstrado que mudanças ocorrem com relação ao FMA durante o processo de infecção do tecido radicular, por exemplo, o arbúsculo (Bonfante & Perotto, 1995). As hifas produzem esse amontoado de estruturas altamente ramificadas como um haustório denominado assim de arbúsculo, e em alguns casos, produzem uma protuberância na sua região terminal chamada de vesícula. As vesículas são formadas tanto entre como dentro das paredes das células do tecido hospedeiro e funcionam como reserva de energia para uso do fungo quando o suprimento de metabólitos do hospedeiro é baixo.

Os arbúsculos são hifas altamente ramificadas que se estendem através da parede das células corticais do tecido hospedeiro. A ramificação dessas hifas especializadas cria uma área superficial grande entre o fungo e as células da membrana plasmática do hospedeiro e parecem estar envolvidas em uma transferência bidirecional de metabólitos e nutrientes para ambos os associados. Contudo, os arbúsculos permanecem vivos somente por poucos dias antes que se desintegram e sejam digeridos pelas células das plantas (Alexopoulos et al., 1996).

Para Dalpé & Building (2002) quando esse sistema de filamentos (hifas) que se desenvolve no solo entra em contato com raízes jovens, traçam seu caminho entre as células corticais da raiz e se propagam rapidamente formando, no interior dessas, estruturas especializadas denominadas de arbúsculos intracelulares, em alguns casos, vesículas intercelulares. Ou seja, o contato próximo entre a planta e o fungo permite a troca de nutrientes para a sobrevivência e desenvolvimento de ambos (Newsham et al., 1995). A ampla dispersão do fungo no solo através de seu sistema filamentoso gera à planta acesso a um volume maior de solo do que o sistema radicular por si só. Os filamentos fúngicos atuam mais ou menos como uma bomba suprindo a raiz com água e sais minerais, a que ela normalmente não teria acesso. Em troca, o fungo recebe da planta nutrientes metabolizados que ele mesmo seria incapaz de sintetizar, tais como açúcares, aminoácidos e metabólitos secundários. Assim, a planta colonizada é melhor nutrida e mais adaptada ao seu ambiente.

Para Bonfante & Perotto (1995) na ausência de hospedeiro, o crescimento dos FMAs é limitado a um tempo relativamente curto (20-30 dias), contudo em presença de raiz há o desenvolvimento do micélio vegetativo que, em condições favoráveis, pode colonizar 60-90% do comprimento do sistema radicular. Os autores ressaltam que há uma gama de fatores (ambientais e genéticos) que agem imediatamente antes e após o contato do FMA com a superfície da raiz podendo influenciar no sucesso da colonização radicular.

A colonização, por FMAs, dos tecidos radiculares parece ser por meio de uma combinação de mecanismos enzimáticos.

Outras funções sugeridas para os FMAs no ecossistema são as hifas no solo que têm, provavelmente, um importante papel na ciclagem de nutrientes por ajudar a prevenir perdas do sistema, especialmente quando as raízes estão inativas. Elas são condutos que podem transportar carbono de raízes de plantas para outros organismos do solo envolvidos no processo de ciclagem de nutrientes, cooperando com outros membros na decomposição da rede alimentar do solo. Além disso, as hifas de FMAs contribuem na estrutura do solo. Os FMAs contribuem para armazenamento de carbono no solo por alterar a qualidade da matéria orgânica do mesmo. O papel mais importante das hifas de fungos micorrízicos é devido à extensão da superfície ou da área das raízes, absorvem a forma disponível de fósforo e outras fontes localizadas de nutrientes fornecendo-as para as raízes (Brundrett, 2002).

2.4 Utilização de FMAs em sistemas de produção de culturas hortícolas

Conforme Cripps (2001) a utilização de FMAs tem um potencial valioso nas áreas de horticultura, revegetação dentre outros, à fim de melhorar o estabelecimento, a sanidade e o crescimento das plantas.

O efeito dos FMAs no crescimento e desenvolvimento de plantas hortícolas tem sido estudado e descrito em muitos trabalhos de pesquisa como por exemplo o trabalho realizado por Silveira et al. (2002) que avaliaram a influência da inoculação de seis espécies de FMAs no desenvolvimento vegetativo, nutrição mineral e conteúdo em substâncias de reserva em porta-enxertos de abacateiro (*Persea* sp.). Os autores observaram que a resposta das plantas de abacateiro à inoculação dos FMAs variou com a espécie de fungo em estudo, ficando evidente que das seis espécies avaliadas três foram

benéficas às variáveis observadas, proporcionando um maior desenvolvimento vegetativo, melhor nutrição e um maior conteúdo de reserva das plantas.

Em um outro estudo realizado por Souza et al. (2000) estudaram a interação entre os FMA e auxinas em plântulas de Citrange Carrizo. Verificaram uma interação significativa, onde a auxina somente foi eficaz em plântulas inoculadas com FMA, as quais apresentaram incremento no desenvolvimento vegetativo, nos conteúdos foliares de P e K e na espessura dos feixes vasculares, com o aumento das concentrações de ácido indolbutírico (AIB). Os resultados indicaram existir uma utilização direta ou indireta do AIB pelos FMA.

Porta-enxertos de videira também tem se mostrado dependentes aos FMA, apesar de haver variação segundo a espécie de fungo, havendo incremento no desenvolvimento vegetativo nas plantas inoculadas (Silva et al., 1999; Souza et al., 1999).

Admite-se que a primeira evidência positiva da influência da simbiose FMA na produção hortícola foi fornecido por Meng et al. (1997), citado por Azcón-Aguilar & Barea (1997) onde demonstrou em seu trabalho que a inoculação de propágulos FMA foi um pré-requisito para se conseguir o estabelecimento de plantas de citrus em canteiros dos viveiros de plantas tratadas com biocida. Obviamente, o interesse de horticultores na tecnologia FMA é devido à capacidade de FMA aumentar a absorção de fósforo e outros nutrientes, e aumentar a resistência a estresses bióticos e abióticos.

Trabalhos realizados por Edathil et al. (1996) demonstram que ao estudarem as interações de quatro espécies de FMAs do gênero *Glomus* na colonização das raízes, no crescimento e no estado nutricional de plântulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) observaram que as plântulas micorrizadas exibiram um aumento significativo no comprimento de gemas e de biomassa, quando comparadas às plântulas não micorrizadas. Também verificaram que com a associação houve um aumento no tecido hospedeiro das

concentrações de N e P. Entre as combinações das espécies de FMAs, o inóculo que continha as quatro espécies promoveu um melhor comprimento de gemas e biomassa do que outras combinações, enquanto que o rendimento de esporos foi menor na inoculação mista.

Na área agrícola tem se provado existir benefícios da utilização de FMAs também para as culturas de aspargos, cebola, batata, citros, árvores frutíferas. Em geral, a cultura de frutíferas tem recebido mais atenção do que culturas vegetais e ornamentais (Azcón-Aguilar & Barea, 1997).

Segundo Azcón-Aguilar & Barea (1997), basicamente, a propagação de plantas nos sistemas horticolas, normalmente começa em plântulas, produção de estacas ou enxertos, ou desenvolvimento no solo ou em substratos, que têm sido tratados para diminuir o nível de organismos patogênicos. No caso de micropropagação, a esterilidade é, obviamente, componente chave. Portanto, as técnicas de propagação mais comuns incluem tratamentos cujo propósito é eliminar ou reduzir a população microbiana no meio de enraizamento, embora isso afete, obviamente, também microorganismos benéficos, tais como os FMAs.

Para O`Gara (1996), citado por Rai (2001), no desenvolvimento de práticas para produção sustentável de culturas, se tem dado ênfase para o uso de inoculantes microbianos que atuem como fertilizadores químicos e pesticidas. Acredita-se que a distribuição de inoculantes microbianos via micropropagação é uma das soluções para esse problema.

Segundo Lovato et al. (1996) o número total de plantas produzida pela técnica de cultura de tecidos somente na Europa é em torno de 200 milhões de unidades ao ano, sendo cerca de 180 milhões produzidas em laboratórios comerciais. Pela técnica de micropropagação o substrato de crescimento utilizado, rico em nutrientes, é isento de

microrganismos, as plantas produzidas não interagem com outros microrganismos (Dolcet-Sanjuan et al., 1996).

Embora a micropropagação seja estabelecida para a produção de plantas elite, é interessante que as mesmas, devido ao estresse sofrido por elas no momento do transplântio, tenham um suporte biológico antes da realização desta etapa (Rai, 2001), sendo este um motivo para se aplicar a micorrização. Azcón-Aguilar & Barea (1997) afirmam que a aplicação de FMA é viável para as culturas que utilizam um estágio de transplântio, como é o caso com sistemas hortícolas. Estes autores ressaltam ainda que a adaptação de plantas micropropagadas *in vitro* em substratos não estéreis e nas condições de campo podem ser melhoradas pela inoculação dos fungos micorrízicos, e essa inoculação pode ser conduzida quando as plântulas são produzidas em mistura em vasos ou em canteiros nos viveiros de plantas desinfetados, onde propágulos de FMAs estão presentes em baixo número, ou até mesmo ausentes, tais como em material de plantas micropropagadas.

Pode-se afirmar que uma seleção cuidadosa da combinação funcionalmente compatível de hospedeiro, FMA e substrato é crítica para o sucesso e o estabelecimento inicial dos FMAs, após semeadura ou aclimatação, ou seja, é um fator chave para a melhor performance de plantas em práticas hortícolas (Gianinazzi et al., 1990ab). A seleção apropriada de FMAs é, portanto, fundamental. Por isso, seguindo esse propósito, um número de abordagens metodológicas e parâmetros têm sido propostos (Lovato et al., 1995, citado por Azcón-Aguilar & Barea, 1997), dentre eles: a eficácia em promover o crescimento das plantas e em proteger contra patógenos de plantas e/ou estresses abióticos, tais como: salinidade ou seca, são os aspectos mais comuns a serem levados em consideração. Nesse respeito, é importante considerar as condições ambientais em que as plantas micorrizadas são introduzidas e a inclusão nos estudos de seleção de FMAs de

ecótipos nativos, supostamente melhor adaptados às condições características do local experimental.

2.5 Produção dos FMAs

Visto que FMAs são considerados simbioses obrigatórios, eles devem ser produzidos em raízes vivas. Isso torna problemático o seu emprego quando a produção em larga escala é necessária e também, por causa do risco de contaminação por fitopatógenos. Conforme Rai (2001) o inóculo não deve ser somente puro, mas também ser capaz de exibir um efeito biológico desejável.

Conforme Azcón-Aguilar & Barea (1997), uma vez que a seleção fúngica tenha sido feita, a próxima etapa é a produção de quantidades de inóculo. O material a ser inoculado pode ser sementes, mudas, estacas ou plantas micropropagadas. No geral, é importante melhorar a técnica de produção de inóculo para uma aplicação adequada do FMA em um sistema comercial de plantas hortícolas. Isolados fúngicos individuais devem ser multiplicados e culturas estoques devem ser mantidas com sua colonização de raízes de plantas sendo usados para produção de grandes quantidades de inóculo no meio baseado em solo ou substratos artificiais. O inóculo produzido é muito fácil de se obter, após 6-12 meses, inoculantes altamente infectivos podem ser produzidos, porém é oneroso em relação ao cultivo *in vitro* e há um alto risco de contaminação.

Uma forma de inoculante que pode ser produzida em recipientes que utilizam agregados de argila expandida leves como substrato parece ser interessante. Esse material poroso pode ser facilmente separado de raízes hospedeiras e contém micélio infectivo e esporos (Azcón-Aguilar & Barea, 1997). Um outro suporte inorgânico de produção de inóculo pode ser a vermiculita, a qual comporta-se como um substrato apropriado para a formação de esporo de FMA (Barea et al., 1993, citados por Azcón-Aguilar & Barea,

1997). Colonização de raízes vivas bem sucedida de FMA tem sido realizada em substrato contendo areia, cascalho, turfa, argila expandida, pedra pomes, perlita, casca de árvore, serragem, vermiculita ou a mistura desses (Gianinazzi et al., 1990b).

Tem sido proposta também a produção de inóculo de raízes cortadas, obtido em culturas aeropônicas. Para Hung & Sylvia (1988), no trabalho de produção de inóculo de FMA em cultura aeropônica, o ambiente de enraizamento altamente arejado, estimula uma esporulação rápida e abundante de FMA.

Esses autores ressaltam ainda que a cultura em vasos utilizando-se solo é um método comum para a produção de inóculo de FMA. Recentemente, técnicas de solução de culturas, tais como filme de nutrientes e aeroponia têm sido adaptadas para a produção de inóculo de FMA. Esses métodos fornecem uma alternativa para a produção em massa de inóculo, sem a presença de solo. Propágulos limpos, especialmente esporos, não são somente úteis para a inoculação, mas são essenciais para estudos genéticos e fisiológicos. Ambas as técnicas de cultura em solução fornece um inóculo de raízes bem colonizadas, mas os resultados de experimentos de esporulação foram bastante diferentes.

Segundo Rai (2001) no que se refere ao manejo do inóculo, o fator crítico são as dosagens e o tempo de inoculação. Teoricamente, um único propágulo é suficiente para produzir colonização. Como fonte de inóculo têm sido utilizados hifas, esporos, clamidosporos e raízes micorrizadas para micorrização *in vivo* e *in vitro*. A composição de massa de inóculo mais comum é a mistura de esporos, raízes colonizadas, hifas e o substrato suporte da cultura de vasos, normalmente desenvolvido em meio sem solo ou em solo esterilizado. Também têm sido dada alguma atenção à preservação à longo prazo de FMA e para o armazenamento do inóculo.

2.6 Produção *in vitro* de FMAs

De acordo com Dalpé & Building (1997) e Berbara & Fonseca (1996), o maior obstáculo que vem dificultando estudos em áreas básicas do conhecimento como genética, bioquímica, fisiologia, taxonomia, ontogenia de esporos, verificação de potenciais micorrízicos de isolados de estirpes de FMA e a utilização desses microrganismos de solo é o seu estado simbiote obrigatório, que impossibilita o seu cultivo em meios de cultura, sob condições axênicas, requerendo então para sua propagação o uso de culturas em vasos, seja em casa de vegetação ou em câmara de crescimento. Para superar isso, o método de cultivo *in vitro* de raízes excisadas foi desenvolvido e representa um caminho promissor, mas somente poucas estirpes dos FMAs estão disponíveis e podem ser propagadas com sucesso em cultivo monoxênico (Pawloswska et al., 1999). O cultivo de FMAs em condições axênicas representa um dos maiores desafios na pesquisa em biologia de plantas e fungos (Varma, 1995, citado por Berbara & Fonseca, 1996).

Berbara & Fonseca (1996) ressaltam ainda, que a dificuldade de realizar esses estudos deveria ser suficiente para se priorizar a pesquisa sobre o desenvolvimento de culturas micorrízicas *in vitro*. Além de permitir a produção e controle de qualidade de inoculante de FMA para uso em larga escala, Siqueira (1987), citado por Berbara & Fonseca (1996) levantou uma série de benefícios que seriam obtidos com o crescimento de fungos em cultura pura, tais como: permitir caracterização morfológica adicional e utilização de características bioquímicas para fins taxonômicos; possibilitar a padronização de inóculo puro usado na pesquisa; permitir a realização de estudos avançados sobre a biologia e a genética de espécies ou isolados selecionados; facilitar a eliminação de hiperparasitas e microrganismos contaminantes que afetam os estudos *in vitro* e as respostas da planta à inoculação; permitir estudos básicos visando um melhor entendimento das relações ecológicas entre tais fungos e outros organismos de solo, e os

mecanismos pelos quais eles favorecem o crescimento das plantas e facilitar os estudos direcionados para o desenvolvimento de tecnologia para a produção do inoculante em larga escala.

Há trabalhos desenvolvidos *in vitro* que se dedicam a estudar além da produção do inóculo de FMA, as interações que ocorrem. Calvet et al. (1992) estudaram as interações *in vitro* entre o FMA *Glomus mosseae* (Gerd & Trappe) e alguns fungos saprófitas isolados de três substratos orgânicos, com objetivo de verificar sua eficiência na germinação de esporos dormentes de *G. mosseae* e no desenvolvimento de FMA. O desenvolvimento de *G. mosseae* foi estimulado por extratos de água estéril de substratos orgânicos e pela presença de isolados de *Trichoderma* spp. desses substratos. Com relação ao estabelecimento de micorrizas efetivas *in vivo*, em meio orgânico, muitas vezes há fracassos por causa do alto conteúdo de matéria orgânica e disponibilidade de fósforo desse substrato (Graham, 1984 citado por Calvet et al., 1992).

Segundo Berbara & Fonseca (1996) os primeiros resultados a demonstrar o estabelecimento dos FMAs *in vitro* foram obtidos por Mosse em 1962 e Mosse & Hepper (1975) em cultura de raízes. Mugnier & Mosse (1987) foram pioneiros no emprego de raízes transgênicas para estudar processos de colonização. Desde então, vários pesquisadores obtiveram não apenas colonização, mas esporulação de FMA em raízes cultivadas axenicamente em meio de cultura definido, permitindo a obtenção de culturas monospóricas de FMAs (Berbara & Fonseca, 1996). Desta forma, um dos principais entraves ao uso de técnicas imunológicas e moleculares em trabalhos com FMA, ou seja, a falta de um material puro, com alta estabilidade genética e fenotípica vem sendo superado.

Um outro trabalho que se utilizou de raízes transformadas foi estudado por Tiwari & Adholeya (2002) onde estes realizaram o co-cultivo *in vitro* de dois isolados de FMA, *Gigaspora margarita* (Becker & Hall) e *Glomus intraradices* (Smith & Schenck),

em raízes de cenoura Ri T-DNA transformadas. Os autores demonstraram, pela proliferação das hifas e esporulação, que é possível produzir simultaneamente, neste sistema de cultivo, diferentes gêneros de fungos micorrízicos. Eles observaram também, que este modelo de co-cultivo pode ser apropriado para que futuras investigações que ocorrem na natureza entre os associados com relação aos mecanismos de competição e interação possam ser realizadas, além de servir como modelo para a produção massal de múltiplos isolados de fungos micorrízicos.

Além disso, esses autores verificaram que a cultura de órgãos radiculares de isolados de FMAs *in vitro* fornece inóculo puro, viável e livre de contaminação em um espaço pequeno, e é portanto mais eficiente do que o modo convencional da multiplicação de culturas em vasos. Por isso, esse método de transformação vem sendo também utilizado como uma outra opção na tentativa de cultivar inóculos de FMAs *in vitro*.

No que se refere à inoculação micorrízica *in vitro*, e considerando que a fase de enraizamento normalmente realiza-se em meio baseado em ágar, é importante lembrar que germinação de esporos e estágio de crescimento micelial de FMA em condições axênicas tem sido intensamente estudados, demonstrando que muitos esporos FMAs germinam facilmente em meio contendo baixo conteúdo em nutrientes. Altos níveis de nutrientes, porém, podem inibir a germinação e crescimento (Azcón-Aguilar & Barea, 1997).

Azcón-Aguilar & Barea (1997) ressaltam ainda que o meio usado normalmente carece de propágulos do FMA, não somente para estágios *in vitro*, mas também para o crescimento posterior da plântula em vasos com substratos ou em canteiros de viveiros de plantas fumigados. Portanto, as plântulas deveriam ser inoculadas inicialmente no processo de micropropagação, assim que elas possam adquirir um crescimento adequado (Gianinazzi et al., 1990a).

Há três estágios de plântulas adequados para a inoculação de FMA: *in vitro*, durante a fase de enraizamento; *ex vitro*, imediatamente após a fase de enraizamento, no começo do período de aclimatação e *ex vitro*, após a fase de aclimatação, mas antes do princípio do período pós-aclimatação sob condições de casa de vegetação (Vesterg & Estáun, 1994, citado por Azcón-Aguilar & Barea, 1997).

2.7 Enraizamento de plantas micropropagadas *in vitro*

Segundo Calvete et al. (2002), para a formação de raízes é necessária energia, que pode ser oriunda da fotossíntese ou de outra fonte de açúcar. O carbono exógeno no meio de cultivo *in vitro* pode servir como fonte de energia, influenciando na fisiologia da planta, diferenciação e crescimento dos tecidos, indução e diferenciação de órgãos. A variação nas dosagens de sacarose influencia claramente a produção de biomassa, tanto na parte aérea como no sistema da raiz de mudas de morangueiro cv. Campinas. Na ausência de sacarose não há formação de raiz. Dados semelhantes foram obtidos por Riquelme et al. (1991) nas culturas de morangueiro, batata, menta e videira.

Conforme Fortin et al. (2002) o cultivo de raízes *in vitro* tem influenciado muito o conhecimento sobre a simbiose dos FMAs. O cultivo de raízes foi desenvolvido primeiramente por White e colaboradores (White, 1943; Butcher & Street, 1964; Butcher, 1980, citado por Fortin et al., 2002).

Roubelakis-Angelakis & Zivanovic (1991) demonstraram em seu experimento um meio de cultura modificado, denominado Roubelakis, que promove enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de videira e cultivares *Vitis vinifera* L. até mesmo na ausência de reguladores de crescimento de plantas (auxinas exógenas).

Segundo Assis & Teixeira (1998) fatores ligados à planta matriz como genótipo, estresse hídrico, substâncias de reserva como carboidratos, nutrição mineral,

condições de crescimento da planta (luz, temperatura), sazonalidade, substâncias reguladoras de crescimento e juvenildade têm sido considerados como aqueles que apresentam efeitos mais relevantes no enraizamento. Um dos fatores determinantes das respostas morfogenéticas *in vitro*, entre as quais o enraizamento, diz respeito às plantas doadoras de explantes. Além das características descritas das plantas doadoras de propágulos, fatores relacionados com os próprios propágulos podem exercer influência no seu enraizamento *in vitro*, como: estação do ano, presença e número de folhas, posição do explante na planta matriz, meio nutritivo na fase de multiplicação, inibidores endógenos. Além de fatores ligados ao meio nutritivo de enraizamento como: substâncias reguladoras de crescimento, outras substâncias, carboidratos, sais minerais, estado físico do meio de cultura, pH, carvão ativado e condições de incubação.

Há muito tempo sabe-se que a indução de raízes em segmentos caulinares é estimulada por auxinas. Além do uso de auxinas exógenas em meio de cultura para promover o desenvolvimento de raízes *in vitro*, segundo Peres & Kerbauy (2000), a produção de plantas com sistema radicular alterado tem sido conseguida através da introdução de genes bacterianos relacionados com o metabolismo hormonal. Plantas transgênicas expressando os genes de produção de auxinas de *Agrobacterium tumefaciens* possuem ampla iniciação de raízes. Do mesmo modo, plantas regeneradas a partir de “hairy roots” induzidas por *A. rhizogenes* apresentam considerável desenvolvimento do sistema radicular, crescendo vigorosamente sem o uso de hormônios.

Segundo Ludwig-Müller (2000), auxinas são uma classe de fitohormônios envolvidos no crescimento e desenvolvimento de plantas. O ácido indolbutírico atua principalmente na indução de raízes adventícias em muitas espécies de plantas. Embora esse regulador de crescimento seja utilizado em muitos laboratórios, seu papel *in vivo* ainda não é muito claro. A aplicação de AIB em mudas de muitas espécies de plantas

resulta na indução de raízes adventícias em muitos casos sendo mais eficiente do que o ácido indolacético (AIA), que foi o primeiro fitohormônio a ser usado para estimular o enraizamento de mudas.

De acordo com Williams et al. (1985) muitas das tentativas para induzir raízes em gemas de plantas lenhosas produzidas *in vitro* envolvem a aplicação de auxinas exógenas. O AIB e ANA (ácido naftalenoacético) são usados mais comumente, mas as respostas variam entre espécies e laboratórios. Efeitos de pH do meio e luz também têm sido registrados nesse sentido. Buscando a determinação da especificidade e interação entre auxina, luz e pH no enraizamento de espécies lenhosas australianas *in vitro*, os autores, examinaram a interação desses fatores no enraizamento de uma gama de espécies nativas australianas (Eucalipto, Araucária, entre outras) com potencial para uso como arbustos ornamentais, pois há ainda um considerável interesse na propagação *in vitro* de espécies de plantas lenhosas nativas australianas para horticultura, silvicultura e para conservação.

Magalhães & Peters (1991), trabalhando com brotos de ameixeira (*Prunus salicina*) da cultivar Santa Rosa, obtiveram uma média de 85,19%, independente da intensidade luminosa e do tipo de lâmpadas utilizada. O enraizamento dos brotos é pouco influenciado pela intensidade luminosa e pelo tipo de lâmpada utilizado. Observaram também que a percentagem de brotos enraizados, o comprimento de raízes e a formação de raízes secundárias aumentam com a diminuição da concentração de ácido indolbutírico (AIB) no meio de cultura, ou seja, concentração de 0,2 mg.L⁻¹ de AIB apresentou maior percentagem de enraizamento (91,11%) quando comparado com as concentrações de 0,5 e 0,8 mg.L⁻¹ de AIB. Enquanto que concentrações mais baixas de AIB diminuíram o número de raízes/broto, porém aumentaram o comprimento das raízes, além de contribuírem para a obtenção de uma maior percentagem de brotos com raízes secundárias.

Li & Eaton (1984) citam alguns trabalhos de outros autores que o meio contendo BAP (ácido benzilaminopurina) e AIB tem sido usado em vários trabalhos de cultivo *in vitro* de videira, mas ninguém menciona o uso desses reguladores como pré-tratamento. Então seu estudo se baseou no crescimento e enraizamento de ápices de gemas de videira *in vitro*, conduzido para avaliar o efeito do pré-tratamento com BAP ou AIB. No caso de enraizamento desse explante, o AIB teve um efeito positivo no enraizamento das cultivares Marechal Foch e Cascade. Quando as gemas foram cultivadas sem o pré-tratamento de AIB o desenvolvimento de raízes não foi satisfatório. Então, o máximo de enraizamento foi obtido acima da concentração de $2,46 \times 10^{-3}$ ou $3,94 \times 10^{-3}$ M de AIB.

Além da aplicação de auxinas exógenas há trabalhos que se detiveram em estudar a relação das auxinas com os FMAs. Conforme, trabalho realizado com plântulas de milho (*Zea mays* L.), Ludwig-Müller et al. (1997) observaram que em raízes de milho inoculadas com *G. intraradices* houve um aumento de (AIB) durante os estágios iniciais de infecção, quando comparadas com as raízes controles. Não foi detectado AIB em esporos de *G. intraradices*, enquanto foram encontradas pequenas quantidades de AIA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização do experimento

O estudo foi desenvolvido nos Laboratórios de Biotecnologia, do Departamento de Horticultura e Silvicultura, e de Microscopia, do Departamento de Fitossanidade, da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) situada em Porto Alegre.

Na sala de crescimento micropropagou-se *in vitro*, culturas de tomateiro (cultivar Santa Cruz Kada), videira (porta-enxerto SO4, cruzamento de *Vitis riparia* x *Vitis berlandieri*) e menta (*Mentha piperita* L.), as quais foram mantidas em condições de temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, sob 16 horas de fotoperíodo e 60-70% de UR.

O presente estudo compreendeu o período de setembro de 2002 a março de 2003.

3.2 Meio de cultura para manutenção dos tecidos *in vitro*

A manutenção rotineira dos tecidos vegetais de tais culturas foi feita em meio de cultura DSD1 (Silva da & Doazan, 1995), conforme Anexo 1, com 20 g.L^{-1} de sacarose e $6,0\text{ g.L}^{-1}$ de ágar-ágar, sem a adição de reguladores de crescimento. O pH do meio foi ajustado antes da adição do ágar variando entre 5,8 para as culturas de tomateiro (Nogueira et al., 2001) e de menta (Paolicchi et al., 2002) e 6,4 para a cultura da videira (Silva da & Doazan, 1995), posteriormente foram autoclavados a 121°C e 1,5 atm por 15 minutos. Após a autoclavagem, à temperatura ambiente, em câmara de fluxo laminar, aproximadamente 15 mL de meio de cultura foi vertido em tubos de ensaio para posterior inoculação dos explantes das culturas. Os tubos de ensaio foram vedados com papel laminado, filme plástico e armazenados na sala de crescimento.

3.3 Desinfestação de explantes

O processo de desinfestação das culturas de tomateiro, de videira e menta foi diferenciado, assim como à fonte de explantes utilizada.

3.3.1 Tomateiro

As sementes de tomate foram obtidas em um estabelecimento comercial de Porto Alegre-RS.

O processo de desinfestação das sementes de tomate, segundo Nogueira et al. (2001), constou da imersão das mesmas em etanol 70% (v/v), por um minuto, seguido da imersão em solução de hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) contendo Tween-20 0,1% (v/v), por 20 minutos, seguidas de quatro lavagens em água destilada e autoclavada, na câmara de fluxo laminar. Em seguida, as sementes foram distribuídas, assepticamente, em tubos de ensaio (1 semente/tubo, total de 20 tubos de ensaio) contendo o meio de manutenção da cultura DSD1.

3.3.2 Videira

Não foi realizada a desinfestação dos explantes da cultura da videira, pois a mesma vinha sendo cultivada *in vitro* no laboratório, partiu-se em seguida para o processo de repicagem e distribuição de segmentos nodais em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de manutenção da cultura DSD1 que além de manter a cultura estoque estes explantes foram utilizados para o teste de enraizamento *in vitro* de segmentos nodais de videira (Item 3.4) em placas de Petri contendo o mesmo meio suplementado com o regulador de crescimento, ácido indolbutírico (AIB).

3.3.3 Menta

A planta doadora dos propágulos da cultura de menta vinha sendo cultivada em casa de vegetação, por isso primeiramente fez-se a repicagem dos segmentos nodais, lavagem em água corrente e, então a desinfestação dos mesmos. O processo de desinfestação foi realizado da seguinte forma:

1º) imersão dos segmentos nodais em etanol 70% (v/v), por 30 segundos e por 1 minuto e hipoclorito de sódio 1%, por 30 segundos e 1 minuto. Os segmentos foram lavados quatro vezes em água destilada e autoclavada, em câmara de fluxo laminar e, então distribuídos em tubos de ensaio contendo o meio de manutenção da cultura DSD1.

2º) imersão dos segmentos em etanol 70% (v/v), por 1 minuto e hipoclorito de sódio 1%, por 5 e 10 minutos. Os segmentos foram lavados quatro vezes em água destilada e autoclavada, em câmara de fluxo laminar e, então distribuídos em tubos de ensaio contendo o meio de manutenção da cultura DSD1.

Em seguida, o cultivo *in vitro* dos explantes das culturas de tomateiro, de videira e menta foi estabelecido em sala de crescimento nas condições de temperatura e de fotoperíodo descritas no Item 3.1. Estas culturas foram observadas em relação a presença de contaminação por microrganismos, durante o período de 30 dias de cultivo.

3.4 Teste de enraizamento *in vitro* com a presença de regulador de crescimento

Neste estudo utilizou-se a cultura da videira para a realização do teste de enraizamento de segmentos nodais em seis diferentes concentrações (0; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹) de AIB. Segmentos nodais com aproximadamente 0,5 cm de comprimento foram distribuídos em placas contendo meio de manutenção DSD1 com a presença ou

ausência de AIB. Um total de trinta placas de Petri sendo 5 placas de cada dose foram cultivadas nas condições de temperatura e de fotoperíodo especificadas no Item 3.1.

3.5 Testes preliminares para a seleção de explantes

Diferentes fontes de propágulos das culturas de tomateiro, de videira e menta estabelecidas *in vitro* foram utilizadas para a realização deste teste, buscando-se selecionar explantes com expressão organogenética voltada ao enraizamento *in vitro* e que não emitissem parte aérea durante o cultivo. O procedimento de seleção dos explantes ocorreu da seguinte maneira:

3.5.1 Explantes de tomateiro

Após o desenvolvimento *in vitro* da cultura de tomateiro testou-se para o enraizamento diferentes explantes como cotilédones, segmentos nodais, ápice caulinar e a região do colo com raiz primária, excisados das plântulas em cultivo *in vitro*. Estes foram distribuídos em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de manutenção DSD1.

3.5.2 Explantes de videira

Para a seleção dos explantes de videira fez-se, assepticamente em câmara de fluxo laminar, o toailete das mesmas, retirando o ápice caulinar e as folhas deixando apenas explantes formados por um e dois segmentos basais juntamente com a raiz primária, eles foram distribuídos em tubos de ensaio, placas de petri e frascos. Também foi utilizado como explante folhas com pecíolos, estas foram feridas com bisturi e distribuídas em placas de Petri. Todos os recipientes (tubos de ensaio com 15, frascos com 30 e placas com 25 mL de meio de cultura) continham o meio de manutenção DSD1 suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de AIB.

3.5.3 Explantes de menta

Para a seleção de propágulos de menta utilizou-se folhas com pecíolos feridas com bisturi, a região do colo com raiz primária, distribuídos em placas de Petri e explantes formados com um segmento nodal, distribuídos em tubos de ensaio e frascos contendo meio de manutenção DSD1 suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB, esse procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

Os explantes de tomateiro, de videira e de menta foram cultivados em sala de crescimento nas condições de temperatura e fotoperíodo especificadas no Item 3.1, e avaliados a cada 15 dias em um período de 30 dias de cultivo.

3.6 Desenvolvimento de raízes de tomateiro, videira e menta *in vitro*

Esse experimento teve por objetivo avaliar o número e o comprimento de raízes das culturas de tomateiro, de videira e menta em diferentes doses de AIB nos seus respectivos explantes.

Após a seleção de explantes partiu-se para a etapa de cultivo *in vitro* das raízes de tomateiro, de videira e menta em meio de cultura DSD1 com a presença ou ausência de AIB. As avaliações de enraizamento de todas as culturas foram feitas considerando o número e o comprimento de raízes, contando-se, com o uso de lupa, o número de raízes emitidas pelos explantes e medindo-se o comprimento das raízes (mm). Não foram consideradas as raízes laterais (ramificações). A primeira avaliação foi feita após 7 dias de cultivo *in vitro*, durante um período de aproximadamente 15 dias para o tomateiro e a menta, com intervalos entre as avaliações de 3 e 5 dias de cultivo. As raízes de videira foram avaliadas também a partir dos 7 dias de cultivo durante o período de aproximadamente 24 dias nos intervalos de 3, 5 e 9 dias de cultivo.

3.6.1 Tomateiro

O meio de cultura utilizado para a produção de raízes de explantes do tomateiro foi o meio DSD1 com 40 g.L⁻¹ de sacarose e 6,0 g.L⁻¹ de ágar, com e sem a adição de 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de AIB e 0,1 mg.L⁻¹ de carvão ativo. O pH dos meios foi ajustado antes da adição do ágar em 5,8 e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 15 minutos. Após a autoclavagem, em temperatura ambiente, 25 mL de meio foi vertido, assepticamente, em placas de Petri distribuindo-se um explante (segmento basal e nodal) por placa, vedando-as com filme plástico. As culturas foram encaminhadas para a sala de crescimento onde permaneceram na temperatura de 25±2°C por aproximadamente 20 dias, no escuro antes de serem transferidas para um novo meio.

3.6.2 Videira

O meio de cultura utilizado para a cultura de videira foi o meio DSD1 com 40g.L⁻¹ de sacarose e 6,0 g.L⁻¹ de ágar, com e sem a adição de 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de AIB e 0,1 mg.L⁻¹ de carvão ativo. O pH dos meios foi ajustado antes da adição do ágar em 6,4 e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 15 minutos. Após a autoclavagem, em temperatura ambiente, 25 mL do meio foi vertido assepticamente em placas de Petri, seguida da inoculação de um explante (segmento basal com raiz primária e folha com pecíolo) por placa, em seguida as placas foram vedadas com filme plástico. As culturas foram encaminhadas para a sala de crescimento na temperatura de 25±2°C, onde permaneceram, aproximadamente, 25 dias no escuro antes de serem transferidas para um novo meio.

3.6.3 Menta

O meio de cultura utilizado para a distribuição dos explantes de menta foi o meio DSD1 com 40 g.L⁻¹ de sacarose e 6,0 g.L⁻¹ de ágar, sem e com a adição de 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de AIB e 0,1 mg.L⁻¹ de carvão ativo. O pH dos meios foi ajustado antes da adição do ágar em 6,4 e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 15 minutos. Após a autoclavagem, em temperatura ambiente, 25 mL do meio foi vertido, assepticamente, em placas de Petri distribuindo-se segmentos basal e nodal, um por placa, vedando-as com filme plástico. As culturas foram encaminhadas para a sala de crescimento na temperatura de 25±2°C, permanecendo por aproximadamente 20 dias no escuro antes de serem transferidas para um novo meio.

3.7 Preparo do inóculo de *G. etunicatum*

O inóculo de FMA utilizado foi *G. etunicatum* (W. N. Becker & Gerd.), multiplicado em cultura de vasos com substrato solo + areia autoclavados na relação 1:1 em casa de vegetação utilizando como hospedeiro a cultura da aveia (*Avena* sp.). O processo de semeadura das sementes de aveia e inoculação do inóculo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia em Horticultura da UFRGS, da seguinte forma: as sementes foram desinfestadas em hipoclorito de sódio e semeadas na superfície do substrato em vasos com 1 litro de substrato e 30 mL de inóculo de FMA. Após um mês da semeadura e inoculação do inóculo foram feitas aplicações semanais com solução nutritiva Long-Ashton (Brundrett et al., 1994) modificada (10% fósforo), numa quantidade de 10 mL de solução por vaso. Após quatro meses de cultivo, o inóculo de FMA estava pronto para ser utilizado, conforme a necessidade. O solo contendo o inóculo foi secado ao ar e armazenado à 4°C antes de serem utilizados.

3.7.1 Extração dos esporos de *G. etunicatum*

A extração dos esporos de *G. etunicatum* do substrato com raízes foi feita pela técnica de peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963) seguido pela centrifugação com sacarose. Para a extração utilizou-se uma amostra de 50 g de solo com o inóculo, armazenada a 4°C, esta foi colocada em uma seqüência de peneiras de 250 e 53 µm e lavada com água destilada. O solo retido na última peneira foi separado e colocado em tubos de falcon para a centrifugação durante 5 minutos a 1750 rpm em centrífuga de rotor plano. Depois, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se uma solução de sacarose com concentração de 480 g.L⁻¹, homogeneizando-a e, em seguida, centrifugando-a por 1 minuto a 1750 rpm. O sobrenadante foi passado pela peneira 53 µm e lavado cuidadosamente com água destilada para a retirar o excesso de sacarose.

O material retido nessa peneira, esporos do FMA e impurezas, foram vertidos em um copo de Béquer (100 mL) com água destilada observados em uma lupa, com aumento de 30 vezes, sendo separados do restante do material, com uma pipeta de Pasteur, colocados em um outro copo de Béquer (50 mL) com um pouco de água destilada para então seguir a etapa de desinfestação dos mesmos em câmara de fluxo laminar.

3.7.2 Desinfestação e germinação *in vitro* dos esporos de *G. etunicatum*

Os esporos de *G. etunicatum* foram desinfestados superficialmente (Colozzi-Filho et al., 1994) em hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos e lavados, em funil com papel filtro, de quatro a cinco vezes em água destilada e autoclavada. O uso dos esporos foi sempre feito imediatamente após a aplicação do agente desinfestante.

Após, a desinfestação dos esporos, estes foram capturados com o auxílio de uma lupa e de uma pipeta de Pauster e plaqueados em 10 placas contendo meio ágar-ágar 1%, um total de 4 esporos por placa de Petri. Estas placas foram incubadas na ausência de

luz, a temperatura de 25 a 28°C por 20 dias, à fim de verificar a germinação dos mesmos. A germinação foi examinada em microscópico óptico.

3.8 Inoculação e micorrização em raízes excisadas em meios diferentes

Ensaio I - Este ensaio foi conduzido com o objetivo de cultivar raízes de tomateiro e, então inocular esporos de *G. etunicatum* em meio DSD1 com a alteração da concentração de fósforo (KH_2PO_4) e de sacarose do meio. Segmentos de 1 cm de comprimento das raízes cultivadas de tomateiro (Item 3.6.1) foram utilizados para iniciar o cultivo de raízes em meio DSD1 com fósforo (KH_2PO_4) na concentração de $4,8\text{mg.L}^{-1}$ e de sacarose a 10 g.L^{-1} suplementado com 0 e $1,0\text{ mg.L}^{-1}$ de AIB, além de $0,1\text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativo. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Após, em 10 placas de cada tratamento de AIB, foram vertidos os meios que se encontravam em temperatura ambiente e, com a distribuição dos segmentos radiculares de tomateiro, as culturas de raízes foram então cultivadas, no escuro, em sala de crescimento na temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ por 19 dias. Ao término dos 19 dias de cultivo dos segmentos radiculares *in vitro*, inoculou-se aproximadamente 8 esporos por placa de Petri, distribuindo-se os mesmos próximos às pontas de raízes laterais, sendo incubados na ausência de luz, nas condições de temperatura descritas anteriormente. Estes foram observados em lupa após 9 dias de cultivo.

Ensaio II – Este outro ensaio objetivou testar a colonização das raízes pelos esporos de FMA em meio DSD1 com e sem alteração na concentração de fósforo e de sacarose, antes da inoculação dos esporos de *G. etunicatum*, uma ponta de raiz com aproximadamente 1 cm de comprimento, da cultura de tomateiro em cultivo *in vitro* (Item 3.6.1) foram repicadas e transferidas em placas de Petri, contendo algumas alterações na composição do meio em que elas vinham se desenvolvendo. Um dos meios foi composto

pelo meio de cultura DSD1 com 1,0 mg.L⁻¹ de AIB, 20 mg.L⁻¹ de sacarose e 0,1 g.L⁻¹ de carvão ativo, vertido em 20 placas de Petri, o outro meio DSD1 (Item 3.6.1) foi alterado a concentração de fósforo (KH₂PO₄) para 4,8 mg.L⁻¹ e de sacarose para 10 g.L⁻¹ suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de AIB, além de 0,1 g.L⁻¹ de carvão ativo e vertido em 20 placas de Petri. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem e as culturas de raízes de tomateiro foram cultivadas, no escuro, em sala de crescimento na temperatura de 25±2°C por 15 dias.

Cerca de 1 a 6 esporos de *G. etunicatum* foram inoculados próximo as pontas de raízes secundárias de tomate, com 15 dias de cultivo, nos meios descritos anteriormente. Estas culturas de raízes com a presença do esporo de FMA permaneceram incubadas em sala de crescimento, no escuro, nas condições de temperatura de 25±2°C por 30 dias. As avaliações começaram a ser feitas após 5 dias de incubação das raízes com os esporos, sendo observada, com o auxílio de lupa, a germinação dos esporos.

Ensaio III – Este ensaio foi conduzido utilizando-se raízes de videira com o propósito de inocular os esporos de *G. etunicatum*. Estas foram excisadas e cultivadas em meios DSD1 com a adição de 0, 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ AIB. Após 19 dias de cultivo das mesmas foi inoculado 1 a 5 esporos do FMA.

3.8.1 Avaliação da colonização radicular *in vitro* nos diferentes meios

A avaliação da colonização radicular micorrízica, do primeiro ensaio realizado no Item 3.8, pelos esporos de *G. etunicatum* foi feita utilizando-se a técnica de coloração de raízes (Philips & Hayman, 1970, modificado, citado por Colozzi-Filho & Balota, 1994). Os procedimentos utilizados partiram da retirada cuidadosa de segmentos de raízes, de aproximadamente 1 cm de comprimento, dos meios em que se encontravam, coletados da porção mediana das raízes. Os segmentos foram mantidos então em banho-maria com

tempo variando de 8 a 15 minutos conforme a espessura das raízes, à temperatura de aproximadamente 90°C, em solução de KOH (10%), em copos de Béquer. A solução de KOH (10%) foi substituída por uma nova solução de KOH (10%), repetindo-se o procedimento nos mesmos tempos, logo em seguida eliminou-se essa solução e promoveram-se três lavagens das raízes em água destilada. Os segmentos foram então imersos em hipoclorito de sódio (pH 5,0) de 4 a 16 minutos, variando diante da clarificação das mesmas. Os segmentos de raízes foram retirados desta solução e lavados três vezes em água destilada. A seguir, os mesmos foram corados conforme metodologia de Komanik et al. (1980), citado por Colozzi-Filho & Balota (1994), através da imersão dos mesmos em Azul de Tripano (0,05% de Azul de Tripano + 33,3% de Ácido Lático + 33,3% de Água + 33,3% de Glicerina) e aquecido em banho-maria a 90°C, por 4 minutos.

Os segmentos de raízes foram lavados com água destilada e distribuídos em lâminas para a visualização das estruturas (hifas, arbúsculos e vesículas) do FMA, *G. etunicatum*, ao longo do segmento radicular foram visualizadas com o uso de microscópio óptico. O mesmo procedimento de coloração foi feito para as raízes do segundo ensaio só em tempos diferentes.

Não foi feita a coloração dos segmentos radiculares de videira que se encontravam em associação com os esporos do FMA.

3.9 Análise Estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se os resultados obtidos no ensaio feito para o desenvolvimento de raízes de tomateiro, de videira e menta (Item 3.6) nas doses 0, 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de AIB nos respectivos segmentos de cada cultura, sendo avaliados conforme a ANOVA obtida pelo Software SPSS 12.0 para Windows. Segundo resultado da

ANOVA, os dados que apresentaram diferenças significativas foram submetidos à teste de Tukey para comparação múltipla de médias ($P \leq 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resposta dos explantes das culturas ao meio de manutenção DSD1

O meio básico DSD1 foi propício para a propagação vegetativa das culturas estoques de tomateiro, de videira e de menta, proporcionando condições nutritivas com nutrientes minerais necessários ao desenvolvimento dos explantes, sofrendo poucas alterações em sua composição na medida que o estudo *in vitro* das culturas avançava. O meio de cultura nada mais é do que um meio nutritivo utilizado na cultura de tecidos de plantas capaz de fornecer substâncias essenciais ao crescimento dos tecidos *in vitro*. Por isso, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais.

Portanto, inicialmente, não houve necessidade de definir protocolos diferenciados de meios para cada cultura, pois como explantes de videira vinham sendo propagados *in vitro* no meio DSD1 e não apresentavam problemas de desenvolvimento, resolveu-se adotar o mesmo meio para as culturas de tomateiro e de menta. Também foi possível observar, neste meio, que as culturas manifestavam competência morfogenética com a formação de ramos, indução de raízes, entre outras, regenerando-se *in vitro*, aparentemente sem nenhuma dificuldade, por esses motivos adotou-se este meio para o cultivo de todas as culturas. Com o passar do cultivo *in vitro*, se observou pequenas alterações no desenvolvimento das culturas devido à oxidação dos tecidos, com exceção do tomateiro.

A cultura do tomateiro propagou-se rapidamente *in vitro* apresentando um bom desenvolvimento radicular, com raízes ramificadas distribuindo-se por todo o meio de cultura formando uma rede de raízes que, muitas vezes, dificultava a excisão das mesmas no momento de transferência para um novo meio de cultura. Não foi observada oxidação dos tecidos radiculares de tomateiro durante o cultivo *in vitro*, os quais ramificaram e tiveram um crescimento contínuo.

As plântulas de videira micropropagadas *in vitro*, após emitirem a parte aérea, desenvolveram raízes que ao longo do tempo de cultivo passavam de uma coloração clara para mais escuras e poucas raízes novas se formavam. A coloração mais escura foi atribuída à oxidação dos tecidos radiculares, pois ao se adicionar o carvão ativo no meio de cultura, foi possível observar a formação de pequenas fissuras na superfície daqueles tecidos com a emissão de novas raízes. Segundo Assis & Teixeira (1998), a presença de folhas pode ser essencial ao enraizamento, a ausência não é suprida por auxinas, sacarose ou compostos nitrogenados, contudo estes compostos estimulam o enraizamento na presença de folhas, onde são produzidas auxinas e outros fatores para o enraizamento. Isso justificaria a emissão de raízes ter sido possível após ocorrer a formação das primeiras folhas.

A cultura da menta, inicialmente, propagou-se rapidamente emitindo as primeiras folhas no segundo dia após o cultivo *in vitro*, mesmo quando submersas no meio de cultura e as primeiras raízes foram emitidas com cinco dias de incubação. Ao longo de seu desenvolvimento *in vitro* na região do colo das plântulas, observou-se que a coloração original, verde escura, se tornou marrom escuro, quase preto, além disso houve a paralisação do crescimento radicular como o desenvolvimento de novas raízes. O escurecimento da região do colo das plântulas, atribuído ao processo de oxidação, provavelmente afetou o sistema radicular, tornando-o pouco ramificado, com diâmetro

reduzido, sem a alongação e emissão de novas raízes. Supõe-se que a oxidação tenha influenciado negativamente também a regeneração das plântulas, pois na transferência dos explantes (segmentos nodais) a um novo meio, a manipulação dos mesmos foi dificultada por se apresentarem com diâmetro reduzido, apresentando possivelmente um menor conteúdo de substâncias de reserva que pudessem auxiliar na regeneração das mesmas. Com a adição do carvão ativo ao meio de cultura, amenizou-se a oxidação, mas as plântulas continuaram com a formação de segmentos nodais reduzidos.

Segundo Peres (2002), as condições ambientais influenciam notavelmente a organogênese *in vitro*. As salas de cultivo normalmente são mantidas em temperatura ambiente (25°C) sendo a luz o fator ambiental que parece mais influenciar a oxidação do explante na fase de estabelecimento. Esse procedimento se baseia no fato de que a enzima para a produção de compostos fenólicos é dependente da luz. Por esse motivo, durante a micropropagação dos tecidos, que se encontravam sob a luz, à fim de manter culturas estoques para a continuidade aos estudos *in vitro*, seja no enraizamento ou na inoculação dos esporos de *G. etunicatum* em culturas de raízes, foi adicionado ao meio de cultura carvão ativado, a fim de diminuir a intensidade de luz no enraizamento, supondo que o mesmo amenizasse a oxidação dos segmentos nodais de menta e das raízes de videira. Assis & Teixeira (1998) ressaltam que o carvão pode beneficiar o processo de enraizamento reduzindo a intensidade luminosa na região de formação das raízes, mas que concentrações muito altas podem impedir o enraizamento.

Assis & Teixeira (1998) atribuem ainda, ao carvão ativado, a alta capacidade de adsorção tendo a propriedade de modificar a composição dos meios de cultura, podendo adsorver uma série de substâncias que são adicionadas ao meio, como por exemplo a retenção de concentrações excessivas de reguladores de crescimento e compostos tóxicos que inibem a morfogênese, liberadas pelos explantes ou até mesmo presentes no agente

gelificante (ágar). É uma substância capaz de adsorver fenóis e/ou quinonas, substâncias tóxicas, que são produzidas durante o processo de autoclavagem ou liberadas pelos explantes, cujos tecidos sofreram injúrias quando excisados, por exemplo, no caso da videira e da menta, da planta doadora dos explantes ou durante o processo de transferência dessas culturas a novos meios de cultivo.

Após a etapa de estabelecimento das culturas *in vitro*, iniciou-se o processo de desinfestação das mesmas, com exceção da cultura da videira.

4.2 Desinfestação dos explantes de tomate e de menta

Com o processo de desinfestação realizado nas 20 sementes de tomate, para iniciar o cultivo *in vitro*, apenas 15 % das sementes contaminaram com microrganismos, principalmente fungos. Devido o número reduzido de contaminações obtidas no processo de desinfestação superficial das sementes de tomate e a regeneração ocorrer na primeira semana de incubação da cultura, apresentando um enraizamento contínuo, não foi necessário testar outros agentes desinfestantes.

O processo de desinfestação dos explantes de menta (Anexo 2) mostrou a ação dos agentes desinfestantes ao realizar o primeiro teste com apenas 5 explantes em cada tempo de imersão. Aos 30 segundos houve 100% de contaminação por microrganismos, principalmente bactérias e fungos. No entanto, com um segundo teste, a exposição de 25 explantes a tempos maiores de imersão fez com que a contaminação por estes agentes se mantivesse entre 20 a 28 % (Anexo 2). Nos casos em que houve contaminação, a mesma pode ter sido consequência do processo de desinfestação superficial que não foi eficiente, ou por agentes bióticos endofíticos provenientes da cultura doadora dos propágulos; agentes estes, capazes de colonizar os tecidos de plantas saudias, sem uma aparente manifestação de sintomas durante a coleta dos explantes. Isso acarretou problemas que

foram evidenciados durante a multiplicação dos mesmos, em meio de cultura, apesar de propiciar as condições nutritivas necessárias para o desenvolvimento da cultura, também facilitou o crescimento de microorganismo, que não foram eliminados no processo de desinfestação prejudicando assim, o cultivo *in vitro* desta cultura.

Como os explantes de videira utilizados não necessitavam passar por este processo, enquanto os explantes das culturas de tomate e de menta permaneciam em propagação, os mesmos foram testados, a seguir, com relação ao enraizamento *in vitro* com a presença e ausência de diferentes concentrações de AIB.

4.3 Teste de enraizamento *in vitro* de videira com a presença de regulador de crescimento

No teste de enraizamento dos explantes de videira com a presença e ausência de diferentes concentrações de AIB pode-se observar que somente 1 dos 30 segmentos nodais avaliados, apresentaram desenvolvimento radicular após a emissão das primeiras folhas. A baixa taxa de enraizamento foi atribuída ao tamanho dos explantes de videira (um segmento nodal desprovido de folhas) utilizados para iniciar o cultivo de raízes *in vitro* e, possivelmente a ausência de folhas também teria influenciado na resposta destes as diferentes concentrações de AIB.

De acordo com Assis & Teixeira (1998), o número de folhas influencia, principalmente a velocidade de enraizamento e o número de raízes formadas. Além disso, eles citam que fatores ligados às plantas doadoras de explantes podem influenciar o enraizamento *in vitro*, como o genótipo, substâncias de reserva como carboidratos, condições de crescimento da planta entre outros.

Diante disso, em função da ausência de crescimento radicular neste teste, o qual só foi possível após a emissão da parte aérea nas gemas do segmento nodal,

efetuaram-se alguns ensaios procurando selecionar explantes que enraizassem, em placas de Petri, sem a emissão de parte aérea.

4.4 Testes preliminares para a seleção de explantes das culturas de tomateiro, videira e menta

Ensaio preliminares com o uso de diferentes fontes de propágulos das culturas de tomateiro, de videira e menta (Anexo 3) foram utilizados para selecionar, através de observações feitas durante o cultivo quanto a indução e crescimento das raízes, o explante que apresentasse melhor expressão organogênica voltada ao enraizamento *in vitro*.

Como resultado, da seleção de explantes de tomateiro descartou-se a utilização de cotilédones e do ápice caulinar, pois os cotilédones não emitiram raízes e o ápice caulinar apesar de emitir raízes, produziu muita área foliar. O segmento nodal, apesar de ter desenvolvido parte aérea, a haste central e a região do colo com raiz primária foram os explantes mais indicados à seleção, contudo optou-se trabalhar com os segmentos nodais para a cultura do tomateiro, por apresentarem muitas raízes ramificadas, o que, de certa forma, dificultou a medição das mesmas.

Para a seleção de explantes de menta todos, aparentemente, serviriam como explantes, mas optou-se pelo uso de segmento nodal, pois apesar de ter desenvolvido parte aérea, desenvolveu raízes ramificadas.

Devido à facilidade da emissão de raízes nos segmentos nodais do tomateiro e da menta este explante foi considerado a melhor fonte de propagação dentre os explantes avaliados para estas culturas para iniciar o enraizamento *in vitro*. Para Grattapaglia & Machado (1998), o enraizamento de espécies herbáceas é considerado geralmente fácil, porém o mesmo não ocorre para espécies lenhosas.

O enraizamento de explantes de videira, folhas com pecíolo e a utilização de um segmento basal com raiz primária, foi eficiente, pois com a aplicação de AIB observou-se a formação de um grande número de raízes ao longo de toda a raiz primária e de todo o pecíolo foliar. Ao contrário do que se observou em meios de manutenção da cultura estoque, na qual a ausência de AIB, promoveu a elongação das raízes e poucas raízes novas foram emitidas. Para a seleção de explantes de videira optou-se por iniciar o cultivo *in vitro* de raízes, com os explantes formados por um segmento basal com raiz primária (Figura 1) ou folhas com pecíolo, sendo que os dois desenvolveram raízes ramificadas.



FIGURA 1 – Explante de videira, formado por dois segmentos basais com raiz primária, em placa de Petri.

4.5 Desenvolvimento de raízes de tomateiro, videira e menta *in vitro*

Nesta etapa buscou-se o enraizamento *in vitro* dos explantes selecionados anteriormente (Item 4.4) para a cultura do tomateiro, da videira e da menta, por isso submeteu-se explantes dessas culturas as diferentes concentrações de AIB.

Segundo a Análise de Variância (Anexo 4) não houve interação significativa entre as doses de AIB (0; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹) e a origem dos grupos de explantes (segmentos basal e nodal) de tomateiro (Tabela 1). Também não se observou diferenças significativas

entre os explantes para número e comprimento médio de raízes (Tabela 1). Entretanto, observou-se diferenças significativas para o número de raízes sendo influenciado com o incremento das doses de AIB (Anexo 5), sendo maior com a adição de 2,0 mg.L⁻¹ no meio. No entanto, optou-se pela adição de 1,0 mg.L⁻¹ de AIB, pois o mesmo não teve diferenças significativas no aumento do número de raízes (Tabela 1), além de evitar problemas de toxidez no microambiente de cultivo das raízes. Para Morales (1990) o AIB desempenha um papel fundamental no processo de iniciação radicular e é considerada freqüentemente a melhor auxina utilizada para a indução de raízes *in vitro* (Caldas et al.,1998).

TABELA 1. Valores médios de número e comprimento médio de raízes de explantes de tomateiro, Segmentos Basal (SB) e Segmento Nodal (SN), nas diferentes doses de ácido indolbutírico (AIB).

Fatores	Número de raízes	Comprimento médio de raízes (cm)
Explantes		
SB	3,77 NS ¹	1,74 NS
SN	3,82 NS	1,05 NS
Doses		
D0*	1,11 a**	1,09 NS
D1	4,08 ab	1,66 NS
D2	6,20 b	1,44 NS
Médias	3,79	1,39

¹NS: diferença não significativa a 0,05%.

*Doses de AIB: D0, dose 0 mg.L⁻¹; D1, dose 1,0 mg.L⁻¹ e D2, dose 2,0 mg.L⁻¹ de AIB.

**Médias indicadas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998) uma toxidez por auxina durante o enraizamento das culturas, pode se manifestar somente durante a fase de alongamento das

raízes, as quais interrompem seu crescimento, enquanto a fase de indução e iniciação das mesmas, ocorre normalmente. Isso justificaria a resposta do comprimento médio de raízes dos explantes de tomateiro, tanto com a ausência ou presença de doses de AIB no meio de cultura. De acordo com os autores, meio de cultura sem regulador de crescimento estimularia a emergência e o crescimento das raízes até estas estarem suficientemente alongadas para um bom transplantio. Eles indicaram ainda, o uso de dois meios, um rico em auxina e outro sem regulador de crescimento, isso para nosso estudo torna-se inviável devido a demanda de mão-de-obra e tempo, já que se objetiva inocular os esporos de FMA.

A cultura de tomate foi a que melhor respondeu ao enraizamento, independentemente da presença de AIB no meio (Figuras 2 e 3). Supõe-se que esta resposta se deva ao genótipo. Segundo Nogueira et al. (2001), o tomateiro é um material adequado para a utilização das técnicas de cultura de tecidos, assim como outras espécies de Solanaceae. Alguns membros dessa família, como espécies dos gêneros *Datura*, *Nicotiana* e *Petunia*, tornaram-se modelos para trabalhos *in vitro*.



FIGURA 2 – Enraizamento de segmento basal de tomateiro na ausência de ácido indolbutírico.



FIGURA 3 – Enraizamento de segmento basal de tomateiro na presença de ácido indolbutírico.

Segundo Análise de Variância (Anexos 6 e 8), não houve interação significativa entre a origem dos explantes (meia folha com pecíolo e segmento basal com raiz primária) do porta-enxerto SO4 de videira e as doses de AIB. Também não houve diferenças significativas entre os explantes com relação ao número e comprimento médio de raízes.

Entretanto, o enraizamento *in vitro* de explantes de videira (Tabela 2, Anexos 7 e 9), foi influenciado significativamente pelas doses de AIB, aplicadas ao meio, havendo incremento no número de raízes com redução de seu comprimento em presença da auxina (Figura 4) e redução no número de raízes com a ausência de auxina (Figura 5), o contrário foi observado com relação ao comprimento médio de raízes, ou seja, o maior comprimento de raízes foi obtido com a ausência de AIB e uma redução do mesmo com a concentração maior de auxina (Tabela 2). Esse resultado coincide com o estudo de Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch (1991), que também encontraram um incremento na emissão de raízes do porta-enxerto SO4 de videira ao aplicarem 2 e 3 μM de AIB no meio de cultura.

Por sua vez, mostraram que doses de 5 e 8 μM de AIB foram excessivas, anulando o enraizamento deste porta-enxerto.

TABELA 2. Valores médios de número e comprimento médio de raízes nas diferentes doses de ácido indolbutírico (AIB) nos explantes de videira, Meia Folha com Pecíolo (MFP) e Segmento Basal com Raiz Primária (SBRP).

Fatores	Número de raízes	Comprimento médio de raízes (cm)
Explantes		
MFP	7,04 NS ¹	1,49 NS
SBRP	8,96 NS	1,21 NS
Doses		
D0*	2,20 a**	2,86 a
D1	9,75 b	0,74 b
D2	12,06 b	0,45 b
Médias	8	1,35

¹NS: diferença não significativa a 0,05%.

*Doses de AIB: D0, dose 0 mg.L⁻¹; D1, dose 1,0 mg.L⁻¹ e D2, dose 2,0 mg.L⁻¹ de AIB.

**Médias indicadas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Segundo Roubelakis-Angelakis & Zivanovic (1991), o porta-enxerto SO4 de videira foi o que apresentou uma menor frequência de enraizamento em contraste com os demais genótipos de videira testados, em ambos os meios de cultura utilizados. Sugerindo-se portanto que em trabalhos futuros, sejam testados outros porta-enxertos de videira.

Na Figura 4, observou-se ainda a grande formação de calos em presença de AIB, fato explicado por Grattapaglia & Machado (1998), os quais ressaltam que quando a

concentração de auxina no meio de enraizamento é excessiva, há a formação de calo na base do explante, comprometendo a rizogênese e o crescimento da parte aérea.



FIGURA 4 – Explante de videira, meia folha com pecíolo, com incremento no número de raízes e a formação de calos em meio com presença de ácido indolbutírico.



FIGURA 5 – Explante de videira, meia folha com pecíolo, com a alongação de uma raiz em meio com ausência de ácido indolbutírico.

Segundo Análise de Variância (Anexo 10), não houve interação significativa entre as doses de AIB e a origem dos explantes (segmentos basal e nodal) para a cultura da menta. Também não houve diferenças significativas entre os explantes quanto ao número e

comprimento médio de raízes. O fator doses influenciou significativamente no comprimento médio de raízes.

Para um maior comprimento de raízes dos explantes de menta, recomenda-se a utilização de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB, por ser menos tóxica ao meio de cultivo, apesar de não haver diferenças significativas entre $1,0$ e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (Anexo 11, Tabela 3).

TABELA 3. Valores médios de número e comprimento médio de raízes de explantes de menta, Segmentos Basal (SB) e Segmento Nodal (SN), nas diferentes doses de ácido indolbutílico (AIB).

Fatores	Número de raízes	Comprimento médio de raízes (cm)
Explantes		
SB	4,60 NS ¹	0,59 NS
SN	6,99 NS	0,49 NS
Doses		
D0*	3,66 NS	0,3 a**
D1	6,66 NS	0,72 b
D2	7,08 NS	0,61 a b
Médias	5,8	0,54

¹NS: diferença não significativa a 0,05%.

*Doses de AIB: D0, dose 0 mg.L^{-1} ; D1, dose $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e D2, dose $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB.

**Médias indicadas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 3, visualizou-se um crescimento reduzido das raízes, isso provavelmente se deva aos problemas de contaminação e a grande formação de calos nos tecidos (Figuras 6 e 7) o que de certa forma dificultou a leitura das raízes, além da maioria das raízes encontrarem-se aéreas.

Por estes motivos não se deu continuidade aos estudos de enraizamento e inoculação de esporos de FMA nesta cultura. O que não significa que não se deva seguir um estudo de protocolos com esta planta aromática.

Para um estudo futuro, que dê continuidade ao trabalho de produção de raízes *in vitro* recomenda-se que sejam feitas amostragens maiores ou, quem sabe, intervalos maiores entre as avaliações, ou até mesmo, doses maiores de AIB, testando outros protocolos de micropropagação para a cultura da menta, a fim de tentar solucionar os problemas no enraizamento desta cultura.



FIGURA 6 - Segmento nodal de menta com contaminação por microrganismo, principalmente bactéria.



FIGURA 7 – Formação de calos e raízes em segmento nodal de menta.

4.6 Desinfestação e germinação *in vitro* dos esporos de *G. etunicatum*

Com o objetivo de testar a viabilidade dos esporos após sua desinfestação superficial fez-se sua incubação em placas de Petri, com meio ágar-ágar. Após 20 dias de incubação com esporos de *G. etunicatum*, observou-se 20 % de contaminação por microrganismos, principalmente bactérias e fungos, estando contaminadas 2 placas das 10 inoculadas. Neste período, cinco esporos iniciaram a germinação *in vitro*, sendo possível observar a formação de uma pequena estrutura de coloração levemente amarelada com a mesma espessura da parede do esporo sendo emitida do mesmo, indicando que, ao menos, estes estavam viáveis.

Colozzi-Filho et al. (1994) consideram esporos germinados aqueles que emitiram um tubo germinativo, o que confirma a germinação de ao menos 5 esporos em nosso estudo. Ressalta-se que, a visualização dos esporos foi dificultada pela presença de fios do papel filtro no meio, subestimando o número de germinação dos mesmos.

A ausência de germinação em parte dos esporos avaliados após os 20 dias, pode ser explicada pela toxidez dos desinfestantes (Colozzi-Filho et al., 1994; Fortin et al., 2002); pela dormência, morte dos esporos, ou ainda por serem imaturos (Fortin et al., 2002).

A contaminação de algumas placas por microrganismos, principalmente bactérias e fungos, pode ser atribuída à ineficiência da desinfestação, fato explicável pela contaminação desenvolvida juntamente com os esporos. Outra forma de contaminação pode ser devido a contaminações localizadas distantes dos esporos.

4.7 Avaliação da colonização dos segmentos radiculares pelos esporos de *G. etunicatum* em meios diferentes

A colonização nas culturas de raízes de tomateiro com hifas dos esporos do FMA *G. etunicatum* (Figura 8) foi observada, no microscópio, após a realização da coloração das raízes, em uma das placas com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB do primeiro ensaio (Item 3.8). Por sua vez, no segundo ensaio (Item 3.8) foi possível observar a presença de poucas hifas do FMA em meio com baixa concentração de fósforo e sacarose, no entanto observou-se, com o auxílio de lupa, que no meio sem a redução nessas concentrações houve a formação de uma rede de micélio externo do FMA formando-se sobre as raízes no sentido contrário aos pêlos absorventes (Figura 9). Também, observou-se modificação na morfologia dos pêlos radiculares localizados próximo a região de inoculação do esporo, demonstrando-se maiores, mais volumosos e em maior quantidade. As raízes produzidas nos meios com baixas concentrações de fósforo e sacarose apresentavam-se em diâmetro reduzido e em menor quantidade.

Como não se realizou a coloração dos segmentos radiculares de videira, apenas pode-se observar a ausência de alongação radicular e de germinação de esporos de *G. etunicatum* no meio utilizado para a distribuição das raízes e para a inoculação dos esporos.

O uso de meio com baixa concentração de fósforo e sacarose que promoveu a colonização de *G. etunicatum* nas raízes de tomateiro foi baseado no estudo de Bécard & Fortin (1988) avaliando os eventos que iniciam a formação micorrízica arbuscular-vesicular em raízes transformadas Ri T-DNA, observaram que aumentos na concentração de KH_2PO_4 ou de sacarose em meio mínimo (MM1 e MM2) reduziam a porcentagem de colonização total de 83% para 0 e 7 % respectivamente. Observaram também, que reduzindo a concentração de sacarose de 3 para 1 % no meio, houve a colonização

micorrízica pelos esporos de *Gigaspora margarita* Becker & Hall, porém o crescimento radicular e o diâmetro nestes meios foram reduzidos.

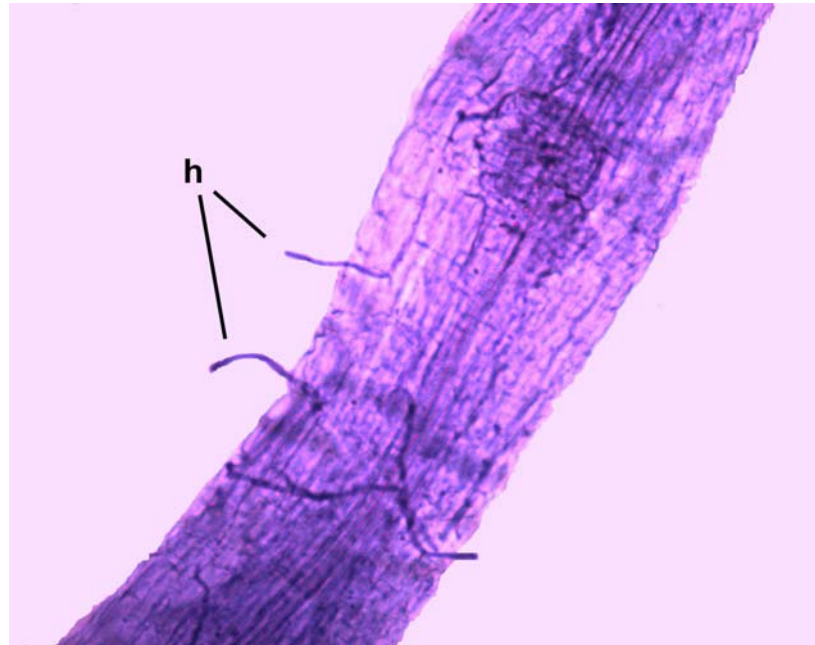


FIGURA 8 - Segmento de raiz de tomateiro, mostrando microscopicamente a penetração e colonização do córtex por hifas (h) do fungo micorrízico arbuscular (Aumento de 100x).

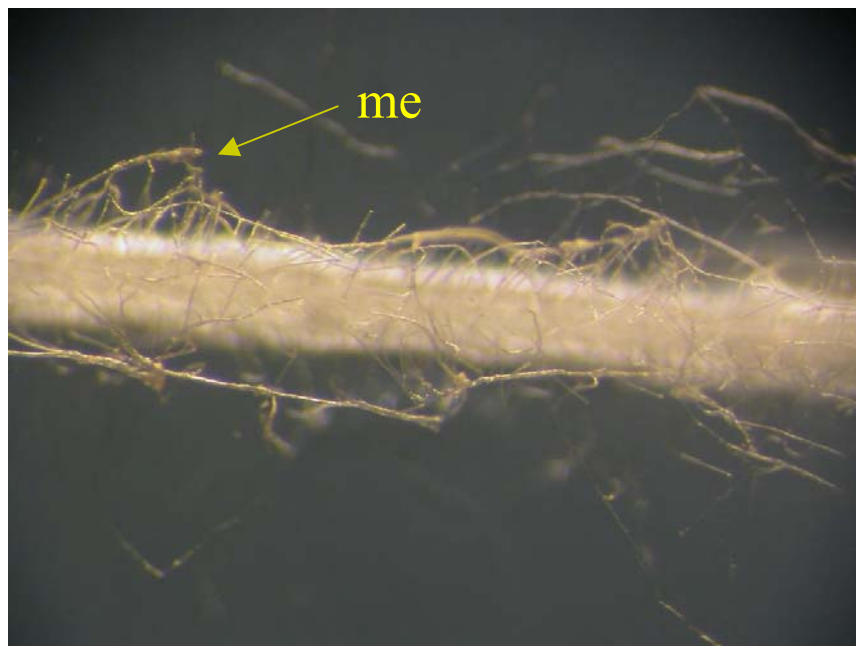


FIGURA 9 – Segmento radicular de tomateiro com a presença de uma rede de micélio externo (me) do fungo micorrízico arbuscular (Aumento de 16x).

O meio de cultura de tomateiro sem a redução das concentrações de fósforo e sacarose favoreceu a presença de hifas do FMA, as quais se localizavam nas raízes próximas ao local de inoculação dos esporos.

A ausência de alongamento das raízes nos meios de videira pode ser atribuída a oxidação ocorrida nos tecidos radiculares da mesma, podendo vir a influenciar a germinação de *G. etunicatum*. A ausência de hifas pode também ser atribuída a oxidação. Esses foram os principais motivos que levaram a não realização da etapa de coloração dos segmentos radiculares desta cultura.

5. CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo concluiu-se, que:

- A propagação de raízes de tomateiro, em meio de cultura DSD1, se estabeleceram tanto em na ausência ou presença de diferentes concentrações de AIB, com aumentos quanto ao número de raízes apenas com a adição de AIB;
- As raízes de tomateiro produzidas *in vitro* em meio DSD1, permitem, sem a utilização de raízes transformadas, a colonização e formação de hifas de *Glomus etunicatum*, o que não se confirmou com as raízes de videira;
- No cultivo da videira (porta-enxerto SO4), a quantidade e o comprimento das raízes são aumentadas e diminuídas, respectivamente, com a presença de AIB no meio de cultura. Para essa cultura há necessidade de se utilizar outros porta-enxertos, favorecendo maior alongamento e ramificação das raízes;
- A menta apresenta potencial para ser propagada *in vitro*, porém há necessidade de estudos mais aprofundados testando outros protocolos de meios de cultura que diminuam os problemas de oxidação das raízes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1996. 869p.

ASSIS, T.F. DE; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ, 1998. p.261-296.

AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.68, n.1-4, p.1-24, 1997.

BÉCARD, G.; FORTIN, J.A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. **New Phytologist**, Cambridge, v.108, p.211-218, 1988.

BERBARA, R.L.L.; FONSECA, H.M.A. Colonização radicular e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. In: SIQUEIRA, J.O. (Ed.). **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: UFLA/DCS e DCF, 1996. p.39-65.

BERTA, G.; FUSCONI, A.; TROTTA, A.; SCANNERINI. Morphogenetic modifications induced by the mycorrhizal fungus *Glomus* strain E₃ in the root system of *Allium porrum* L. **New Phytologist**, Cambridge, v.114, n.2, p.207-215, 1990.

BONFANTE, P.; PEROTTO, S. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. **New Phytologist**, Cambridge, v.130, n.1, p.3-21, 1995.

BRUNDRETT, M. **Introduction to mycorrhizas**. CSIRO Forestry and Forest Products. Disponível em: <<http://www.ffp.csiro.au/research/mycorrhiza/intro.html>>. Acesso em: 13 set. 2002.

BRUNDRETT, M.; MELVILLE, L.; PETERSON, L. **Practical methods in mycorrhiza research**. Ontário: Mycologue Publications, 1994. 80p.

BURLEIGH, S.H.; JAKOBSEN. Mycorrhizal research on the move. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.7, n.1, p.6-7, 2002.

DOLCET-SANJUAN, R.; CLAVERIA, E.; CAMRUBÍ, A.; ESTAÚN, V.; CALVET, C. Micropropagation of walnut trees (*Juglans regia* L.) and response to arbuscular mycorrhizal inoculation. **Agronomie**, Paris, v.16, n.10, p.639-645, 1996.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. . In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. p.87-132.

CALVET, C.; BAREA, J.M.; PERA, J. *In vitro* interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and saprophytic fungi isolated from organic substrates. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.24, n.8, p.775-780, 1992.

CALVETE, E.O.; KÄMPF, A.N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.2, p.186-191, 2002.

COLOZZI-FILHO, A.; SIQUEIRA, J.O.; OLIVEIRA, E. de. Desinfestação superficial de esporos de fungos micorrízicos vesicular-arbuscular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.7, p.1119-1127, 1994.

COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L. Micorrizas arbusculares. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Eds.) **Manual de métodos empregados em microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994. p.383-418.

CRIPPS, C. Endotrophic mycorrhiza. In: MALOY, O.C.; MURRAY, T.D. **Encyclopedia of Plant Pathology**. Nova York: John Wiley & Sons, 2001. p.405-407.

DALPÉ, Y.; BUILDING, W.S. **Biodiversity of mycorrhizal fungi**. Canada: ECORC, 1997. Disponível em <http://res2.agr.gc.ca/ecorc/fr/mycorhiz/bio_sols.htm>. Acesso em: 13 set. 2002.

DECLERCK, S.; STRULLU, D.G.; PLENCHETTE, C. Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. Isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. **Mycologia**, Nova York, v.90, n.4, p.579-585, 1998.

EDATHIL, T.T.; MANIAN, S.; UDAIYAN. Interaction of multiple VAM fungal species on root colonization, plant growth and nutrient status of tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.59, n.1-2, p.63-68, 1996.

FORTIN, J.A.; BÉCARD, G.; DECLERCK, S.; DALPÉ, Y.; ST-ARNAUD, M.; COUGHLAN, A.P.; PICHE, Y. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.80, n.1, p.1-20, 2002.

GEDERMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogene extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v.46, p.235-244, 1963.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. p.183-260.

GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; TROUVELOT, A. Potentialities and procedures for the use of endomycorrhizas with special emphasis on high value crops. In: WHIPPS, J.M. AND LUMSDEN, B. (Eds.). **Biotechnology of fungi for improving plant growth**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990a. p.41-54.

GIANINAZZI, S.; TROUVELOT, A.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Role and use of mycorrhizas in horticultural crop production. In: INTERNATIONAL HORTICULTURE CONGRESS, 23., 1990b, Florença. **Anais...** Florença: [S.n.], 1990b. p.25-30.

HILDEBRANDT, U.; JANETTA, K.; BOTHE, H. Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.4, p.1919-1924, 2002.

HUNG, L.L.L.; SYLVIA, D.M. Production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculum in aeroponic culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.2, p.353-357, 1988.

LI, J.R.; EATON, G.W. Growth and rooting of grape shoot apices *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v.19, n.1, p.64-66, 1984.

LUDWIG-MÜLLER, J. KALDORF, M.; SUTTER, E.G.; EPSTEIN, E. Indole-3-butyric acid (IBA) is enhanced in young maize (*Zea mays* L.) roots colonized with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Plant Science**, Washington, v.125, n.2, p.153-162, 1997.

LUDWIG-MÜLLER. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.32, n.2-3, p.219-230, 2000.

LOVATO, P.E.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; TROUVELOT, A.; GIANINAZZI, S. The state of art mycorrhizas and micropropagation. **Advances in Horticultural Science**, Florença, v.10, p.46-52, 1996.

MAGALHÃES JR, A.M.DE; PETERS, J.A. Cultura *in vitro* de ameixeira: efeito ácido do ácido indolbutírico, tipo de lâmpada e intensidade luminosa no enraizamento. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.3, n.1, p.57-61, 1991.

MORALES, C.F.G. **Influência do ácido indolbutírico e da presença de folhas no enraizamento de estacas de laranjeiras “Valência” e tangerinas “Montenegrina”**. 1990. 71 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.

MOSSE, B.; HEPPEL, C. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. **Physiology Plant Pathology**, Londres, v.5, n.3, p.215-223, 1975.

MUGNIER, J. MOSSE, B. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. **Phytopathology**, St. Paul, v.77, n.7, p.1045-1050, 1987.

NEWSHAM, K.K.; FITTER, A.H.; WATKINSON, A.R. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. **Trends in Ecology and Evolution**, Oxford, v.10, n.10, 407-411, 1995.

NOGUEIRA, F.T.S.; COSTA, M.G.; FIGUEIRA, M.L.; OTONI, W.C.; FINGER, F.L. Regeneração *in vitro* de plantas de tomateiros 'Santa Clara' e seu mutante natural 'Firme'. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.25, n.1, p.63-71, 2001.

PAOLICCHI, F.; MENSUALI-SODI, A.; TOGNONI, F. Effect of clinorotation on *in vitro* cultured explants of *Mentha piperita* L. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.92, n.3-4, p.305-315, 2002.

PAWLOWSKA, T.E.; DOUDS JR, D.D.; CHARVAT, I. *In vitro* propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. **Mycological Research**, Nova York, v.103, n.12, p.1549-1556, 1999.

PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. Controle hormonal do desenvolvimento das raízes. **Revista Universa**, Brasília, v.8, p.181-195, 2000.

PERES, L.E.P. As bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.4, n.25, p.44-48, 2002.

RAI, M.K. Current advances in mycorrhization in micropropagation. **In vitro Cellular Development Biology-Plant**, Wallingford, v.37, n.2, p.158-167, 2001.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.297-333.

RIQUELME, C.; GUIÑAZÚ, M.E.; TIZIO, R. Preacondicionamiento y aclimatación, en condiciones de invernáculo, de plántulas micropropagadas de frutilla, menta, papa y vid. **Phyton**, Buenos Aires, v.52, n.1, p.73-82, 1991.

ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; ZIVANOVITC, S.B. A new culture médium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. **HortScience**, Alexandria, v.26, n.12, p.1551-1553, 1991.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, Cambridge, v.105, n.12, p.1413-1421, 2001.

SILVA, A.L. da; DOAZAN, J.P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée a des porte-greffes de Vigne *in vitro*. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, Bordeaux, v.29, n.1, p.1-9, 1995.

SILVA, R.P.; SOUZA, P.V.D. de; AMARAL, A.L. do; KUHN, G.B.; SILVA, C.M. da. Influência de fungos micorrízicos arbusculares na aclimação do porta-enxerto de videira 101-14 micropropagado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 9., 1999, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPV, 1999. p.137.

SIQUEIRA, J.O.; LAMBAIS, M.R.; STÜRMER, S.L. Fungos micorrízicos arbusculares. **Biociência** **Ciência & Desenvolvimento**. São Paulo: KLB Publicações, 2002. V.25, p.12-21.

SILVEIRA, S.V. da; SOUZA, P.V.D. de; KOLLER, O.C. Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o desenvolvimento vegetativo de porta-enxertos de abacateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.3, p.303-309, 2002.

SOUZA, P.V.D. de; AMARAL, A.L. do; SILVA, R.P. da; KUHN, G.B.; FREITAS, R.S. de. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares na aclimação do porta-enxerto 1103 Palsen micropropagado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 9., 1999, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPV, 1999. p.135.

SOUZA, P.V.D. de; AUGUSTI, M.; ABAD, M.; ALMELA, V. Desenvolvimento vegetativo e morfologia radicular de Citrange Carrizo afetado por ácido indolbutírico e micorrizas arbusculares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.2, p.249-255, 2000.

TIWARI, P.; ADHOLEYA, A. *In vitro* co-culture of two AMF isolates *Gigaspora margarita* and *Glomus intraradices* on Ri T-DNA transformed roots. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.206, n. 1, p.39-43, 2002.

WILLIAMS, R.R.; TAJI, A.M.; BOLTON, J.A. Specificity and interaction among auxins, light, and pH in rooting of australian woody species *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v.20, n.6, p.1052-1053, 1985.

ZEZÉ, A.; SULISTYOWATI, E.; OPHEL-KELLER, K.; BARKER, S.; SMITH, S. Intersporal genetic variation of *Gigaspora margarita*, a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, revealed by M13 minisatellite-primed PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.2, p.676-678, 1997.

7. ANEXOS

ANEXO 1. Composição do meio básico DSD1 (Silva da & Doazan, 1995).

Compostos	mg.L⁻¹
NH ₄ NO ₃	100
KNO ₃	1000
MgSO ₄ .7H ₂ O	180
KH ₂ PO ₄	100
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	500
MnSO ₄ .4H ₂ O	1,2
H ₃ BO ₃	1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,5
Na ₂ .EDTA	37,5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Vitaminas	
Tiamina	1
Piridoxina	1
Ácido Nicotínico	1
Fonte de Carbono	
Sacarose	20 x 10 ³
Mio-Inositol	10
Agente Gelificante	
Ágar-ágar	6 x 10 ³

O pH do meio foi ajustado entre 5,8-6,4, conforme a cultura a ser micropropagada neste meio, antes da autoclavagem a 121°C e 1,5 atm por 15 minutos.

ANEXO 2. Agentes desinfestantes utilizados nos explantes de menta nas concentrações e tempo de exposição estudados.

Produtos/Concentração	Tempo de exposição (segundo e minuto)	Número de explantes¹	Número de explantes contaminados	Porcentagem de contaminação (%)
<i>1º Teste</i>				
Álcool etílico solução 96% P.A. / 70% V/V e Hipoclorito de sódio solução P.A. 11 % de cloro livre / 1% V/V	30 seg	5	5	100
	1 min	5	4	80
<i>2º Teste</i>				
Álcool etílico solução 96% P.A. / 70% V/V (1 min) e Hipoclorito de sódio solução P.A. 11 % de cloro livre / 1% V/V	5 min	25	7	28
	10 min	25	5	20

¹ Explantes: formados por segmentos nodais de menta.

ANEXO 3. Seleção de explantes das culturas de tomateiro, menta e videira visando o enraizamento *in vitro* sem a emissão de parte aérea.

Culturas	Explantes	Presença de Raiz e/ou Parte Aérea
Tomateiro	Cotilédones	0, 0, 0*, ¹
	Segmento Nodal	1, 1, 1, 2, 2, 2, 2 ⁵
	Haste Central	1, 1, 1, 1, 1 ³
	Ápice Caulinar	2, 2, 2 ¹
	Região do Colo com raiz primária	1, 1, 2 ¹
Videira	1 Segmento Basal com raiz primária	1, 1, 1, 1, 2, 2 ⁴
	2 Segmentos Basais com raiz primária	1, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 2 ⁶
	Folha com Pecíolo	1, 1, 1 ¹
Menta	Folha com Pecíolo	1, 1, 1, 1 ²
	Região do Colo com raiz primária	1, 1, 1 ¹
	Segmento Nodal	1, 1, 2 ¹

* Notas: Valores 0, ausência de raiz; 1, presença de raiz e 2, presença de raiz e de parte aérea.

¹ Corresponde a três explantes.

² Corresponde a quatro explantes.

³ Corresponde a cinco explantes.

⁴ Corresponde a seis explantes.

⁵ Corresponde a sete explantes.

⁶ Corresponde a oito explantes.

ANEXO 4. Análise de variância do número de raízes de tomateiro considerando doses de AIB e explantes (Segmentos basal e nodal).

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F	P ($\alpha=0,05$)
Ajuste do Modelo	596,717	6	99,453	5,734	0,001
Doses	134,959	2	67,480	3,891	0,033*
Explantes	0,020	1	0,020	0,001	0,973
Doses x Explantes	9,165	2	4,583	0,264	0,770
Resíduo	468,283	27	17,344		
Total	1065,0	33			

*Valores diferem significativamente a probabilidade de 5%.

ANEXO 5. Comparações múltiplas de médias entre os valores médios de número de raízes de tomateiro nas diferentes doses de AIB usando teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

Doses _A ¹	Doses _B	(D _A -D _B)**	Erro Padrão	P ($\alpha=0,05$)
D0	D1	-2,90	1,738	0,235
	D2	-4,92	1,820	0,031*
D1	D0	2,90	1,738	0,235
	D2	-2,02	1,783	0,504
D2	D0	4,92	1,820	0,031*
	D1	2,02	1,783	0,504

¹Doses (D – mg.L⁻¹): D0= 1,11; D1= 4,08 e D2= 6,20, correspondem aos valores médios de número de raízes em cada dose de AIB dos explantes de tomateiro.

*Médias diferem a probabilidade de 5%.

**Diferença dos valores médios nas doses.

ANEXO 6. Análise de variância (ANOVA) do número de raízes de videira considerando doses de AIB e explantes (Meia folha com pecíolo e Segmento basal com raiz primária).

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F	P ($\alpha=0,05$)
Ajuste do Modelo	565,831	5	113,166	12,378	0,000
Intercepto	1709,038	1	1709,038	186,935	0,000
Doses	537,716	2	268,858	29,408	0,000*
Explantes	24,633	1	24,633	2,694	0,115
Doses x Explantes	2,790	2	1,395	0,153	0,859
Resíduo	201,133	22	9,142		
Total	2543,0	28			
Total do ajuste	766,964	27			

*Valores diferem significativamente a probabilidade de 5%.

ANEXO 7. Comparações múltiplas de médias entre os valores médios de número de raízes de videira nas diferentes doses de AIB usando teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

Doses _A ¹	Doses _B	(D _A -D _B)**	Erro Padrão	P ($\alpha=0,05$)
D0	D1	-7,66	1,490	0,000*
	D2	-9,80	1,321	0,000*
D1	D0	7,66	1,490	0,000*
	D2	-2,14	1,462	0,326
D2	D0	9,80	1,321	0,000*
	D1	2,14	1,462	0,326

¹Doses (D - mg.L⁻¹): D0= 2,20; D1= 9,75 e D2= 12,06, correspondem aos valores médios de número de raízes em cada dose de AIB dos explantes de videira.

*Médias diferem a probabilidade de 5%.

**Diferença dos valores médios nas doses.

ANEXO 8. Análise de variância (ANOVA) do comprimento médio de raízes de videira considerando doses de AIB e explantes (Meia folha com pecíolo e Segmento basal com raiz primária).

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F	P ($\alpha=0,05$)
Ajuste do Modelo	36,395	5	7,279	4,202	0,008
Intercepto	49,156	1	49,156	28,308	0,000
Doses	34,226	2	17,113	9,880	0,001*
Explantes	0,508	1	0,508	0,293	0,594
Doses x Explantes	1,405	2	0,702	0,405	0,672
Resíduo	38,106	22	1,732		
Total	128,676	28			
Total do ajuste	74,501	27			

*Valores diferem significativamente a probabilidade de 5%.

ANEXO 9. Comparações múltiplas de médias entre os valores médios do comprimento médio de raízes de videira nas diferentes doses de AIB usando teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

Doses _A ¹	Doses _B	(D _A -D _B)**	Erro Padrão	P ($\alpha=0,05$)
D0	D1	2,11	0,649	0,010*
	D2	2,42	0,575	0,001*
D1	D0	-2,11	0,649	0,010*
	D2	0,30	0,636	0,883
D2	D0	-2,42	0,575	0,001*
	D1	-0,30	0,636	0,883

¹Doses (D – mg.L⁻¹): D0= 2,86; D1= 0,74 e D2= 0,45, correspondem aos valores médios de comprimento médio de raízes em cada dose de AIB dos explantes de videira.

*Médias diferem a probabilidade de 5%.

**Diferença dos valores médios nas doses.

ANEXO 10. Análise de variância do comprimento médio de raízes de menta considerando doses de AIB e explantes (Segmentos basal e nodal).

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F	P ($\alpha=0,05$)
Ajuste do Modelo	0,969	5	0,194	2,228	0,091
Intercepto	7,021	1	7,021	80,711	0,000
Doses	0,739	2	0,369	4,246	0,029*
Explantes	0,056	1	0,056	0,639	0,434
Doses x Explantes	0,080	2	0,040	0,458	0,639
Resíduo	1,740	20	0,087		
Total	10,639	26			
Total do ajuste	2,709	25			

*Valores diferem significativamente a probabilidade de 5%.

ANEXO 11. Comparações múltiplas de médias entre os valores médios do comprimento médio de raízes de menta nas diferentes doses de AIB usando teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

Doses _A ¹	Doses _B	(D _A -D _B)**	Erro Padrão	P ($\alpha=0,05$)
D0	D1	-0,43	0,143	0,018*
	D2	-0,29	0,139	0,123
D1	D0	0,43	0,143	0,018*
	D2	0,15	0,143	0,570
D2	D0	0,29	0,139	0,123
	D1	-0,15	0,143	0,570

¹Doses (D – mg.L⁻¹): D0= 0,3; D1= 0,72 e D2= 0,61, correspondem aos valores médios de comprimento médio de raízes em cada dose de AIB dos explantes de menta.

*Médias diferem a probabilidade de 5%.

**Diferença dos valores médios nas doses.