



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

ARTHUR TRAVASSOS DE QUEIROZ XAVIER

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMA) EM MUDAS
MICROPROPAGADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR: DA ACLIMATIZAÇÃO ÀS
CONDIÇÕES DE MICROCOSMOS**

**RECIFE
2021**

ARTHUR TRAVASSOS DE QUEIROZ XAVIER

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMA) EM MUDAS
MICROPROPAGADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR: DA ACLIMATIZAÇÃO ÀS
CONDIÇÕES DE MICROCOSMOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos

Área de Concentração: Fungos de Interesse Agronômico

Orientadora: Profa. Leonor C. Maia

**RECIFE
2021**

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Xavier, Arthur Travassos de Queiroz

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar: da aclimatização às condições de microcosmos / Arthur Travassos de Queiroz Xavier – 2021.

62 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Leonor C. Maia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, 2021.

Inclui referências.

1. Fungos micorrízicos 2. Cana-de-açúcar 3. Agricultura I. Maia, Leonor C. (orient.) II. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-187

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMA) EM MUDAS
MICROPROPAGADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR: DA ACLIMATIZAÇÃO ÀS
CONDIÇÕES DE MICROCOSMOS**

ARTHUR TRAVASSOS DE QUEIROZ XAVIER

Data da defesa: 28/01/2021

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dra. Leonor Costa Maia - Orientadora
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Adriana Mayumi Yano-Melo – Examinador Interno
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Dra Indra Elena Escobar – Examinador Externo
Universidade Federal de Pernambuco

“As plantas não têm raízes, e sim micorrizas”

J. L. Harley

Aos meus pais, José Alexandre e Andréia e aos
meus irmãos Afonso e Ângelo Vinícius, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e por nos dar todos os dias a chance de fazer melhor e diferente.

Aos meus Pais, José Alexandre e Andréia Travassos, por sempre acreditarem em mim e por fazerem o possível e o impossível para me proporcionar as melhores condições de estudo, e ao meu irmão, Afonso Travassos, pelo apoio incondicional.

À Amanda Silva, a companheira que escolhi para trilhar esse caminho tortuoso e incerto que é a vida e que sempre aguentou meus pequenos ataques de ansiedade por conta da pesquisa. Sem você, não estaria aqui. Amo-te.

À minha orientadora, profa. Leonor Costa Maia, que me acolheu como orientando e sempre foi solícita e paciente para me mostrar os caminhos da ciência e da prática experimental com fungos micorrízicos arbusculares. Meu muito obrigado.

A todos que fazem o Laboratório de Micorrizas do Depto de Micologia da UFPE: Indra Elena pelas comidas fit e pelos ensinamentos estatísticos; José Hilton pelo companheirismo em sala de aula e no laboratório; Inácio Pascoal pela ajuda nos experimentos, principalmente na coleta do solo em Itapirema (foi árduo); Joana Suassuna pelos conselhos e a Dani Magna e Larissa Vieira pela atenção, pelos ouvidos na hora das reclamações e pelo carinho de sempre. Sem vocês, eu não teria conseguido. Obrigado!

A toda equipe da Biofábrica Gov. Miguel Arraes do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) que gentilmente cedeu as mudas micropropagadas de cana-de-açúcar e o espaço para desenvolver este trabalho: André Dias, James, Dayanne, Pauliana Gomes, Taciana Lino, Gilmar Ferreira, Leandro, Gilson, Jaqueline, Flávia, Diógenes Virgínio, Diógenes Alexandre, Vilmae Bruno. Muito obrigado a todos vocês.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos que contribuíram para a minha formação e a expansão do meu conhecimento sobre o maravilhoso mundo da micologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), agradeço pela concessão da bolsa que permitiu o desenvolvimento desta pesquisa. Obrigado.

RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e sua produção impacta parcela significativa do setor agroindustrial brasileiro. Infelizmente, nos últimos anos a produtividade das safras vem decrescendo, em parte pela má qualidade do material propagado e a falta de renovação das lavouras. A técnica de micropropagação (ou cultura de tecidos vegetais) surge como possível solução e diversas ferramentas são utilizadas durante o processo a fim de otimizá-la, entre as quais a associação com micro-organismos benéficos. Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) favorecem o crescimento vegetal, formando associações simbióticas mutualísticas com diversas espécies. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar o padrão de desenvolvimento e a performance de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar (variedade B 8008) inoculadas com FMA durante o período de aclimatização e pós-aclimatização em condições de microcosmos. Como inóculo foram utilizados isolados de três espécies de FMA: *Claroideoglomus etunicatum*, *Gigaspora albida* e *Acaulospora longula*. O experimento foi dividido em duas etapas: i) inoculação micorrízica em cultivo protegido - aclimatização; ii) plantio em condições de microcosmos, simulando situação de campo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com nove tratamentos: três isolados de FMA + combinado dos três isolados + um filtrado de cada + controle absoluto (água da torneira) cada um com 20 repetições, totalizando 180 unidades amostrais. A aclimatização durou 45 dias quando se determinou: teores de clorofilas *a* e *b*, estatura e diâmetro do colmo de todas as mudas de cada tratamento. Metade das amostras sobreviventes foi retirada para análise da colonização radicular e biomassa e cinco unidades de cada tratamento foram destinadas ao plantio em microcosmos. Manteve-se o mesmo delineamento experimental no microcosmos (9 tratamentos), usando 5 repetições, no total de 45 amostras. Altura da planta, estatura e diâmetro do colmo, teor de clorofila *a* e *b* e o limbo da folha +3 foram analisados durante os quatro meses da segunda etapa, finalizada após 125 dias. Não se observou diferença estatística entre os tratamentos nas duas etapas do experimento. Ao final da aclimatização, as mudas do controle absoluto e as que receberam um combinado do filtrado apresentaram mais de 90% de taxa de sobrevivência, em comparação com os demais tratamentos, com taxa variando entre 55 e 75%. Houve tendência de maiores estatura e espessura do colmo no tratamento inoculado com o mix dos três FMA, e mudas que receberam filtrados acumularam mais clorofila. Em condições de microcosmos, as plantas micorrizadas por *G. albida* e *A. longula* apresentaram, respectivamente, maior crescimento em altura e estatura do colmo, em comparação aos demais tratamentos. A taxa de colonização, ao fim do período de microcosmos variou entre 32% e 53%, sendo este último valor registrado no tratamento com *G. albida*. Constatou-se a presença de glomerosporos de *Paraglomus occultum* em todos os tratamentos, ao final do período em microcosmos. No entanto, não houve diferença estatística entre os tratamentos com relação à densidade de esporos de *P. occultum* e assim consideram-se duas possibilidades: (a) a presença deste FMA não influenciou os resultados ou (b) contribuiu para a uniformidade das respostas. Conclui-se que, nas condições deste estudo, a inoculação com FMA não favorece o crescimento de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar da var. B 8008, sendo recomendada a ampliação dos experimentos com outras variedades.

Palavras-chave: Glomeromycota; *Saccharum officinarum*; filtrado da microbiota.

ABSTRACT

Brazil is the world's largest producer of sugarcane and its production impacts a significant portion of the Brazilian agroindustrial sector. Unfortunately, in recent years crop yields have been decreasing, partly due to the poor quality of the propagated material and the lack of crop renewal. The micropropagation technique (or plant tissue culture) appears as a possible solution and several tools are used during the process in order to optimize it, including the association with beneficial microorganisms. Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) increase plant growth, establishing symbiotic mutualistic associations with several species. In this context, the aim of this work was to determine the development pattern and performance of micropropagated sugarcane seedlings (variety B 8008) inoculated with AMF during the acclimatization and post-acclimatization period under microcosm conditions. Isolates of three AMF species were used as inoculum: *Claroideoglomus etunicatum*, *Gigaspora albida* and *Acaulospora longula*. The experiment was divided into two stages: i) mycorrhizal inoculation in greenhouse - acclimatization; ii) planting under microcosm conditions, simulating field conditions. The experimental design was completely randomized (CRD), with nine treatments: three isolates of AMF + combined of the three isolates + a filtrate from each + absolute control (tap water) each with 20 replicates, totaling 180 sample units. Acclimatization lasted 45 days when it was determined: content of chlorophyll a and b, stem diameter and height of the seedlings in each treatment. Half of the surviving samples were removed for analysis of root colonization and biomass and five units of each treatment were used for planting in microcosms. The same experimental design was maintained in the microcosm (9 treatments), with 5 replicates, totaling 45 samples. Plant height, stem height and diameter, chlorophyll a and b content, and leaf blade of +3 leaf were analyzed during the four months of the second stage, completed after 125 days. There was no statistical difference between treatments in the two stages of the experiment. At the end of the acclimatization, the seedlings of the absolute control and those that received a combined filtrate had a survival rate of more than 90%, in comparison with the other treatments, with a rate varying between 55 and 75%. There was a trend of greater height and thickness of the stem in the treatment inoculated with the mix of the three FMA and seedlings receiving filtrate accumulated more chlorophyll. In microcosm conditions, plants inoculated with *G. albida* and *A. longula* showed, respectively, greater growth in height and stature of the stem, compared to the other treatments. The colonization rate, at the end of the microcosm period, varied between 32% and 53%, the latter being registered in the treatment with *G. albida*. Glomerospores of *Paraglomus occultum* were found in all treatments, at the end of the period in microcosms. However, there was no statistical difference between the treatments in relation to the spore density of *P. occultum* and thus two possibilities are considered: (a) the presence of this AMF did not influence the results or (b) contributed to the uniformity of the responses. It is concluded that, under the conditions of this study, inoculation with AMF does not favor the growth of micropropagated sugarcane seedlings of var. B 8008, and the extension of the experiments with other varieties is recommended.

Key-words: Glomeromycota; *Saccharum officinarum*; microbiota filtrate

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Plantas de cana de açúcar da variedade B 8008 em condições de microcosmos.....	16
Figura 2 - Diferentes formas de micropropagação. (A) Calo mixotrófico de <i>Catharanthus roseus</i> . (B) Calo heterotrófico de <i>Catharanthus roseus</i> . (C) Cultura de células suspensas de <i>Catharanthus roseus</i> . (D) Regeneração de plantas de <i>Catharanthus roseus</i> a partir de calos. (E) Cultura radicular de <i>Catharanthus roseus</i> . (F) Embriogênese somática de <i>Coffea canephora</i> . (G) Protoplasmas de <i>Coffea canephora</i> . (H) Micropropagação de <i>Agave fourcroydes</i>	17
Figura 3 - (a) Arbúsculos de <i>Claroideoglomus etunicatum</i> e (b) vesículas de <i>Acaulospora longula</i> no córtex radicular de <i>Zea mays</i> (milho)	23
Figura 4 - Modo de inoculação do solo-inóculo durante a aclimatização em cultivo protegido.....	30
Figura 5 - Plantio de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar variedade B 8008 em microcosmos, após o período de aclimatização.....	32
Figura 6 - Teor de clorofila total (ICF) nas mudas micropropagadas de cana de açúcar após o período de aclimatização.....	37

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Análise química de nutrientes do solo utilizado para multiplicar os inóculos micorrízicos e no microcosmo e do Basaplant® florestal empregado como substrato para as mudas durante a aclimatização.....	29
Tabela 2 - Taxa de sobrevivência durante o período de aclimatização.	34
Tabela 3 - Médias da biomassa fresca e seca da parte aérea das mudas após o período de aclimatização	34
Tabela 4 - Média da biomassa fresca radicular das mudas após o período de aclimatização	35
Tabela 5 - Estatura do colmo e crescimento relativo de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar aos 28 e 43 dias do período de aclimatização	36
Tabela 6 - Diâmetro do colmo de mudas micropropagadas de cana de açúcar no 28º e 43º dias do período de aclimatização	36
Tabela 7 - Aumento relativo do teor de clorofila em mudas micropropagadas de cana de açúcar, comparando-se as leituras do 28º e 43º dias	37
Tabela 8 - Altura das plantas de cana de açúcar em microcosmos durante o período de quatro meses	38
Tabela 9 - Estatura e crescimento relativo do colmo de plantas de cana de açúcar em microcosmos durante quatro meses	39
Tabela 10 - Diâmetro e crescimento relativo do colmo em diâmetro de plantas de cana de açúcar nas quatro biometrias realizadas em período de microcosmos	39
Tabela 11 - Teores de clorofila a e b durante o período de microcosmos	40
Tabela 12 - Limbo da folha +3 de plantas de cana de açúcar durante o período em microcosmos	40
Tabela 13 - Colonização radicular de plantas de cana de açúcar durante o período em microcosmos	41
Tabela 14 - Biomassa seca e fresca da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar após quatro meses na condição de microcosmos.....	41
Tabela 15 - Número de glomerosporos de <i>Claroideoglomus etunicatum</i> , <i>Gigaspora albida</i> , <i>Acaulospora longula</i> e <i>Paraglomus occultum</i> no substrato de mudas de cana-de-açúcar micropropagadas inoculadas e cultivadas por 125 dias	42
Tabela 16 - Índice de correlação de Pearson entre os parâmetros biomassa fresca (BmF), biomassa seca (BmS), diâmetro do colmo (DC), número de esporos de <i>G. albida</i> (NE), limbo da folha +3 (LB), colonização radicular (Col), altura da planta (AP), estatura da planta (EP), Clorofila A (CloA) e Clorofila B (CloB) de mudas de cana-de-açúcar micropropagadas após 125 dias de microcosmos em condições ambientais.....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 A cultura da cana-de-açúcar.....	14
2.2 Técnica de micropropagação de tecidos vegetais e aclimatização de mudas micropropagadas..	16
2.3 Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e a Micropropagação de Culturas Vegetais.....	22
2.4 Micropropagação de cana-de-açúcar x FMA.....	24
2.5 Experimentos em Microcosmos.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Preparo do inóculo	28
3.2 Mudanças micropropagadas de cana-de-açúcar	28
3.3 Análise do solo e do substrato.....	28
3.4 Preparo dos filtrados do solo-inóculo	29
3.5 Delineamento experimental	29
3.5.1 Inoculação micorrízica e período de Aclimatização	30
3.5.2 Plantio em Microcosmos.....	31
3.6 Análise da biomassa seca e fresca.....	32
3.7 Colonização radicular	32
3.8 Crescimento relativo durante o microcosmos	32
3.9 Análise dos dados.....	33
4 RESULTADOS.....	34
4.1 Aclimatização.....	34
4.1.1 Taxa de sobrevivência.....	34
4.1.2 Biomassa fresca e seca	34
4.1.3 Estatura do Colmo	35
4.1.4 Diâmetro do colmo.....	36
4.1.5 Teor de Clorofila total	37
4.2 Microcosmos.....	38
4.2.1 Altura das plantas	38
4.2.2 Estatura e diâmetro do colmo	38
4.2.3 Biometria: Teor de Clorofila a e b da folha +3.....	39
4.2.4 Limbo da folha +3	40
4.2.5 Colonização radicular.....	40
4.2.6 Biomassa fresca e seca	41
4.2.7 Número de esporos por tratamento.....	41
4.2.8 Índice de correlação de Pearson	42
5 DISCUSSÃO.....	44
5.1 Aclimatização.....	44
5.2 Microcosmos.....	48
5.3 Índice de Correlação de Pearson	52
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e o seu plantio e a exploração de seus subprodutos, principalmente o etanol, representa 2% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, sendo uma das principais atividades econômicas do país. Mesmo com esse cenário favorável, a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) estimou que a produção bruta encolheria em torno de 0,1% na safra 2020/2021 (CONAB 2020).

Dentre os fatores que contribuem para essa redução estão: a qualidade do material propagado em campo, a idade das lavouras e a falta de renovação da cultura. Para todos esses problemas, a técnica de cultura de tecidos vegetais, também denominada micropropagação, pode ser uma alternativa viável. Nesta técnica, fragmentos de tecidos (geralmente tecidos meristemáticos) de uma planta de interesse (planta matriz ou planta mãe) são cultivados (*in vitro*) sob condições assépticas e controladas utilizando-se de meio de cultura com sais e hormônios vegetais para sua multiplicação.

Durante o processo de micropropagação, um único fragmento de tecido pode gerar dezenas e até centenas de novas mudas, preservando as características genéticas e fenotípicas da planta matriz, além de permitir a eliminação de possíveis doenças como algumas viroses. Ao final da etapa *in vitro*, a plântula é colocada sob cultivo protegido para que adquira vigor antes de ir a campo. Nesta etapa, de aclimatização, as plântulas sofrem com estresses bióticos e abióticos que podem acarretar perdas significativas e até inviabilizar a técnica (Chandra *et al.*, 2010). Por isso, vários procedimentos são estudados a fim de minimizar o estresse do transplântio em decorrência da mudança do estado *in vitro* para *ex vitro* e, conseqüentemente, aumentar a taxa de sobrevivência. A utilização de substratos alternativos (como fibras naturais e substratos comerciais) bem como a inoculação com micro-organismos benéficos são alguns dos procedimentos utilizados (Silva *et al.*, 2020b; Yilmaz; Çetiner; Ortaş, 2020).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), pertencentes ao Filo Glomeromycota (Tedersoo *et al.*, 2018), são micro-organismos encontrados naturalmente nos solos de diversos ecossistemas na forma de micélio e glomerosporos e têm a capacidade de formar associações simbióticas com raízes da maioria das espécies vegetais (Smith & Read, 2008). Vários estudos têm demonstrado a eficácia dos FMA em promover aumento de absorção de nutrientes e incremento de parâmetros morfológicos e fisiológicos (Yeasmin *et al.*, 2019), além de proteção contra estresses bióticos como ataque de fitopatógenos e nematoides (Gough *et al.*, 2020) sendo esses benefícios associados, em alguns casos, à estratégia de vida de cada espécie (Chagnon *et al.*, 2013). O aumento de comprimento radicular propiciado pelas hifas fúngicas permite às mudas micorrizadas obter

maior absorção de nutrientes quando comparadas às mudas não inoculadas, principalmente em condições de escassez (Basyal & Emery, 2020).

O aumento de tolerância e resistência contra nematoides, por sua vez, pode decorrer tanto de fatores físicos (a ocupação do FMA do mesmo nicho que o fitoparasita, gerando uma competição interespecífica) quanto de fatores fisiológicos como aumento da absorção de nutrientes e a indução, na planta, de uma resistência sistemática à colonização (Gough *et al.*, 2020). Por outro lado, a tentativa de estabelecimento da simbiose micorrízica com o fraco sistema radicular que ainda está em desenvolvimento (Mathur *et al.*, 2008) pode acarretar mais prejuízos do que benefícios ao hospedeiro. Portanto, a utilização de diferentes espécies de FMA com diferentes estratégias de sobrevivência é importante para selecionar o melhor inoculante para determinada espécie vegetal.

Nesse contexto, a hipótese levantada foi que a inoculação com FMA beneficia mudas micropropagadas de cana-de-açúcar durante a aclimatização, sendo esse benefício estendido às condições de produção em larga escala em biofábricas. Assim, o objetivo geral desta pesquisa foi determinar o padrão de desenvolvimento e a ‘performance’ de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar inoculadas com FMA, durante o período de aclimatização e pós-aclimatização em condições de microcosmos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), planta da família Poaceae, é conhecida por sua versatilidade, gerando produtos como etanol, bagaço de cana e açúcar refinado. Com aproximadamente 642,7 milhões de toneladas produzidas na safra 2019/20 o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (CONAB, 2019) e se destaca como o maior exportador de açúcar e o segundo maior produtor de etanol (Antunes *et al.*, 2015).

Essa cultura, considerada uma das mais importantes, gera renda e milhares de empregos. É semiperene por possuir vários ciclos de desenvolvimento. Cada ciclo de plantio pode durar 12 ou 18 meses, dependendo da região, sendo até cinco ciclos (cortes) o recomendando para que seja necessária uma reformulação na área plantada com novas mudas de procedência. Ao término do primeiro ciclo de plantio (cana-planta), a cana-soca (segundo corte) passa a ter um ciclo de 12 meses e, a partir disso, cada novo plantio é realizado com a soqueira do anterior, sendo esse processo denominado rebrota da soqueira (Antunes *et al.*, 2015).

Disseminada na Europa e na Ásia, a cana-de-açúcar encontrou na América, de clima tropical e subtropical, o ambiente ideal para o seu desenvolvimento. Cristóvão Colombo foi o responsável por trazer as primeiras mudas para São Domingo que, de lá, se espalharam para Cuba e as Ilhas do Caribe (Machado, 2012). No Brasil, a cana-de-açúcar desembarcou no séc. XVI, em 1532, pelas mãos do português Martim Afonso de Souza que construiu o primeiro engenho brasileiro em São Vicente, litoral de São Paulo e fez com que a cana-de-açúcar se tornasse a primeira atividade econômica no Brasil (UNICA, 2019). Ao longo das décadas seguintes, a cultura canavieira foi se fortalecendo e sendo desenvolvida em outros lugares do país. Em Pernambuco, por exemplo, no final do Séc. XVI existiam 66 engenhos, a maior concentração na região (Machado, 2012). O Governo, ao perceber a importância do setor para o desenvolvimento econômico nacional, pontualmente estimulou e modernizou a produção.

Com um forte apego ao desenvolvimento consciente, a indústria sucroalcooleira brasileira tem como base o desenvolvimento sustentável, e tenta conciliar as preocupações com relação ao meio ambiente e os efeitos danosos da utilização de combustíveis fósseis (CONAB, 2018). Atualmente as regiões produtoras se concentram no Centro-Sul e no Nordeste do país. O Estado de São Paulo é o maior produtor (342,6 milhões de toneladas na safra 2019/20), sendo Alagoas (17,4 milhões de toneladas na safra 2019/2020) o maior produtor da região Nordeste, seguido de Pernambuco (12,5 milhões de toneladas produzidas na safra 2019/20). Neste Estado, as áreas

cultiváveis se restringem à zona da mata e ao litoral e apresentam declives significativos, tornando inviável a colheita mecânica (CONAB, 2018).

As cultivares de cana-de-açúcar podem ser divididas em três grandes grupos: (1) cultivares tradicionais, (2) semelhantes selvagens e (3) cultivares modernas (Grivet *et al.*, 2004). Os híbridos modernos são resultado de cruzamentos interespecíficos de *Saccharum officinarum* e *S. spontaneum* e são constituídos de aproximadamente 80% e 10% de cada um dos progenitores, respectivamente, sendo os 10% restantes uma recombinação entre os dois genomas (D'hont *et al.*, 1996 *apud* Crystian *et al.*, 2018).

No Brasil, programas de melhoramento genético realizam cruzamento entre variedades em busca de selecionar as melhores características para o campo. A posição de líder mundial do setor é resultado não apenas do clima propício e do manejo das culturas, mas também está relacionado ao alto desempenho das variedades comerciais desenvolvidas nos três principais programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar do país: a RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético), o CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) e o IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) (Manechini *et al.*, 2018) que podem ser identificadas pelas siglas RB (República do Brasil), CTC e IAC/SP respectivamente. Vale ressaltar, ainda, que os genótipos desenvolvidos através destes cruzamentos são mais resistentes a fatores bióticos e abióticos (Crystian *et al.*, 2018).

A cana-de-açúcar comercializada no Brasil e no mundo geralmente é fruto de híbridos de diferentes genótipos. Esses cruzamentos têm por finalidade o incremento da produtividade ao selecionar características de interesse (maior perfilhamento, mais espessura do colmo, resistência à seca, teor de açúcar, entre outras) de diferentes espécies e reuni-las em um único espécime.

A variedade B 8008, desenvolvida pela RIDESA Brasil, (Figura 1) é fruto do cruzamento das variedades B73348 e B74172 e possui porte ereto, média quantidade de folhas e coloração verde-clara, sendo o comprimento e a largura da lâmina foliar médios (Simões-Neto, 2008). Com produção agrícola e teor de açúcar altos, a variedade apresenta boa brotação na segunda colheita (cana soca), bom perfilhamento e maturação média tardia. É ideal para áreas de várzea e solos com umidade adequada (Simões-Neto, 2008), como as áreas de várzea do Litoral Norte, Litoral Sul e Mata Sul.



Figura 1. Plantas de cana de açúcar da variedade B 8008 em condições de microcosmos

Fonte: o autor

Para a safra 2020/2021, a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) prevê um incremento de 3,5% na produção de cana-de-açúcar que pode chegar a 665,1 milhões de toneladas (CONAB, 2020). Porém, esse cenário positivo é recente. Em safras anteriores, as previsões foram de queda na produção. Na safra 2018/2019, por exemplo, a previsão era uma redução de 2,8% na produção (CONAB, 2018) e na safra 2019/2020, a previsão de decréscimo era de 1,3% (CONAB, 2019). Condições climáticas e a qualidade do material podem ser fatores interferentes. Quanto ao material propagado em campo, o envelhecimento das lavouras e a falta de renovação das mesmas ocasiona um baixo índice de renovação o que, por sua vez, acarreta em aumento da idade média das lavouras (CONAB, 2018 V.4 Levantamento Abril/2018). Nesse sentido, alternativas para o fornecimento de material de qualidade vêm sendo estudadas e desenvolvidas. A micropropagação de tecidos vegetais é uma delas.

2.2 Técnica de micropropagação de tecidos vegetais e aclimatização de mudas micropropagadas

A micropropagação de tecidos, também conhecida como cultura de tecidos vegetais, é a ciência do cultivo de células, tecidos e órgãos isolados da planta matriz em meio artificial sob condições assépticas. Nos últimos anos, a cultura de tecidos vegetais tem se tornado uma ferramenta

cada vez mais importante tanto na área científica quanto na área comercial (George, 2008; Kumar; Reddy, 2011), sendo a clonagem *in vitro* uma das mais recentes e extensivas aplicações comerciais (Loyola-Vargas; Ochoa-Alejo, 2018). Dependendo da estrutura da planta a ser utilizada para o

cultivo, a mesma pode ser denominada de cultura de células (suspensão de células, células gaméticas e cultura de protoplasmas), cultura de tecidos (calos e diferentes tecidos) ou cultura de órgãos (qualquer órgão vegetal como embrião zigótico, raízes, brotos e anteras, entre outros), sendo cada tipo utilizado para determinada aplicação biotecnológica (Loyola-Vargas; Ochoa-Alejo, 2018).

Ao longo do texto, o termo micropropagação e cultura de tecidos vegetais serão empregados como sinônimos para designar a técnica de cultivo *in vitro* de espécies vegetais. A figura 2 mostra diferentes formas/estágios do desenvolvimento de culturas para a micropropagação.

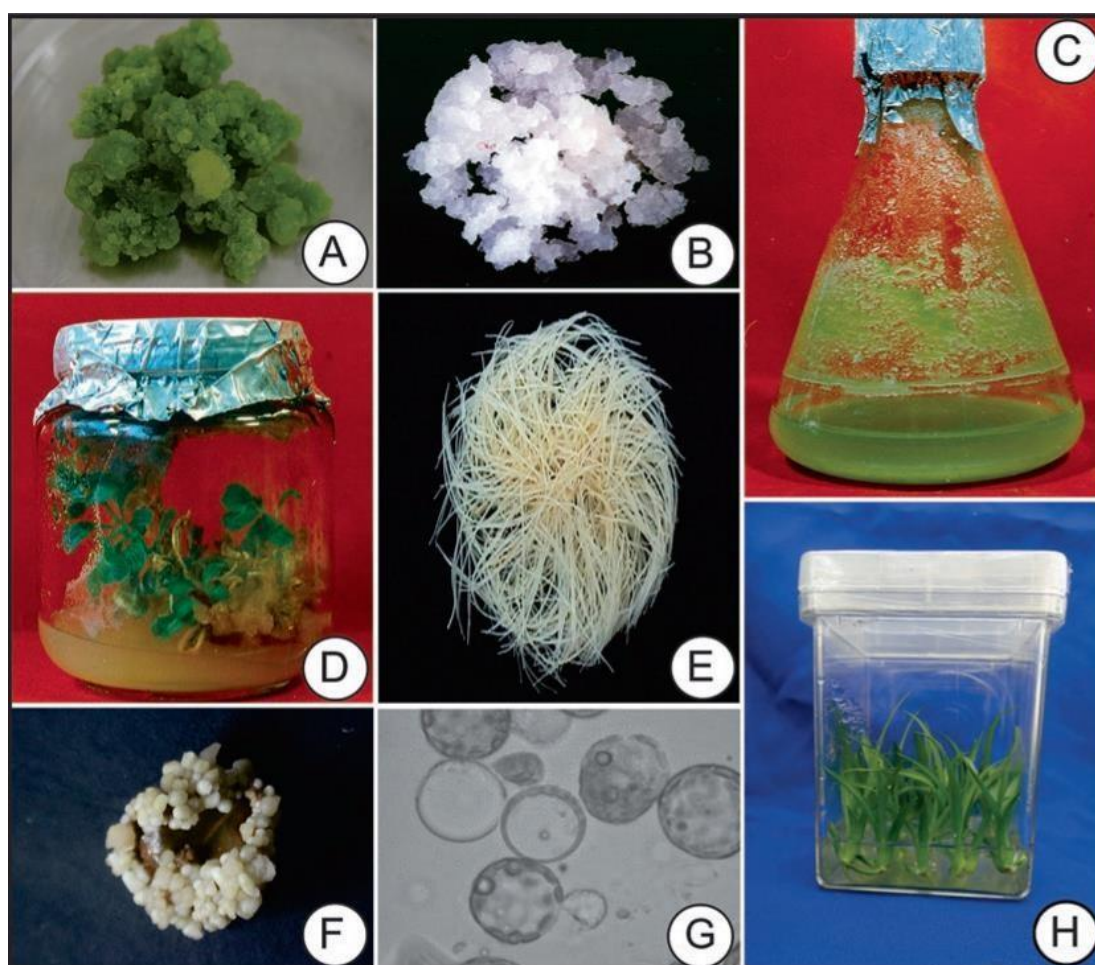


Figura 2. Diferentes formas de micropropagação. (A) Calo mixotrófico de *Catharanthus roseus*. (B) Calo heterotrófico de *Catharanthus roseus*. (C) Cultura de células suspensas de *Catharanthus roseus*. (D) Regeneração de plantas de *Catharanthus roseus* a partir de calos. (E) Cultura radicular de *Catharanthus roseus*. (F) Embriogênese somática de *Coffea canephora*. (G) Protoplasmas de *Coffea canephora*. (H) Micropropagação de *Agave fourcroydes*

Fonte: Loyola-Vargas; Ochoa-Alejo, 2018

De uma forma mais específica, essa técnica é utilizada para a seleção e propagação *in vitro* de genótipos de interesse (Johns, 2018). A ciência que pauta a técnica de cultivo *in vitro* está baseada na capacidade das células vegetais sofrerem regeneração (até certo ponto). O pioneiro nesse

tipo de estudo foi o botânico alemão Gottlieb Haberlandt que, em 1902, tornou público seu estudo com células vegetais isoladas, se tornando a primeira pessoa a iniciar o cultivo a partir de células isoladas totalmente diferenciadas em 1898 (Haberlandt, 1902; Dagla, 2012). Mesmo não tendo sucesso inicialmente, contribuiu de maneira significativa para pesquisas futuras.

A partir de então, os estudos foram sendo aprofundados e as técnicas refinadas. Em 1969, Krikorian e Berquam, ao revisarem o trabalho pioneiro de Haberlandt, revelaram que o mesmo, embora não tivesse tido sucesso no isolamento de células funcionalmente diferentes, foi capaz de prever que o cultivo de embriões de espécies vegetais de maneira artificial era possível. Dessa forma, portanto, foi possível determinar o conceito de totipotência celular bem como sugerir que o cultivo de células vegetais isoladas em meio nutritivo era possível (Thorpe, 2007). A totipotência celular pode ser definida como a capacidade demonstrada por uma célula (ou grupo celular) de gerar um indivíduo adulto e capaz de se reproduzir (Condic, 2014), sendo a base teórica da cultura de tecidos vegetais.

Existem condições básicas e necessárias para o desenvolvimento da técnica de cultivo *in vitro*. Loyola-Vargas e Ochoa-Alejo (2018) citam quatro delas: (1) seleção do explante apropriado a partir de uma planta vigorosa e saudável; (2) eliminação da contaminação microbiana da superfície do explante; (3) inoculação do explante em meio de cultivo apropriado; (4) fornecimento de condições ambientais apropriadas e controladas ao explante. Para culturas que serão expostas às condições de campo, um estágio de adaptação é necessário em casa de vegetação. Esse estágio é denominado aclimatização.

Nesse mesmo sentido, Kumar e Reddy (2011) ao revisar estudos pioneiros na cultura de tecidos vegetais, como os desenvolvidos por Murashige (1974) e Murashige e Skoog (1972), propuseram a divisão do processo de micropropagação em cinco estágios:

- Fase 0: crescimento da planta-mãe (planta matriz) sob condições higiênicas. Produção de mudas em casa de vegetação;
- Fase I: início da cultura. Essa fase é destinada a produção de culturas axênicas. Envolve a seleção dos melhores explantes, desinfestação dos mesmos e cultivo sob condições assépticas.
- Fase II: rápida regeneração e multiplicação de numerosos propágulos (fase de multiplicação). Massas de tecido são repetidamente repicadas sob condições assépticas em novos meios de cultivo que fomentam a proliferação de novos propágulos. As culturas podem tanto fornecer novos brotos para os subcultivos subsequentes, quanto o material necessário para manter o estoque. A multiplicação pode ocorrer tanto de maneira estática quanto por imersão temporária no meio de cultivo.

- Fase III: alongamento e indução do desenvolvimento radicular (fase de enraizamento). Tem por objetivo o estabelecimento de mudas totalmente desenvolvidas. É o último estágio *in vitro* antes das microplantas serem transferidas para condições *ex vitro*.
- Fase IV: transferência para condições *ex vitro* (aclimatização). Esse estágio ocorre em condições de casa de vegetação e tem por objetivo adaptar as microplantas às condições ambientais diferentes daquelas anteriores. Para muitas culturas é uma fase crítica, pois, a microplanta é exposta à diferentes fontes de estresses (bióticos e abióticos), podendo não se adaptar à mudança que, por sua vez, pode acarretar perdas significativas na produção (Chandra *et al.*, 2010; Villa *et al.*, 2015).

A cultura de meristemas, a cultura de raízes isoladas, e a cultura de embriões, são alguns exemplos de técnicas que se utilizam do crescimento organizado de células vegetais, enquanto a cultura de calos embrionários, a suspensão celular e a cultura de protoplastos são baseadas no crescimento desorganizado (George, 2008).

A cultura de meristemas, por exemplo, consiste no cultivo de ápices de brotos muito pequenos cada um com um ou dois primórdios foliares. Geralmente cada broto dará origem a uma única brotação (George, 2008). Em cana-de-açúcar, culturas de meristema apical foram utilizadas para a propagação de diversas variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) em estudos avaliando o uso de reatores para aumento na produção de mudas de cana micropropagadas (Silva *et al.*, 2020a). Em uma variação deste, gemas de ápices de brotos são utilizadas para dar início à cultura meristemática. Na micropropagação do abacaxi (Reinhardt *et al.*, 2018) e de cana-de-açúcar (Ajadi *et al.*, 2018) geralmente são utilizados os ápices caulinares para dar início ao processo de multiplicação.

Na cultura de raízes isoladas, emprega-se um cultivo de raízes separadas do broto. Um sistema radicular ramificado pode ser obtido. O cultivo de embriões, por sua vez, ocorre por meio da utilização de embriões zigóticos fertilizados ou não, onde os mesmos são removidos das sementes ou de frutos em desenvolvimento e cultivados *in vitro* até se tornarem plântulas (George, 2008).

A cultura de calos embrionários, um tipo de crescimento desorganizado, consiste no crescimento e na manutenção de massas celulares altamente desorganizadas obtidas a partir do crescimento desordenado de pequenos órgãos vegetais, partes de algum tecido vegetal ou células previamente cultivadas (George, 2008). Em algumas culturas, como a de coco, a micropropagação por indução de calos embriogênicos permite a produção de plantas de alta qualidade e com fitossanidade comprovada (Oropeza *et al.*, 2016). No cultivo por suspensão celular, células vegetais e pequenos aglomerados de células ficam dispersos em um meio líquido aerado e em constante

agitação, enquanto no cultivo de protoplastos a cultura é realizada com células vegetais isoladas, sem a parede celular (George, 2008).

Plantas originadas da micropropagação são denominadas microplantas (ou vitroplantas) e, basicamente, podem ser obtidas de três formas: (a) a partir de brotos pré-existentes ou brotações primordiais (meristemas) que são induzidos a crescer e multiplicar; (b) posterior à morfogênese da parte aérea, quando brotações são induzidas a se formarem em tecidos não organizados ou diretamente nos tecidos advindos da planta-matriz; (c) por meio de embriões somáticos que podem se desenvolver em mudas da mesma maneira (George, 2008): esse processo é denominado embriogênese somática.

A geração de plantas transgênicas com características industriais e agronômicas específicas, o melhoramento de plantas e culturas, a produção de material vegetal saudável e de alta qualidade bem como a preservação e a conservação de germoplasmas de culturas vegetais propagadas vegetativamente e o resgate de espécies de plantas em perigo de extinção são algumas das aplicações e dos benefícios advindos da técnica de micropropagação (Loyola-Vargas; Ochoa-Alejo, 2018). Devido a esses benefícios, a cultura de tecidos vegetais vem sendo empregada com relativo sucesso nos últimos anos, em diferentes espécies vegetais. A utilização da micropropagação aliada a poderosas técnicas moleculares, por exemplo, foi capaz de melhorar a produção de moléculas farmacêuticas de plantas medicinais além de criar espécies personalizadas com diferentes perfis de metabólitos secundários (Niazian, 2018). Em espécies tropicais, a micropropagação é utilizada para estudar efeitos fisiológicos e o padrão de desenvolvimento (Nadhakumar *et al.*, 2018), investigar e melhorar protocolos/condições de multiplicação (Loyola-González *et al.*, 2019), bem como regenerar culturas em escala industrial (Ajadi *et al.*, 2018).

Estima-se que, mundialmente, o mercado de mudas micropropagadas movimente bilhões de dólares na Holanda, Inglaterra, Alemanha, Índia, Estados Unidos e em outros países (Cid, 2010). No Brasil, porém, ainda existem entraves com relação às instituições que produzem mudas micropropagadas. A infraestrutura é limitada e a disponibilidade de protocolos de multiplicação escassa para alguns grupos de plantas, sendo o custo da muda micropropagada ainda elevado se comparado à mudas convencionais (Rocha, 2013).

Entre as frutíferas, as principais culturas micropropagadas nacionalmente são banana, abacaxi, morango, maçã, amora, uva, maracujá, mirtilo, marmelo, pera, guaraná, figo e açaí, com destaque para as mudas de bananeiras, de abacaxi e de morango que, em 2012, eram produtos de 23, 13 e 9 biofábricas respectivamente (Carvalho *et al.*, 2012). Em levantamento realizado sobre a situação da micropropagação no Brasil, Carvalho e colaboradores (2012) ressaltaram que a principal aplicação prática para a cultura de tecidos vegetais é a multiplicação de planta ornamentais

(como orquídeas, bromélias e aráceas) devido, em parte, ao alto valor agregado, sendo a atividade de maior importância nos laboratórios comerciais de micropropagação.

As características do meio de cultivo (Campos *et al.*, 2018) e as condições de umidade e luminosidade (Arencibia *et al.*, 2013) são fatores que podem ser determinantes para o sucesso da multiplicação de cana-de-açúcar, como observado por Lu *et al.* (2019) ao desenvolverem técnicas de cultivo de baixo custo para a produção de cana micropropagada. O aumento da eficiência para a micropropagação de cana também foi observado por Silva *et al.* (2020a), com o uso de diferentes técnicas de iniciação de cultura de tecidos e de biorreatores. Esses autores observaram que plântulas de cana micropropagadas em condições *in vitro* aprimoradas alcançaram alta eficiência de adaptação da planta às condições de campo.

Os fitohormônios, componentes essenciais em todo meio de cultivo, desempenham papel primordial e a adição, a remoção e até mesmo a concentração destes podem influir diretamente no resultado final da micropropagação. A importância da relação entre as auxinas e as citoquininas (grupos de fitohormônios) no estímulo/inibição de raízes e brotos já foi bem definida por Skoog e colaboradores desde os anos 1950 (Cardoso *et al.*, 2018). Nos anos 1960, Skoog e Murashige, estudando a multiplicação *in vitro* de tabaco, estabeleceram o meio de cultivo MS, que até hoje é utilizado como base para a micropropagação de diversas culturas vegetais (Cardoso *et al.*, 2018).

Após a fase de multiplicação *in vitro*, as mudas micropropagadas necessitam de um período de adaptação antes de serem levadas ao campo. Esse período, denominado genericamente de aclimatização, é marcado por mudanças morfológicas (crescimento em altura, espessamento do colmo/caule) e fisiológicas (passagem da condição heterotrófica para autotrófica, por exemplo) (Da Silva *et al.*, 2017) que causam diversos estresses e podem acarretar perdas significativas. Por todos esses fatores, o período de aclimatização é uma das etapas mais importantes na adaptação estrutural e fisiológica na produção de plântulas (Kapoor *et al.*, 2008)

Algumas culturas são mais sensíveis que outras e a duração do período de aclimatização pode diferir. Na micropropagação de *Zelkova sicula* (arbórea rara ameaçada de extinção, endêmica do sudeste da Sicília, Itália), por exemplo, existe um período de pré-aclimatização que, uma vez superado pode acarretar em uma taxa de sobrevivência de apenas 7,9% mesmo após 84,2% das mudas serem enraizadas e 69,8% serem pré-aclimatizadas (Carra *et al.*, 2019). Mesmo com um percentual tão baixo de mudas aclimatizadas, a taxa de sobrevivência em campo após dois anos chegou a 96,1%, demonstrando que a técnica de micropropagação também pode ser uma alternativa de propagação de espécies ameaçadas de extinção.

Os estudos com mudas micropropagadas de cana-de-açúcar geralmente objetivam otimização de protocolos para determinada variedade. Alterações na quantidade de fitohormônios do meio de cultura e utilização de diferentes substratos na aclimatização (Redae e Ambaye, 2018)

bem como a manipulação de variáveis ambientais - o tipo de iluminação, por exemplo - (Ferreira *et al.*, 2017) ou temperatura e umidade (Yadav *et al.*, 2020) são alguns aspectos experimentais recorrentes em estudos dessa natureza.

2.3 Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e a Micropropagação de Culturas Vegetais

As associações micorrízicas, no sentido amplo do termo, são caracterizadas como simbioses mutualísticas entre plantas e fungos, de maneira mais específica entre as raízes e as hifas. Desempenham importante papel em ecossistemas naturais (Pedone-Bonfim *et al.*, 2018; Alizadeh, 2011) bem como em ambientes dinâmicos e em processo de maturação (Smith; Read, 2008), além de serem responsáveis por manter a produtividade de plantas em habitats naturais e agrícolas (Brundrett; Tedersoo, 2018).

A simbiose micorrízica é de fato um aspecto muito importante da vida vegetal; tão importante que, décadas atrás, J. L. Harley, afirmava que ‘plantas não tem raízes, elas têm micorrizas’, baseando-se na presença de associação micorrízica em praticamente todas as plantas terrestres (Berbara *et al.*, 2006), desde briófitas até angiospermas (Smith e Read, 2008).

Com base em critérios morfológicos e levando em consideração as alterações no tecido radicular das plantas hospedeiras, as micorrizas são classificadas em quatro tipos principais: micorrizas arbusculares (MA), ectomicorrizas (EcM), micorrizas ericóides (ErM) e micorrizas orquidóides (OrM), sendo a micorriza arbuscular responsável por mais de 70% das ocorrências (Brundrett; Tedersoo, 2018).

As micorrizas arbusculares são associações entre fungos do filo Glomeromycota (Tedersoo *et al.*, 2018) e raízes de plantas de diversos grupos vegetais. Os fungos que realizam esse tipo de associação são denominados fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e são o foco da presente pesquisa. Os FMA, simbiontes obrigatórios, são assim designados devido sua estrutura característica: os arbúsculos (Figura 3a), formados no interior das células do córtex radicular das plantas hospedeiras (Smith; Read, 2008). As vesículas (Figura 3b) também são características de algumas espécies de FMA.

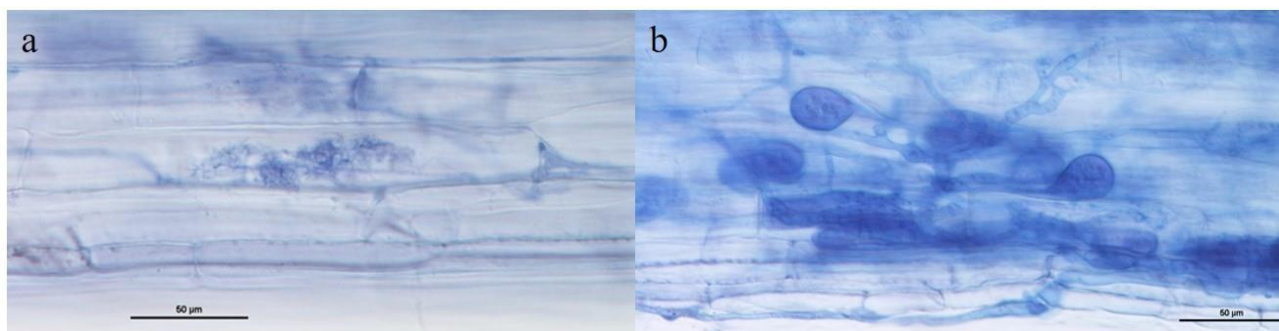


Figura 3. Arbúsculos de *Claroideoglomus etunicatum* (a) e vesículas de *Acaulospora longula* no córtex radicular de *Zea mays* (milho) (b).

Fonte: o Autor

A presença de arbúsculos e/ ou vesículas no interior das células corticais da raiz e a presença de hifas cenocíticas são sinais da colonização por FMA, que promovem vários benefícios para a planta hospedeira. Estima-se que em ecossistemas naturais as plantas obtêm 90% da demanda de fósforo e 80% da demanda de nitrogênio através da associação micorrízica (Van Der Heijden *et al.*, 2008).

O incremento nutricional, principalmente de fósforo (P), é um dos mais importantes efeitos positivos da associação micorrízica arbuscular. Os mecanismos exatos pelos quais isso ocorre ainda não são totalmente conhecidos. Acredita-se, porém, que o fósforo inorgânico (Pi), ao ser absorvido pelo micélio extrarradicular (MER) pode ter dois destinos. O primeiro é o reabastecimento do pool de Pi metabolicamente ativo nas hifas os quais serão utilizados, por exemplo, para síntese de fosfolipídeos, DNA, RNA e proteínas, ou pode ser convertido em polifosfatos de cadeia longa ou curta (Poli-P) (Mensah *et al.*, 2015). Os Poli-P, por sua vez, possuem um importante papel tanto no armazenamento de P na hifa fúngica quanto no seu deslocamento do MER para o micélio intrarradicular (MIR) (Hijikata *et al.*, 2010) que, conseqüentemente, será utilizado pela planta hospedeira. O aumento da área de absorção devido ao micélio extrarradicular também é um fator que favorece a absorção de nutrientes minerais como fósforo e nitrogênio (Wang *et al.*, 2017).

Em contrapartida, o fungo MA se beneficia do carbono fixado fotossinteticamente pela planta hospedeira. Estima-se que mais de 20% do C fixado pela planta seja transferido para o fungo (Wright *et al.*, 1998), sendo um importante promotor da transferência de P e N na simbiose (Fellbaum *et al.*, 2014). Além disso, evidências sugerem que o carbono residual liberado no ambiente pelos FMA pode regular o crescimento de bactérias solubilizadoras de fósforo (BSP) auxiliando ainda mais a mobilização de fósforo para a planta hospedeira (Zhang *et al.*, 2016).

Níveis elevados de fósforo, porém, podem inibir a germinação dos esporos por limitar a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de carotenoides e de estrigolactona (molécula de sinalização vegetal que pode regular o crescimento de gemas laterais) (Wang *et al.*, 2017). Deve-se, portanto, ter certa cautela ao utilizar os FMA em conjunto com

adubação fosfatada. Em alguns casos a inoculação micorrízica auxilia na economia de adubação fosfatada (Guleri *et al.*, 2005). Inoculação de alfarrobeira (*Ceratonia siliqua* L.) com fungos MA em solos com baixo nível de fósforo (entre 0 e 25 mg P Kg⁻¹), demonstraram efeitos positivos como o aumento da produção de biomassa, enquanto que altos teores de P (100 mg P Kg⁻¹) inibiram a colonização radicular e afetaram negativamente a performance da planta (Essahibi *et al.*, 2019). Em cana-de-açúcar, a concentração de 74 mg P Kg⁻¹ também mostrou ser inibitória para a colonização radicular (Kelly *et al.*, 2006).

Além dos benefícios nutricionais, a micorrização é capaz de aliviar os efeitos de estresses abióticos (Mohammadi *et al.*, 2019; Hashem *et al.*, 2016) e conferir proteção contra pragas (Jaffuel *et al.*, 2019), auxiliando o estabelecimento da cultura tanto em condições naturais quanto em condições experimentais. Entretanto, em alguns casos, a presença do fungo pode aumentar a população de uma determinada praga (nematoides de raiz, p. ex.) sem, necessariamente, prejudicar o vegetal (Brito *et al.*, 2018).

No processo de micropropagação os fungos MA são utilizados geralmente na fase de aclimatização. Isso porque durante a fase *in vitro* as plântulas não possuem raízes, sendo o enraizamento realizado, na maioria das culturas, no final da etapa de multiplicação, em uma etapa à parte, logo antes da aclimatização (Murashige, 1974). Durante a aclimatização, as mudas micropropagadas micorrizadas em geral possuem mais folhas, atingem maior altura, apresentam maior biomassa seca e fresca (radicular), maior absorção de P e maior teor de clorofila se comparadas com mudas não micorrizadas (Romero-Munar *et al.*, 2018; Ortas *et al.*, 2017).

Apesar da utilização da inoculação micorrízica durante a aclimatização, poucos estudos têm avaliado os efeitos em campo. Resultados demonstram que mudas micropropagadas micorrizadas, além de apresentar maior altura, biomassa e teor de clorofila (Tauler e Baraza, 2015), também apresentam diminuição dos efeitos do estresse pós-transplante com melhoria do rendimento e da qualidade nutricional das culturas em campo (Copetta *et al.*, 2020).

2.4 Micropropagação de cana-de-açúcar x FMA

A cana-de-açúcar comercial é propagada tradicionalmente de maneira vegetativa. Nesse tipo de propagação, utilizada desde a chegada da cultura ao Brasil, colmos contendo três a quatro nós são seccionados e plantados em sucros na posição horizontal (Hasner *et al.*, 2019). Cada nó contém uma gema que pode dar origem a uma nova planta. Apesar de simples e de possuir um custo-benefício viável, nesse tipo de multiplicação a cana-de-açúcar necessita de, pelo menos, 12 meses para estar pronta para a primeira colheita (cana-planta), além dessa técnica não ser capaz de eliminar doenças virais (Snyman *et al.*, 2018).

Nesse contexto, métodos alternativos como a micropropagação vêm ganhando espaço, impulsionados em parte, pela constante busca do agronegócio por técnicas modernas que objetivam aumentar a produção e a eficiência das culturas (Carvalho *et al.*, 2016). Dentre outros benefícios, a micropropagação é capaz de enriquecer a produção de metabólitos secundários (Shasmita *et al.*, 2017) e de produzir mudas livre de patógenos (Kopper *et al.*, 2020) além de estar revolucionando o agronegócio ao redor do mundo, permitindo a produção em larga escala de culturas de interesse econômico (Shukla *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2020a).

Em 2008 existiam apenas três instituições que produziam mudas de cana-de-açúcar micropropagadas. Em 2012 eram sete e em 2015 esse número saltou para 14 entidades, sendo cinco destas produtoras exclusivamente de cana-de-açúcar (Carvalho *et al.*, 2012, 2016).

A cana-de-açúcar é conhecidamente uma espécie propícia à colonização micorrízica (Aguilar *et al.*, 2018) e consegue se beneficiar da associação simbiótica de diversas maneiras. Resistência ao estresse hídrico, aumento da produtividade (Juntahum e Boonlue, 2018), aumento na absorção de nitrogênio (Claassens *et al.*, 2017; Juntahum e Boonlue, 2018), fósforo e potássio (Juntahum e Boonlue, 2018), além de proteção contra patógenos (Claassens *et al.*, 2017) são alguns deles. Porém, assim como observado por Aguilar e colaboradores (2018), estudos mais aprofundados sobre a interação de cana-de-açúcar e FMA são escassos. Ainda mais escassos são os estudos com FMA e mudas micropropagadas de cana-de-açúcar.

Pesquisas relacionando FMA com cana-de-açúcar são, em sua maioria, realizadas ou para investigar efeitos do incremento nutricional a partir de inóculos (absorção de fósforo, em sua maioria) (Gumiere *et al.*, 2019; Farias *et al.*, 2018) ou, em campo, para analisar a estrutura da comunidade microbiana presente na rizosfera (Azevedo *et al.*, 2014; Farias *et al.*, 2018; Juntahum; Boonlue, 2018), seja em áreas com rotação de culturas (Li *et al.*, 2019) ou em áreas fixas apenas com a monocultura de cana-de-açúcar (Claassens *et al.*, 2018). Vale ressaltar que em nenhum dos estudos supracitados os autores detalharam a origem do material sendo este, provavelmente, originado de propagação convencional (vegetativa).

Com relação à inoculação micorrízica em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar, os estudos são bastante escassos. Ao pesquisar no Scopus (<https://www.scopus.com/search/form.uri?display=basic>) e na PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/advanced>), duas grandes plataformas que reúnem periódicos científicos, utilizando como palavras-chave ‘micropropagation’, ‘arbuscular fungi’ e ‘sugarcane’ ou ‘Saccharum’, não foi obtido nenhum artigo como retorno da busca. Porém, ao utilizar as mesmas palavras-chave no Google Acadêmico (<https://scholar.google.com.br/>) e após filtrar os resultados (devido à grande quantidade de links e documentos inespecíficos), foi encontrado um artigo publicado no ano de 1991. Nesse artigo, Paula e colaboradores (1991)

investigaram os efeitos da associação entre *Glomus clarum* e *Acetobacter diazotrophicus* (bactéria associada à fixação biológica de nitrogênio) em espécies de batata-doce, cana-de-açúcar e sorgo. A cana-de-açúcar utilizada na pesquisa foi obtida por processo de micropropagação e a inoculação micorrízica, nas cultivares NA 56-79 e SP 792312, foi realizada na aclimatização com diferentes substratos, esterilizados ou não. Os pesquisadores chegaram à conclusão que a presença de esporos de FMA, na cana-de-açúcar, facilita a infecção por *A. diazotrophicus* e os efeitos nas plantas com a inoculação conjunta foram mais significativos se comparados com a inoculação de um ou de outro individualmente. É evidente que pesquisas com mudas micropropagadas de cana-de-açúcar inoculadas com FMA são escassas, demandando assim mais estudos nessa área.

Fica claro, portanto, que a pesquisa de inoculantes micorrízicos na produção de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar pode auxiliar ainda mais esse importante produto da economia regional e nacional.

2.5 Experimentos em Microcosmos

A rizosfera pode ser considerada um ambiente altamente diverso e ativo, na qual encontra-se o exsudato radicular das plantas (Cardon e Whitbeck, 2011), bem como uma microbiota própria composta de diversos micro-organismos que podem promover benefícios aos vegetais, dentre eles estão os fungos micorrízicos arbusculares (FMA). As raízes das plantas e os exsudatos radiculares, através da disponibilidade de fontes de carbono, podem alterar a comunidade rizosférica de forma a criar um micro-ambiente único (Weinert *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2017).

Em condições naturais uma única planta pode ser colonizada por diversas espécies de FMA (Smith e Read, 2008) e outros micro-organismos promovendo benefícios qualitativos e quantitativos. Em condições experimentais geralmente utiliza-se uma espécie de FMA (ou uma combinação de espécies) para avaliar os benefícios em determina espécie vegetal. Nestas condições, os parâmetros são controlados a fim de que seja possível a comparação após os resultados.

Nesse contexto, os ensaios em microcosmos possibilitam o estabelecimento de condições controladas a fim de correlacionar a dinâmica da comunidade microbiana com as variáveis analisadas (Licks, 2018).

O fato de cada rizosfera possuir uma microbiota única (através do exsudato radicular e outros fatores) deve ser levado em consideração no momento do planejamento de um experimento com inoculação micorrízica. Por serem biotróficos obrigatórios, os inóculos de FMA devem sempre ser produzidos na presença de uma planta hospedeira em culturas de microcosmos (pote/vaso) ou em culturas com órgãos radiculares (Fortin *et al.*, 2002). O solo-inóculo possui, além de raízes

colonizadas, fragmentos de hifas e esporos de FMA, diversos outros organismos como bactérias, fungos, protistas, algas e pequenos animais.

O desenvolvimento da simbiose radicular entre os FMA e as plantas hospedeiras desencadeia uma série de eventos que impactam a microbiota associada presente na rizosfera de tal forma que, a multiplicação de um solo-inóculo em condições experimentais, mesmo em potes/vasos separados com a mesma espécie de FMA e o mesmo hospedeiro, pode apresentar a microbiota associada bem distinta (Gryndler *et al.*, 2018). Alguns estudos demonstraram que a resposta da planta hospedeira ao filtrado (sem FMA) pode ser distinta daquela observada nos tratamentos inoculados (Koller *et al.*, 2013; Mardhiah *et al.*, 2016; Pizano *et al.*, 2017). Koller e colaboradores (2013), por exemplo, observaram que os protozoários da microbiota associada auxiliavam na translocação do N para as plantas hospedeiras através dos FMA. Dessa forma, os resultados observados na utilização de um solo inóculo podem não ser, necessariamente, provenientes apenas da simbiose radicular, mas, sim da microbiota associada a ele.

Nesse ponto surge a necessidade da utilização de um controle não micorrízico apropriado para que as incertezas sobre os resultados sejam as menores possíveis. Em uma perspectiva ideal, o substrato utilizado como inóculo deveria ser diferente do controle não micorrízico apenas pela presença do fungo MA, porém não é isso que normalmente acontece e, frequentemente, outros organismos são introduzidos no tratamento micorrízico (Gryndler *et al.*, 2018).

A utilização do filtrado do solo inóculo, portanto, é uma das alternativas utilizadas como controle não micorrízico para melhor interpretar os resultados experimentais. Entretanto, alerta Gryndler e colaboradores (2018), até mesmo esse controle é passível de falhas, uma vez que o processo de filtração se baseia no tamanho e na mobilidade dos componentes bióticos e previne a inclusão apenas de organismos relativamente maiores.

O filtrado do solo inóculo pode ser utilizado como controle não micorrízico, bem como uma alternativa para restabelecer a microbiota associada ao solo inóculo (Pereira *et al.*, 2017), uma vez que o processo de esterilização do solo, geralmente, também afeta os outros organismos da microbiota.

Dessa forma, a combinação de um experimento em microcosmos com o controle não micorrízico apropriado pode fornecer resultados seguros quanto à eficácia da inoculação micorrízica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo do inóculo

Para preparo do inóculo, foram utilizados isolados das espécies *Claroideoglossum etunicatum* URM - UFPE 03, *Gigaspora albida* URM-UFPE 11 e *Acaulospora longula* URM-UFPE 07 depositados no banco de inóculos do Laboratório de Micorrizas do Depto de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. De cada um dos potes com inóculo foram retirados 100 g e homogeneizados com 1 Kg de solo autoclavado (2 ciclos de 1h com 24h de repouso entre os dois) + 1 Kg de areia lavada em vasos com capacidade para 2 Kg. O solo autoclavado foi examinado por peneiramento úmido (Gerdemann; Nicolson, 1963) e centrifugação em água e sacarose a 50% (p/v) (Jenkins, 1964) e aparentemente não continha esporos viáveis de FMA. Sementes de milho (*Zea mays*) foram desinfestadas em uma solução de hipoclorito de sódio 1:1 (v/v) durante 10 minutos, lavadas e colocadas nos vasos, em triplicata, sendo preparados nove vasos no total. Os vasos permaneceram em casa de vegetação por quatro meses e ao final desse período, a parte aérea foi descartada e o solo com inóculo armazenado para posterior contagem da quantidade de esporos. Os inóculos ficaram armazenados sob refrigeração durante seis meses até o momento de sua utilização.

3.2 Mudanças micropropagadas de cana-de-açúcar

Mudas micropropagadas de cana-de-açúcar foram obtidas por meio de organogênese direta a partir de meristema apical de matrizes da variedade B-8008 produzidas e cedidas pela Biofábrica Gov. Miguel Arraes (BGMA) do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE. O CETENE também foi o local de realização do experimento (aclimatização e microcosmos) e fica localizado em Recife – PE (8°04'03"S e 34°55'00"W). O clima local, segundo a classificação de Köppen e Geiger é Am com temperatura média anual de 25,8 °C e precipitação média de 1804 mm (<https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/pernambuco/recife-5069>).

3.3 Análise do solo e do substrato

O solo e o substrato comercial utilizados no experimento foram enviados para análise na Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina (EECAC) pertencente à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Os parâmetros analisados e os valores obtidos se encontram na tabela 1, a seguir. De acordo com estudos anteriores, o solo utilizado é do tipo Latossolo Amarelo Distrófico Agrossólico, possuindo uma textura areia-franca (Santana *et al.*, 2014).

Tabela 1. Análise química de nutrientes do solo utilizado para multiplicar os inóculos micorrízicos e no microcosmo e do Basaplant® florestal empregado como substrato para as mudas durante a aclimatização.

Substrato	Fe	Cu	Zn	Mn	P	pH	V	C	m	M.O.
	mg/dm ³						%			
Solo	315,70	0,85	2,30	3,70	2	4,3	32,70	0,51	11,09	0,88
Basaplant®	285,30	0,97	3,40	3,80	180	4,3	59,41	0,70	0,56	1,21

Substrato	K	Na	Al	Ca	Mg	H+Al	S.B	CTC
					cmol _c /dm ³			
Solo	0,06	0,04	0,2	1,30	0,20	3,30	1,60	4,90
Basaplant®	1,08	0,18	0,1	12,80	3,80	12,20	17,86	30,06

3.4 Preparo dos filtrados do solo-inóculo

O controle com o filtrado (em papel filtro 2R/80 g) de cada tratamento com fungo foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Gryndler e colaboradores (2018). Preparou-se uma suspensão de cada (solo-inóculo) na proporção de 1:10 (p/p) que ficou sob agitação vigorosa (aproximadamente 100 rpm) durante 20 minutos. Após esse período, a suspensão foi filtrada em papel filtro qualitativo (80 g) de 9 cm Ø da marca CELAB, com 4 a 12 µm de retenção de partículas. Foram incorporados 5 mL de cada filtrado (aproximadamente 1 ml de filtrado para cada 20 ml da capacidade do tubete) nos respectivos tratamentos (controle com filtrado) e 5 mL de água de torneira no controle absoluto apenas uma vez, no início da aclimatização, e no mesmo momento da inoculação dos demais tratamentos.

3.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) e composto por nove tratamentos: 1. Inoculado com *Claroideoglomus etunicatum* URM UFPE 03; 2. Inoculado com *Gigaspora albida* URM UFPE 11; 3. Inoculado com *Acaulospora longula* URM UFPE 07; 4. Inoculado com a mistura dos três fungos; 5. Filtrado do substrato com *C. etunicatum*; 6. Filtrado do substrato com *G. albida*; 7. Filtrado do substrato com *A. longula*; 8. Filtrado do substrato dos três isolados; 9. Controle absoluto, apenas com água da torneira. Os tratamentos 1, 2 e 3 receberam uma quantidade de solo-inóculo contendo 300 esporos da respectiva espécie (83,1 g do solo-inóculo de *C. etunicatum*, 30,6g do solo inóculo de *A. longula* e 102 g do solo-inóculo de *G. albida*). O tratamento 4 recebeu 100 esporos de cada uma das espécies utilizadas (27,7g de *C. etunicatum*, 10,2g de *A. longula* e 34,5 g de *G. albida*). Os tratamentos 5, 6, 7 e 8 receberam 5 mL do seu respectivo

filtrado. O tratamento 9 recebeu 5 mL de água da torneira. Cada tratamento contou com 20 repetições, totalizando 180 amostras.

Na aclimatização (primeira etapa), os dados coletados de todas as mudas sobreviventes foram utilizados para o cálculo da estatura e diâmetro do colmo, bem como teor de clorofila a e b. Para o microcosmos (segunda etapa), apenas cinco repetições, escolhidas aleatoriamente, foram utilizadas para análise dos parâmetros morfológicos e fisiológicos durante 125 dias.

3.5.1 Inoculação micorrízica e período de Aclimatização

Ao final do período de multiplicação *in vitro*, mudas com folhas verdadeiras e parte radicular visível foram separadas para a aclimatização. As 180 mudas cedidas pela Biofábrica Gov. Miguel Arraes (BGMA) foram plantadas em cultivo protegido (sob sombrite com 50% de sombreamento) conforme descrito: as raízes foram lavadas para retirar o excesso de meio de cultura e as mudas foram transplantadas, individualmente, para tubetes cônicos de polietileno com aproximadamente 100 mL de capacidade (14,5 cm de altura por 3,5 cm de diâmetro maior e 1,2 cm de diâmetro menor) contendo o substrato comercial BASAPLANT® e solo inóculo suficiente para atingir 300 esporos em cada tratamento. O inóculo, constituído de esporos, fragmentos de raízes colonizadas e hifas, foi incorporado ao tubete em camada intercalada com o substrato ao longo da zona radicular da muda da seguinte forma: um pouco de substrato no fundo do tubete, o solo- inóculo e por cima do mesmo, mais substrato (Figura 4). Durante o período de aclimatização foram realizadas análises biométricas em três momentos: aos 14 dias, aos 28 dias e aos 43 dias de aclimatização. Os parâmetros analisados foram: estatura do colmo (Ec), diâmetro do colmo (Dc) e teor de clorofila A e B (CloA e CloB) da folha +1, visto que a folha +3 ainda não tinha se desenvolvido na primeira leitura biométrica.



Figura 4. Modo de inoculação do solo-inóculo durante a aclimatização em cultivo protegido.

Fonte: o autor

Após os oito primeiros dias de aclimatização 70 mL de adubação foliar foi aplicada por aspersão em todos os tratamentos com auxílio de um borrifador. Para tal, utilizou-se 2 mL de

POTAMOL® diluídos em 500 mL de água destilada. O POTAMOL® é um fertilizante líquido fonte de Molibdênio, aditivos e reguladores, fabricado pela empresa Ubyfol® (<http://www.ubyfol.com/produto/potamol>). Aos 17 dias de aclimatização foi aplicado, em cadatubete, 2 mL de uma solução de Uréia (5 g diluídos em 1 L de água) para adubação nitrogenada. Aos 21 dias foi aplicada uma solução combinada de micronutrientes contendo: 5 g de YaraTera™Calcinit™ (fonte de Cálcio e Nitrogênio); 2 g de Nunamix (fonte de Ferro, Manganês, Zinco, Cobre e Molibdênio) e 25 g de Uréia diluídos em 5 litros de água. Foram aplicados por aspersão, com auxílio de um borrifador, aproximadamente 70 mL dessa solução sobre todos os tratamentos. Essas aplicações de fertilizantes e adubos fazem parte do protocolo da BGMA e, durante o período de aclimatização houve um esforço para interferir o mínimo possível nos procedimentos de rotina. A única adubação não realizada foi a fosfatada, uma vez que o fósforo poderia interferir na atuação dos FMA.

Aos 29 dias as folhas de todas as mudas foram podadas aproximadamente 5 cm acima da bainha que conecta com o colmo. A poda também é um procedimento rotineiro, essencial para que a muda adquira o vigor necessário antes de ir a campo. Aos 31 dias, as mudas foram alocadas em sol pleno (ainda em cultivo protegido) para adquirir vigor.

Aos 45 dias o experimento em cultivo protegido foi retirado e metade das amostras sobreviventes foi separada (por sorteio) para análise de biomassa seca e fresca da parte aérea e da colonização radicular. A outra metade foi plantada, junto com o todo o substrato (comercial + solo) em vasos com capacidade de 5 kg utilizando como substrato solo autoclavado.

3.5.2 Plantio em Microcosmos

Após o período de 45 dias da aclimatização, cinco mudas dentre as sobreviventes foram selecionadas aleatoriamente para a 2ª etapa do experimento que durou 125 dias. Portanto, o delineamento experimental para essa etapa contou com 45 unidades amostrais (9 tratamentos x 5 repetições). Nessa etapa, as mudas (cinco de cada tratamento) foram transferidas diretamente dos tubetes para vasos com capacidade para 5 Kg com solo autoclavado (Figura 5) e mantidas em ambiente aberto, não controlado e sem irrigação. Durante os quatro meses de duração do experimento (24/05/2019 a 24/09/2019) a pluviosidade média foi de 230,6 mm.



Figura 5. Plantio de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar variedade B 8008 em microcosmos, após o período de aclimatização

Fonte: **o autor**

Foram realizadas quatro biometrias nos dias 26/06/2019, 26/07/2019, 29/08/2019 e 26/09/2019 (uma a cada 30 dias, aproximadamente), sendo a primeira realizada após 33 dias do início do plantio em microcosmos (24/05/2019). Em cada ocasião foram levantados dados acerca da estatura do colmo (medida da base até a incisão da primeira folha), altura da planta (medida da base até a ponta da folha mais alta), teor de clorofila A e B (nas folhas +1 e +3) e limbo da folha +3). Para a realização das medições foram utilizados régua, trena, paquímetro digital e um clorofilômetro.

3.6 Análise da biomassa seca e fresca

Foram avaliadas a biomassa seca e fresca da parte aérea e a biomassa fresca da parte radicular das plantas da aclimatização e a biomassa seca e fresca da parte aérea das plantas do microcosmos. A biomassa fresca foi obtida pesando a parte aérea e a radicular (lavada e livre de solo e substrato) assim que o experimento foi desmontado. A biomassa seca foi avaliada após secagem em estufa a 50 °C até peso constante. Essa análise foi realizada ao final do período de aclimatização e ao final do período em microcosmos.

3.7 Colonização radicular

As raízes foram lavadas, diafanizadas com KOH 10% (v/v), clarificadas com peróxido de hidrogênio 30% (durante 5 minutos) e coradas com azul de Trypan 0,05% (p/v) (Phillips & Hayman, 1970). O percentual de colonização por FMA foi calculado observando-se ao microscópio 100 fragmentos de raiz de aproximadamente 1 cm, montadas em lâminas, e registrando-se os que apresentavam estruturas formadas por FMA (Giovannetti & Mosse, 1980).

3.8 Crescimento relativo durante o microcosmos

A altura, a estatura e o diâmetro do colmo no início do experimento não eram uniformes. Portanto, para melhor avaliar o efeito da micorrização no desenvolvimento vegetal, foi calculada a

taxa de crescimento (Equação 1), segundo Benicasa (2003) e o crescimento relativo (Equação 2) levando em consideração as variáveis (altura da planta, a estatura e o diâmetro do colmo) final e inicial e o tempo final (125 dias) e inicial (33 dias).

$$Tx = \frac{VF - VI}{TF - TI} \text{ (Equação 1)} \quad CR\% = \frac{VI}{VF} \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

Onde: Tx = Taxa de crescimento; CR% = Percentual de Crescimento Relativo; VI = Variável inicial; VF = Variável final; TF = Tempo final; TI = Tempo inicial

3.9 Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) considerando todos os tratamentos de inoculação e o controle. Para satisfazer as premissas do teste estatístico (homogeneidade de variância e distribuição normal), as variáveis que não se adequaram foram transformadas usando log de x+1.

Os dados foram analisados em esquema inteiramente casualizado com cinco repetições de cada tratamento. Quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Para medir a relação entre as diferentes variáveis quantitativas e o que elas representam, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. Para os dados estatísticos empregou-se o software STATISTICA®, sendo os gráficos plotados no Microsoft Office® Excel®.

O teste T foi utilizado para comparar os tratamentos aos 28 e 43 dias de cultivo, durante o período de aclimação, considerando as variáveis: altura das plantas, diâmetro do colmo e teores de clorofila *a* e *b*.

4. RESULTADOS

4.1 Aclimatização

4.1.1 Taxa de sobrevivência

A taxa de sobrevivência foi calculada considerando todas as 20 repetições de cada tratamento. No geral as mudas do tratamento controle absoluto (sem FMA e sem filtrado) alcançaram a maior taxa de sobrevivência (95%). Dentre os tratamentos inoculados, os que receberam inóculo de *C. etunicatum* apresentaram taxa de sobrevivência ligeiramente maior do que os outros tratamentos inoculados (Tabela 2).

Tabela 2. Taxa de sobrevivência durante o período de aclimatização.

Tratamento	Sobrevivência	Taxa de sobrevivência%
<i>C. etunicatum</i>	14/20	70
<i>G. albida</i>	12/20	60
<i>A. longula</i>	13/20	65
Combinado	13/20	65
<i>C. etunicatum</i> (Filtrado)	13/20	65
<i>G. albida</i> (Filtrado)	15/20	75
<i>A. longula</i> (Filtrado)	11/20	55
Combinado (Filtrado)	18/20	90
Controle absoluto	19/20	95

4.1.2 Biomassa fresca e seca

Ao analisar a biomassa fresca e seca da parte aérea das mudas durante a aclimatização, verificou-se que os maiores valores foram novamente observados no controle absoluto, com média de 6,59 g (Tabela 3) e 1,13 g, respectivamente. Apenas os tratamentos com controle absoluto e com filtrado de *G. albida* diferiram estatisticamente do tratamento com filtrado de *A. longula*, os quais não diferiram estatisticamente dos demais tratamentos.

Tabela 3. Médias da biomassa fresca e seca da parte aérea das mudas após o período de aclimatização.

Tratamento	Biomassa fresca aérea (g)	Biomassa seca aérea (g)
<i>C. etunicatum</i>	4,38±0,74 ab	0,76±0,14 ab
<i>G. albida</i>	4,36±1,66 ab	0,76±0,30 ab
<i>A. longula</i>	4,85±1,17 ab	0,78±0,18 ab
Combinado	5,10±1,06 ab	0,82±0,16 ab
<i>C. etunicatum</i> (Filtrado)	3,89±1,23 ab	0,66±0,21 ab
<i>G. albida</i> (Filtrado)	6,37±3,46 a	1,03±0,53 a
<i>A. longula</i> (Filtrado)	3,01±1,46 b	0,48±0,19 b
Combinado (Filtrado)	4,54±2,05 ab	0,75±0,30 ab
Controle absoluto	6,59±2,36 a	1,13±0,41 a

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Ao final dos 45 dias de aclimatização as raízes, formadas em pequena quantidade e com pouca espessura foram destinadas apenas à análise de colonização micorrízica, e a análise da biomassa fresca radicular indicou não haver diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 4). Com relação à colonização radicular, as raízes apresentavam pequenas dimensões, mostrando-se pouco espessas, não sendo possível avaliar a taxa de colonização.

Tabela 4. Média da biomassa fresca radicular das mudas após o período de aclimatização.

Tratamento	Biomassa fresca radicular (g)
<i>C. etunicatum</i>	0,12±0,034 a
<i>G. albida</i>	0,17±0,068 a
<i>A. longula</i>	0,16±0,044 a
Combinado	0,16±0,025 a
<i>C. etunicatum</i> (Filtrado)	0,11±0,040 a
<i>G. albida</i> (Filtrado)	0,13±0,044 a
<i>A. longula</i> (Filtrado)	0,10±0,033 a
Combinado (Filtrado)	0,14±0,052 a
Controle ABSOLUTO	0,17±0,030 a

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.1.3 Estatura do Colmo

Não houve diferença para a estatura do colmo das mudas após 28 e 43 dias (07/05/2019 e 22/05/2019) do início do experimento entre os diferentes tratamentos. As medidas da estatura do colmo realizadas aos 28 e 43 dias do experimento também foram comparadas para o mesmo tratamento utilizando o Teste T ($p < 0,05$). Essa análise mostrou que a medida da estatura do colmo diferiu significativamente entre as duas datas de medição para os tratamentos inoculados com *C. etunicatum* e *A. longula*, filtrados de *C. etunicatum* (F) e combinado (F), assim como o Controle (Tabela 5).

Ao analisar o percentual de crescimento relativo entre as duas medidas (Tabela 5), percebe-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos. Porém, após análise do teste T observando o mesmo tratamento, verificou-se que dentre os inoculados as mudas que receberam *C. etunicatum* (64%) e *A. longula* (72%) diferiram significativamente entre a primeira e a segunda leitura. O mesmo observa-se nos tratamentos com o filtrado de *C. etunicatum* (68%), filtrado do combinado (75%) e o controle ABSOLUTO (69%).

Tabela 5. Estatura do colmo e crescimento relativo de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar aos 28 e 43 dias do período de aclimatização.

Tratamento	Altura das plântulas (cm)		Crescimento relativo (%)
	07/05/2019	22/05/2019	
<i>C. etunicatum</i>	8,26 a	12,84 a	64%*
<i>G. albida</i>	8,30 a	13,00 a	64%
<i>A. longula</i>	9,45 a	13,12 a	72%*
Combinado	10,03 a	14,12 a	71%
<i>C. etunicatum</i> (F)	8,28 a	12,17 a	68%*
<i>G. albida</i> (F)	10,05 a	14,27 a	70%
<i>A. longula</i> (F)	7,52 a	12,73 a	59%
Combinado (F)	9,01 a	12,04 a	75%*
Controle ABSOLUTO	9,24 a	13,42 a	69%*

Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente, segundo o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

* diferença significativa entre as medidas **dentro de** cada tratamento, segundo o Teste T ($p < 0,05$).

4.1.4 Diâmetro do colmo

Para análise do diâmetro do colmo, foram utilizadas as medidas do 28º e 43º dias sendo observada diferença estatisticamente significativa entre as mudas inoculadas com *G. albida* e o controle ABSOLUTO apenas na primeira medição. O Teste T ($p < 0,05$) mostrou diferença entre as duas medidas de diâmetro do solo no tratamento inoculado com *C. etunicatum* e nos tratamentos filtrados de *C. etunicatum*, *A. longula* e o combinado (Tabela 6).

Tabela 6. Diâmetro do colmo de mudas micropropagadas de cana de açúcar no 28º e 43º dias do período de aclimatização.

Tratamento	Diâmetro do colmo (mm)		Crescimento relativo em Espessura
	07/05/2019	22/05/2019	
<i>C. etunicatum</i>	2,02 ab	2,85 a*	71%
<i>G. albida</i>	1,88 a	2,77 a	68%
<i>A. longula</i>	2,42 ab	3,17 a	76%
Combinado	2,69 ab	3,47 a	78%
<i>C. etunicatum</i> (F)	2,07 ab	3,06 a*	68%
<i>G. albida</i> (F)	2,66 ab	3,29 a	81%
<i>A. longula</i> (F)	1,93 ab	2,83 a*	68%
Combinado (F)	2,34 ab	3,16 a*	74%
Controle ABSOLUTO	2,70 b	3,53 a	76%

Letras iguais nas colunas representam valores que não diferem significativamente, segundo o teste de Tukey. * diferença significativa entre as medidas para cada tratamento, segundo o Teste T ($p < 0,05$).

Com relação à espessura relativa do colmo, o padrão se repetiu, sem diferença estatística entre os tratamentos. Dentre os inoculados, o combinado dos três fungos apresentou um aumento médio de 78% na espessura do colmo, maior do que os demais (Tabela 6). Porém, o maior aumento nessa variável foi observado nas mudas tratadas com o filtrado de *G. albida* (81%).

4.1.5 Teor de Clorofila total

Verificou-se na primeira leitura que dentre os tratamentos inoculados as mudas que receberam o inóculo combinado dos três isolados de FMA apresentaram maior teor de clorofila total (Figura 6), porém no geral os tratamentos com os filtrados de *G. albida* e de *A. longula* apresentaram os maiores valores. A medição em ClorofiLOG da Falker® é adimensional, sendo expresso como índice de clorofila de Falker (ICF).

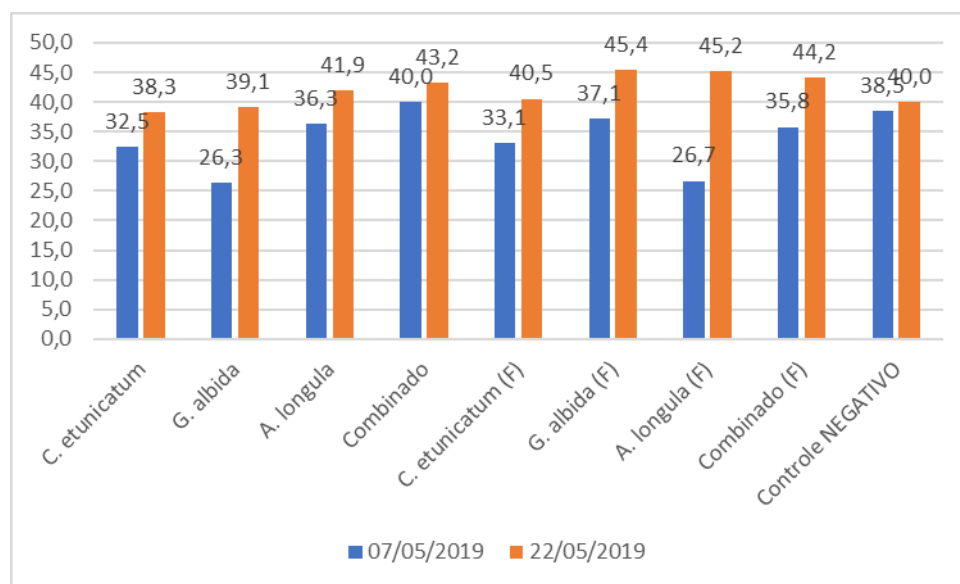


Figura 6. Teor de clorofila total (ICF) nas mudas micropropagadas de cana de açúcar após o período de aclimatização

Quando se observa o teor de clorofila relativo (Tabela 7), o maior acúmulo (93%) foi observado no tratamento combinado com as três espécies de FMA, em comparação com os demais inoculados. Considerando todos os tratamentos, porém, observa-se que o maior acúmulo ocorreu no tratamento controle absoluto.

Tabela 7. Aumento relativo do teor de clorofila em mudas micropropagadas de cana de açúcar, comparando-se as leituras do 28º e 43º dias.

Tratamento	Aumento relativo do teor de Clorofila
<i>C. etunicatum</i>	85%
<i>G. albida</i>	67%
<i>A. longula</i>	87%
Combinado	93%
<i>C. etunicatum</i> (F)	82%
<i>G. albida</i> (F)	82%
<i>A. longula</i> (F)	59%
Combinado (F)	81%
Controle ABSOLUTO	96%

4.2 Microcosmos

4.2.1 Altura das plantas

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos em nenhuma das quatro biometrias realizadas (Tabela 8). Dessa forma, apenas as mudas que receberam o filtrado do solo combinado apresentaram menores valores médios de altura em comparação como o controle ABSOLUTO.

Tabela 8. Altura das plantas de cana de açúcar em microcosmos durante o período de quatro meses.

Tratamento	Altura da planta (cm)				Taxa de Crescimento	Crescimento Relativo
	26/06/2019	26/07/2019	29/08/2019	26/09/2019		
<i>C. etunicatum</i>	94,7 a	111,2 a	125,0 a	131,4 a	0,40	72%
<i>G. albida</i>	96,9 a	112,0 a	133,6 a	141,6 a	0,49	68%
<i>A. longula</i>	103,1 a	116,6 a	133,0 a	136,0 a	0,36	76%
Combinado	89,8 a	103,2 a	123,0 a	134,0 a	0,48	67%
<i>C. etunicatum</i> (F)	100,7 a	115,0 a	134,4 a	141,0 a	0,44	71%
<i>G. albida</i> (F)	97,2 a	105,8 a	124,0 a	130,4 a	0,36	75%
<i>A. longula</i> (F)	98,5 a	109,8 a	127,4 a	131,6 a	0,36	75%
Combinado (F)	87,4 a	107,4 a	119,4 a	121,2 a	0,37	72%
Controle ABSOLUTO	88,3 a	107,8 a	124,6 a	129,6 a	0,45	68%

Letras iguais nas colunas representam médias significativamente iguais, segundo teste de Tukey ($p > 0,05$)

Observando, porém, a taxa de crescimento percebe-se que esta foi maior nos tratamentos inoculados com *G. albida* (0,49) e com o combinado das três espécies (0,48). A tendência, portanto, é de mais crescimento das plantas inoculadas com esses tratamentos ao longo do tempo.

4.2.2 Estatura e diâmetro do colmo

Assim como a altura da planta, as medidas da estatura do colmo não diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$) quando comparados todos os tratamentos. Porém, os tratamentos inoculados, em geral, apresentaram maiores taxas de crescimento (Tabela 9) com destaque para os tratamentos com *A. longula* (0,20) e *G. albida* (0,19).

Com relação ao diâmetro do colmo, inicialmente, plantas do tratamento inoculado com *A. longula* apresentaram significativamente maior espessura do que o registrado no tratamento com inóculo combinado (Tabela 10). Com o passar do tempo, a diferença significativa não foi mais observada, sendo o tratamento inoculado com *A. longula* o que apresentou, ligeiramente, a maior média nas quatro biometrias realizadas.

Tabela 9. Estatura e crescimento relativo do colmo de plantas de cana de açúcar em microcosmos durante quatro meses.

Tratamento	Estatura do colmo (cm)				Taxa de crescimento	Crescimento Relativo
	26/06/2019	26/07/2019	29/08/2019	26/09/2019		
<i>C. etunicatum</i>	17,0 a	22,8 a	28,2 a	31,0 a	0,15	55%
<i>G. albida</i>	17,1 a	23,2 a	29,2 a	34,2 a	0,19	50%
<i>A. longula</i>	18,7 a	26,4 a	31,4 a	37,0 a	0,20	51%
Combinado	16,2 a	21,0 a	27,6 a	31,4 a	0,17	52%
<i>C. etunicatum</i> (Filtrado)	18,2 a	25,2 a	31,2 a	35,6 a	0,19	51%
<i>G. albida</i> (Filtrado)	17,1 a	21,8 a	26,2 a	29,2 a	0,13	59%
<i>A. longula</i> (Filtrado)	18,0 a	24,0 a	29,8 a	33,8 a	0,17	53%
Combinado (Filtrado)	16,0 a	21,8 a	27,2 a	30,8 a	0,16	52%
Controle					0,17	52%
ABSOLUTO	16,9 a	23,0 a	28,2 a	32,8 a		

Letras iguais nas colunas representam médias significativamente iguais, segundo teste de Tukey ($p > 0,05$)

Tabela 10. Diâmetro e crescimento relativo do colmo em diâmetro de plantas de cana de açúcar nas quatro biometrias realizadas em período de microcosmos.

Tratamento	Diâmetro do colmo (mm)				Taxa de Crescimento	Crescimento relativo
	26/06/2019	26/07/2019	29/08/2019	26/09/2019		
<i>C. etunicatum</i>	7,8 ab	9,7 a	11,4 a	11,51 a	0,04	68%
<i>G. albida</i>	8,0 ab	10,5 a	11,1 a	12,17 a	0,05	66%
<i>A. longula</i>	9,2 a	10,8 a	11,9 a	12,92 a	0,04	71%
Combinado	7,2 b	9,8 a	10,5a	11,98 a	0,05	60%
<i>C. etunicatum</i> (Filtrado)	8,1 ab	10,4 a	11,4 a	12,23 a	0,04	66%
<i>G. albida</i> (Filtrado)	8,0 ab	9,4 a	10,3 a	10,73 a	0,03	75%
<i>A. longula</i> (Filtrado)	8,2 ab	9,9 a	11,5 a	12,17 a	0,04	67%
Combinado (Filtrado)	7,5 ab	9,8 a	10,0 a	10,69 a	0,03	70%
Controle					0,03	73%
ABSOLUTO	8,3 ab	9,9 a	10,7 a	11,39 a		

Médias com letras iguais nas colunas representam médias iguais segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

A taxa de crescimento, por sua vez, foi maior nos tratamentos inoculados com *G. albida* e com o combinado das três espécies (0,05), sendo estes, maiores do que os tratamentos não inoculados. Esse resultado repete o observado para a altura da planta.

4.2.3 Biometria: Teor de Clorofila a e b da folha +3

Houve diferença significativa apenas no teor de clorofila B. No primeiro mês observou-se que o tratamento que recebeu o inóculo combinado diferiu daquele com *A. longula* e do controle absoluto, os quais não diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos. Inicialmente, tanto o teor de clorofila A quanto de clorofila B foram maiores no tratamento com as espécies de

FMA combinadas (Tabela 11), mas a partir dos 60 dias os valores se aproximaram como evidenciado pela ausência de diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 11. Teores de clorofila a e b durante o período de microcosmos.

Tratamento	26/06/2019		26/07/2019		29/08/2019		26/09/2019	
	ClorA	ClorB	ClorA	ClorB	ClorA	ClorB	ClorA	ClorB
<i>C. etunicatum</i>	30,8 a	7,5 ab	27,3 a	5,9 a	23,16	4,4 a	21,2 a	4,3 a
<i>G. albida</i>	31,2 a	7,5 ab	28,8 a	6,6 a	20,9 a	3,5 a	22,2 a	4,3 a
<i>A. longula</i>	29,0 a	5,8 b	26,6 a	5,2 a	23,4 a	4,5 a	20,6 a	3,5 a
Combinado	33,0 a	9,1 a	26,2 a	5,3 a	23,0 a	4,5 a	22,6 a	3,8 a
<i>C. etunicatum</i> (Filtrado)	30,0 a	8,2 ab	26,8 a	5,9 a	22,6 a	4,4 a	22,5 a	4,0 a
<i>G. albida</i> (Filtrado)	30,4 a	7,3 ab	29,2 a	6,7 a	24,9 a	4,5 a	21,5 a	3,9 a
<i>A. longula</i> (Filtrado)	30,0 a	6,1 b	26,3 a	6,1 a	23,1 a	4,5 a	22,9 a	3,9 a
Combinado (Filtrado)	31,2 a	7,8 ab	26,9 a	5,5 a	22,9 a	4,6 a	19,8 a	3,2 a
Controle ABSOLUTO	28,0 a	6,2 b	29,8 a	6,9 a	23,1 a	4,4 a	21,3 a	3,7 a

Letras iguais nas colunas referem-se a valores significativamente iguais, segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.2.4 Limbo da folha +3

As dimensões do limbo da folha +3 também não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Na última biometria, as plantas inoculadas com *A. longula* apresentaram a dimensão do limbo ligeiramente maior que as demais, sendo que em alguns tratamentos observou-se diminuição nas dimensões (Tabela 12).

Tabela 12. Limbo da folha +3 de plantas de cana de açúcar durante o período em microcosmos.

Tratamento	Limbo da folha +3 (cm)			
	26/06/2019	26/07/2019	29/08/2019	26/09/2019
<i>C. etunicatum</i>	1,8 a	2,0 a	2,3 a	2,4 a
<i>G. albida</i>	1,8 a	2,0 a	2,8 a	2,2 a
<i>A. longula</i>	1,8 a	2,3 a	2,5 a	2,6 a
Combinado	1,6 a	1,9 a	2,3 a	2,2 a
<i>C. etunicatum</i> (Filtrado)	2,0 a	2,0 a	2,5 a	2,3 a
<i>G. albida</i> (Filtrado)	1,8 a	1,9 a	2,1 a	2,2 a
<i>A. longula</i> (Filtrado)	1,9 a	1,9 a	2,2 a	2,3 a
Combinado (Filtrado)	1,8 a	2,0 a	2,3 a	1,9 a
Controle ABSOLUTO	1,7 a	2,0 a	2,4 a	2,5 a

Letras iguais nas colunas, não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.2.5 Colonização radicular

As plantas, em todos os tratamentos, apresentaram colonização radicular, ao contrário do esperado para os controles (filtrados e controle absoluto). A análise, ao final do experimento, mostrou a presença de glomerosporos de *Paraglomus occultum*. No geral, a taxa de colonização

radicular foi igual ou superior a 32%, chegando a 53% no tratamento com *G. albida* (Tabela 13), porém sem diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 13. Colonização radicular de plantas de cana de açúcar durante o período em microcosmos.

Tratamento	Colonização radicular
<i>C. etunicatum</i>	49% a
<i>G. albida</i>	53% a
<i>A. longula</i>	34% a
Combinado	45% a
<i>C. etunicatum</i> (F)	47% a
<i>G. albida</i> (F)	44% a
<i>A. longula</i> (F)	39% a
Combinado (F)	32% a
Controle ABSOLUTO	33% a

Letras iguais representam valores que não diferem significativamente, segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$)

4.2.6 Biomassa fresca e seca

Tendência de maiores valores de biomassa fresca e seca foi observada nos tratamentos com *A. longula* (Tabela 14), embora sem diferença significativa entre os tratamentos. O menor desvio padrão, porém, foi observado nos tratamentos inoculados com *C. etunicatum*.

Tabela 14. Biomassa seca e fresca da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar após quatro meses na condição de microcosmos.

Tratamento	Biomassa fresca aérea (g)	Biomassa seca aérea (g)
<i>C. etunicatum</i>	53,84±6,48 a	24,65±1,95 a
<i>G. albida</i>	61,36±16,7 a	26,42±5,50 a
<i>A. longula</i>	66,50±6,5 a	28,08±2,67 a
Combinado	55,70±11,7 a	24,82±4,02 a
<i>C. etunicatum</i> (Filtrado)	63,12±6,63 a	25,65±2,70 a
<i>G. albida</i> (Filtrado)	56,08±13,2 a	24,76±4,43 a
<i>A. longula</i> (Filtrado)	65,80±13,9 a	29,29±4,29 a
Combinado (Filtrado)	49,74±16,9 a	23,32±5,26 a
Controle ABSOLUTO	63,36±13,7 a	28,33±4,10 a

Letras iguais nas colunas representam valores que não diferem significativamente, segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.2.7 Número de esporos por tratamento

Ao fim dos 125 dias de cultivo em microcosmos, amostras do substrato (solo inóculo + BRASPLANT®) foram coletadas para recuperação e quantificação dos esporos de cada espécie utilizada no experimento. Verificou-se a presença de FMA em todos os tratamentos, inclusive de um FMA não inoculado, o *Paraglomus occultum*. Porém, não houve diferença estatística no número de esporos entre os tratamentos (Tabela 15).

Tabela 15. Número de glomerosporos de *Claroideoglossum etunicatum*, *Gigaspora albida*, *Acaulospora longula* e *Paraglossum occultum* no substrato de mudas de cana-de-açúcar micropropagadas inoculadas e cultivadas por 125 dias.

Isolado	Nesp CE	Nesp GA**	Nesp AL**	Nesp PO
	unid/10 g de solo			
<i>C. etunicatum</i>	21,2 a	0,00 b	0,00c	367,2 a
<i>G. albida</i>	0,00 a	24,4 a	0,00 d	260,8 a
<i>A. longula</i>	0,00 a	0,00 b	205,8 b	283,8 a
Combinado	20,2 a	10,6 a	482,6 a	288,6 a
Controle absoluto	0,00 a	0,00 b	0,00 c	384,0 a

; Nesp- número de esporos; CE- *C. etunicatum*, GA - *G. albida*, AL- *A. longula*, PO- *Paraglossum occultum*. **Teste de Duncan significativo $p < 0,05$

4.2.8 Índice de correlação de Pearson

Correlações significativas foram observadas entre as variáveis analisadas (Tabela 16). A Biomassa Fresca (BMF) foi positivamente correlacionada com os valores de Biomassa Seca (BMS) ($r=0,96$; $p=0,000$), diâmetro do colmo ($r=0,41$; $p=0,03$) e com o Limbo F+3 ($r=0,43$; $p=0,03$). Correlações negativas foram observadas entre essa variável e o número de esporos de *G. albida* ($r=-0,47$; $p=0,038$) e a colonização ($-0,52$; $p=0,007$). A BMS, além de se correlacionar com a BMF, também foi correlacionada positivamente com Limbo F+3 ($r=0,42$; $p=0,03$), correlações negativas foram observadas entre a BMS e o número de esporos de *G. albida* ($r=-0,47$; $p=0,01$) e com a colonização micorrízica ($-0,51$; $p=0,009$). O número de esporos de *G. albida* foi negativamente correlacionado com Limbo F+3 ($r=-0,57$; $p=0,000$) e positivamente com a colonização ($r=0,53$; $p=0,005$).

Tabela 16. Índice de correlação de Pearson entre os parâmetros biomassa fresca (BmF), biomassa seca (BmS), diâmetro do colmo (DC), número de esporos de *G. albida* (NE), limbo da folha +3 (LB), colonização radicular (Col), altura da planta (AP), estatura da planta (EP), Clorofila A (CloA) e Clorofila B (CloB) de mudas de cana-de-açúcar micropropagadas após 125 dias de microcosmos em condições ambientais.

	BmF	BmS	DC	NE	EP	CloA
BmS	0,96	--	ns	ns	ns	ns
DC	0,41	ns	--	ns	0,65	ns
LB	0,43	0,42	Ns	-0,57	Ns	ns
NE	-0,47	ns	ns	--	Ns	ns
Col	-0,52	-0,51	ns	0,53	Ns	ns
AP	ns	ns	0,57	ns	0,79	ns
CloB	ns	ns	ns	ns	Ns	0,71

ns: não significativo

Correlações positivas foram observadas entre as variáveis: estatura (medida do colmo) e a altura da planta (medida até a ponta da folha mais alta) ($r=0,79$; $p=0,000$) e entre a estatura e o diâmetro do colmo ($r=0,65$; $p=0,000$). O diâmetro do colmo também foi correlacionado positivamente com a altura ($r=0,57$; $p=0,003$). As variáveis Clo A F+3 e Clo b F+3 foram altamente correlacionadas ($r=0,71$; $p=0,000$) entre si. O índice de correlação de Pearson foi calculado para os tratamentos com *G. albida* por estes apresentarem maior taxa de colonização radicular.

5. DISCUSSÃO

5.1 Aclimatização

O período de aclimatização é essencial para se alcançar o desenvolvimento pleno da cultura em campo. A taxa de sobrevivência nesse período é importante, podendo significar o sucesso ou fracasso do procedimento. Em média, mais de 90% das mudas micropropagadas de cana-de-açúcar, se bem enraizadas, conseguem sobreviver a essa etapa (Getnet, 2017). Redae e Ambaye (2018), ao testar diferentes substratos na aclimatização de mudas de cana-de-açúcar, registraram 98% de taxa de sobrevivência com turfa de coco. Em outro estudo com a mesma planta, utilizando um regulador de crescimento, Kumari e colaboradores (2018) conseguiram uma taxa de quase 100% de sobrevivência das mudas.

No presente estudo, porém, a presença dos FMA pode ter influenciado negativamente as mudas no período de aclimatização, uma vez que a taxa de sobrevivência nesta etapa foi maior no tratamento controle. Esse resultado pode ser explicado pela alta demanda energética necessária para o estabelecimento da simbiose, o que pode ter prejudicado as plantas inoculadas, pois durante a aclimatização as mudas estão expostas a diversos tipos de estresses abióticos como excesso de nutrientes, por exemplo, o que pode dificultar o processo de absorção e, consequentemente, a realização da fotossíntese. Nesse cenário, a resposta da planta hospedeira ao estresse, a exemplo do excesso de nutrientes no substrato comercial, pode ser independente da resposta do simbionte (Millar e Bennett, 2016).

Algumas hipóteses podem explicar a menor taxa de sobrevivência observada nos tratamentos inoculados. A plântula ao sair da multiplicação *in vitro* está sensível devido ao período em que permaneceu em heterotrofia (absorvendo os hormônios vegetais e os nutrientes do meio de cultura). Mesmo com primórdios radiculares no início da aclimatização, os estresses bióticos e abióticos podem acarretar perdas significativas em culturas mais sensíveis (Carra *et al.*, 2019).

Outra hipótese se baseia no alto teor de nutrientes, especialmente de fósforo. O excesso de nutrientes, principalmente P, pode inibir o desenvolvimento do FMA e uma interação positiva entre a inoculação e o substrato utilizado pode não ocorrer. Analisando o efeito da inoculação em conjunto com diferentes substratos (solo + vermicomposto), Silva e colaboradores (2006) observaram que nos tratamentos adubados com vermicomposto, não houve respostas em decorrência da inoculação micorrízica, especialmente pela fertilidade elevada deste substrato.

É provável, também, que durante a aclimatização a utilização de fotossintatos vegetais pelo fungo, para completar o desenvolvimento das estruturas de colonização sobreponha-se à capacidade fotossintética da planta ainda não totalmente estabelecida (Del-Saz *et al.*, 2017; Cesaro *et al.*, 2020). Ao deixar o cultivo *in vitro* e as condições controladas do laboratório, as mudas levam tempo para

se adaptarem à condição de autotrofia, podendo os FMA inoculados inibir o seu desenvolvimento, e, em casos extremos, levá-las à morte (Silva *et al.*, 2020b).

Estudos com inoculação micorrízica em cana-de-açúcar (propagada convencionalmente ou por cultura de tecidos) são escassos, o que dificulta a discussão. Na aclimatização de mudas de alcachofra micropropagadas, Ruta e colaboradores (2016) avaliaram o efeito de dois inoculantes comerciais (Aegis® e Symbivit®) e observaram que plantas inoculadas apresentaram taxa de sobrevivência de quase 70%, enquanto apenas 50% do controle sobreviveram. Dessa forma, a simbiose micorrízica aumentou significativamente ($p < 0,05$) a taxa de sobrevivência, o que não se registrou no presente estudo. Oliveira e colaboradores (2011), ao utilizarem *Glomus etunicatum* (= *Claroideoglomus etunicatum*), *Acaulospora longula* e *Gigaspora albida* na aclimatização de plântulas de *Tapeinochilos ananassae* Warb., observaram menor taxa de sobrevivência no tratamento inoculado com *G. albida*; resultado similar foi registrado no presente trabalho. De maneira geral, membros da família Gigasporaceae possuem altas taxas de colonização radicular (Chagnon *et al.*, 2013), o que pode ser constatado na segunda etapa do experimento, o microcosmos. Dessa forma, acredita-se que a menor taxa de sobrevivência observada no tratamento inoculado com *G. albida* esteja relacionada a tentativa do estabelecimento da simbiose radicular nos estágios iniciais do desenvolvimento da plântula em cultivo protegido que, por sua vez, foi comprometida pelo alto teor de fósforo (180 mg/dm^3) presente no substrato comercial.

O período de aclimatização de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar é variável e, aparentemente, depende da variedade e das características do genótipo. Esse período pode variar de 15 dias (Ferreira *et al.*, 2017) a 30 dias ou mais (Tesfa *et al.*, 2016), dependendo do objetivo experimental ou de produção. Outra forma de calcular o período de aclimatização de uma determinada variedade de cana-de-açúcar é a verificação de parâmetros morfológicos como altura e diâmetro do colmo.

No presente estudo, optou-se por 45 dias de aclimatização justamente para se observar os efeitos da colonização micorrízica nas mudas uma vez que alguns estudos apontam o início da colonização aproximadamente aos 14 dias após a inoculação (Cesaro *et al.*, 2020). Dessa forma, os 45 dias de aclimatização além de estarem dentro do protocolo de propagação comercial de mudas da Biofábrica Gov. Miguel Arraes, também foram suficientes para observar se houve benefícios da simbiose radicular. A espécie do fungo utilizada, bem como o substrato também podem ter influenciado a resposta das mudas à micorrização. O fato de a maior porcentagem de sobrevivência ter sido observada no tratamento controle absoluto, bem como nos filtrados do solo inóculo, pode indicar que o substrato comercial BASAPLANT® influenciou negativamente os FMA, acarretando mais prejuízos à planta do que benefícios.

Maiores valores de biomassa fresca e seca foram observados no controle absoluto, embora sem diferença significativa. Entretanto, o menor desvio padrão foi observado nos tratamentos inoculados com *C. etunicatum*, evidenciando maior uniformidade das mudas. No processo de micropropagação a uniformidade é um importante fator uma vez que pode facilitar o manejo da cultura (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2009). Em estudo utilizando inóculos de *Glomus etunicatum* (= *C. etunicatum*) e combinado de *G. etunicatum*/*Gigaspora margarita* em mudas micropropagadas de *Zingiber spectabile* durante a aclimatização, Oliveira e colaboradores (2010) também não evidenciaram diferença quando comparadas a biomassa seca e fresca aérea entre os tratamentos inoculados com FMA e o Controle. A utilização de FMA como inoculante para melhoria dos parâmetros fisiológicos e morfológicos dos vegetais precisa ser realizada com cautela, uma vez que as espécies apresentam diferentes taxas de responsividade micorrízica.

Na outra ponta da simbiose, diferentes espécies de FMA podem promover diferentes respostas de uma mesma espécie vegetal, tanto de forma qualitativa quanto de forma quantitativa. Com relação à biomassa, por exemplo, Oliveira e colaboradores (2011) utilizaram inóculos de *G. etunicatum* (= *C. etunicatum*), *Acaulospora longula* e *Gigaspora albida* na aclimatização de mudas micropropagadas de *Tapeinochilos ananassae* e observaram diferença significativa no acúmulo de biomassa entre os três tratamentos, com as plantas associadas a *G. etunicatum* apresentando maior biomassa fresca e seca da parte aérea e radicular.

Ao contrário do aqui evidenciado, em geral a inoculação com FMA aumenta significativamente a biomassa radicular das plantas hospedeiras (Morone-Fortunato e Avato, 2008; Oliveira *et al.*, 2010, 2011). Um dos principais efeitos da micorrização é a capacidade de incrementar a biomassa da raiz, mas o tratamento não inoculado mostrou maior desenvolvimento radicular que os inoculados. Isso sugere que o dreno de C causado pelos fungos nessa etapa de desenvolvimento das mudas foi maior do que o possível benefício da inoculação. Morone-Fortunato e Avato (2008) obtiveram maior biomassa fresca radicular em mudas micropropagadas de orégano (*Origanum vulgare* L.) ao utilizarem *Glomus viscosum* como inoculante. Mais recentemente, Romero-Munar e colaboradores (2018), utilizando um inóculo comercial (Aegis SYM®) contendo *Rhizophagus intraradices* e *Funneliformis mosseae* em mudas micropropagadas de *Arundo donax* L., outra Poaceae, também registraram maior biomassa radicular nos tratamentos inoculados se comparados aos não inoculados. Farias e colaboradores (2014) analisaram os efeitos de quatro espécies de FMA (*Glomus clarum*, *Glomus etunicatum*, *Gigaspora margarita* e *Scutellosporaheterogama*) em mudas micropropagadas de mirtilo (*Vaccinium* sp.), observando que os tratamentos inoculados com *G. margarita* apresentaram maior biomassa seca e fresca das raízes. Dessa forma, ao utilizar um inóculo micorrízico se faz necessário um estudo prévio da interação dos isolados de FMA com a cultura a ser utilizada, uma vez que os efeitos podem ser variáveis.

Mesmo não havendo diferença significativa, dentre os tratamentos inoculados o que apresentou maiores estatura e diâmetro do colmo durante a aclimatização foi o que recebeu o inóculo combinado das três espécies das FMA. Esse resultado corrobora os achados de Locatelli e Lovato (2002) que, ao utilizarem uma mistura de *Scutellospora pellucida*, *Glomus etunicatum* e *Glomus* sp. como inoculante em porta enxertos micropropagados de macieira (*Malus* sp.) obtiveram efeitos positivos na colonização e no crescimento da parte aérea e radicular da variedade Marubaiko. Porém, na outra variedade testada (M.9) o mesmo inóculo apresentou efeitos negativos.

Outro estudo, conduzido por Oliveira e colaboradores (2010), também evidenciou efeitos positivos da mistura de espécies de FMA em mudas micropropagadas de *Zingiber spectabile* Griff, uma planta ornamental. Nesse estudo, a co-inoculação com *Gigaspora margarita* + *Glomus etunicatum* + *Bacillus pumilus* beneficiou significativamente a micorrização, em comparação com os demais tratamentos. Os autores ressaltam, porém, que a utilização de micro-organismos promotores de crescimento de plantas deve ser feita com cautela uma vez que podem acarretar efeitos negativos (Oliveira *et al.*, 2010). Em estudo com mudas de goiabeira (*Psidium guajava* L.), Estrada-Luna e colaboradores (2000) verificaram que mudas inoculadas com três espécies de *Glomus* (*G. diaphanum*, *G. albidum* e *G. claroides*) apresentavam maior número de folhas além de maior espessura do colmo do que as inoculadas isoladamente.

No presente trabalho, dentre as mudas inoculadas as que receberam inóculo misto apresentaram maior teor de clorofila do que as demais. Porém, a diferença não foi significativa e os valores foram menores do que os observados nos tratamentos que receberam os filtrados de todos os isolados. As razões para esse resultado não são claras, mas aparentemente a microbiota associada ao solo-inóculo foi igualmente efetiva em propiciar acúmulo de clorofila nas mudas. Yadav e colaboradores (2013) analisaram o efeito da inoculação com *Glomus mosseae* (= *Funneliformis mosseae*) e *Acaulospora laevis*, isoladamente e em conjunto, em mudas micropropagadas de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L). Embora os maiores teores de clorofila *a* e *b* tenham sido encontrados nas mudas inoculadas com *G. mosseae*, em comparação ao controle e ao tratamento com o mix de espécies, os autores concluíram que a inoculação conjunta das duas espécies de FMA foi mais efetiva no aspecto geral.

Efeitos positivos da inoculação micorrízica no teor de clorofila foram observados por Romero-Munar e colaboradores (2018) em mudas micropropagadas de cana-do-reino (*Arundodonax* L.), uma Poaceae importante para a produção de energia. No caso, a introdução do inoculante comercial AEGIS SYM® contendo *R. intraradices* e *F. mosseae* aumentou significativamente os teores de clorofila *a* e *b*, quando comparado com as mudas não inoculadas.

É evidente que a inoculação com FMA melhora diversos aspectos fisiológicos e morfológicos de mudas micropropagadas de diversas espécies vegetais, inclusive de cana-de-açúcar. Entretanto, essa melhora significativa não foi observada no presente trabalho.

5.2 Microcosmos

O alto teor de fósforo no substrato comercial empregado nos experimentos não impediu que os FMA inoculados conseguissem colonizar as plantas hospedeiras ao final do período de microcosmos. No entanto, os parâmetros morfológicos (altura e diâmetro do colmo) das mudas do tratamento controle Absoluto (sem inoculação), de maneira geral, foram melhores se comparadas com aquelas inoculadas, o que pode indicar que o P presente no solo inibiu fortemente a ação de algumas espécies de FMA, embora não tenha impedido a esporulação. O solo utilizado para o plantio das mudas em microcosmos era do tipo Latossolo Amarelo Distrófico Agrissólico, de textura areia-franca (Santana *et al.*, 2014) e com baixo teor de fósforo. No entanto, o substrato adicionado (Basaplant), com 180 mg/dm³ de P, possivelmente prejudicou a atuação dos FMA. A concentração de fósforo no solo pode afetar mais diretamente a simbiose radicular e menos significativamente a densidade dos esporos (Lin *et al.*, 2020).

A composição físico-química do substrato é um fator relevante para o estabelecimento da simbiose micorrízica e sua efetividade. Elementos como teor de fósforo e pH costumam ser relevantes. Em estudo com cana-de-açúcar propagada convencionalmente e inoculada com nove espécies de FMA, Fors e colaboradores (2020) observaram que as mudas inoculadas com *Acaulospora colombiana* apresentaram maior altura em solos com baixo teor de P, ao final dos 120 dias de cultivo, embora sem diferença significativa para as variáveis analisadas. Os autores sugerem que a falta de diferença significativa esteja relacionada ao baixo teor de P uma vez que, no mesmo estudo, em solos com maior quantidade de P disponível, foram observadas diferenças estatísticas em alguns parâmetros. Esse resultado é parcialmente consistente com o aqui observado, onde as mudas inoculadas com *G. albida* apresentaram maior altura e maior taxa de crescimento ao final dos 125 dias de plantio (Tabela 8), e, também, ausência de diferença significativa entre os tratamentos. No entanto, o motivo foi oposto, ou seja, excesso de P no solo.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto à biomassa seca e fresca. Em termos gerais, a biomassa relaciona-se com o acúmulo de matéria orgânica, sendo um fator importante no estudo do crescimento vegetal. O desenvolvimento das folhas e do colmo é essencial para a adaptação das mudas às condições de campo. As mudas inoculadas com *A. longula* apresentaram maiores valores absolutos mesmo com uma das menores taxas de colonização

radicular (Tabela 13), confirmando que os efeitos dos FMA não necessariamente estão associados à taxa de colonização radicular.

Resultado semelhante foi observado por Mendonça e colaboradores (2019), ao utilizarem quatro espécies de FMA (*G. albida*, *C. etunicatum*, *Rhizoglosum clarum* e *Acaulospora morrowiae*) combinadas com espécies nativas como inoculante em plantas de *Paspalum millegrana* Schrad (Poaceae). Nesse estudo, o tratamento inoculado com FMA nativos apresentou maior taxa de colonização radicular ao final dos 90 dias de cultivo, enquanto maiores altura da planta, massa seca e comprimento radicular foram observados em outros tratamentos com menor taxa de colonização (Mendonça *et al.*, 2019). No comprimento radicular de mudas micropropagadas de videiras indianas (*Vitis vinifera* L.) inoculadas com *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae* e *G. fasciculatum* foi observado efeito semelhante: a espécie que propiciou maior colonização radicular não foi a mesma que teve o maior efeito positivo na raiz (Eftekhar *et al.*, 2012). Entretanto, no presente estudo em alguns parâmetros a maior taxa de colonização radicular dos tratamentos inoculados com *G. albida* refletiram em benefícios morfológicos como foi o caso da taxa de crescimento em altura (Tabela 8) durante a etapa de microcosmos. Em outros parâmetros, porém, a combinação das três espécies apresentou valores semelhantes ou superiores.

Ao passar do período de aclimatização (cultivo protegido) para as condições de campo (sol pleno e regime hídrico variável), as mudas estão sujeitas a diversos estresses bióticos e abióticos. Ao discutir os efeitos da simbiose radicular sobre a planta, é preciso levar em consideração a estratégia de vida de cada espécie de FMA, considerando a forma como cada uma adquire recurso e investe em seu crescimento. De acordo com Chagnon e colaboradores (2013), os FMA podem ser classificados em três categorias de acordo com a estratégia C-S-R: Competitivos, Ruderais e Estresse Tolerantes. As espécies competitivas (C) formam esporos mais tardiamente, possuem alta densidade de hifas no solo e conseguem oferecer maior absorção de fósforo ao hospedeiro. Os ruderais (R), por sua vez, possuem alta taxa de crescimento, produção de esporos precoce e mecanismos mais eficientes de dispersão de esporos. Por fim, as espécies estresse tolerantes (S) são aquelas que, em condições adversas (p. ex. acidez do solo ou estresse hídrico), produzem esporos de maneira rápida e eficaz e conferem certa tolerância ao hospedeiro. Nesse contexto, espécies estresse tolerantes como *A. longula* se destacam, produzem mais esporos (Tabela 17) e podem fornecer mais benefícios ao hospedeiro. No presente trabalho, e embora sem diferença significativa, a inoculação com *A. longula* favoreceu a produção de biomassa seca e fresca da parte aérea, em comparação com os demais tratamentos inoculados. A inoculação com *Acaulospora mellea* em mudas de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) sob estresse salino, propiciou maior biomassa nos tratamentos inoculados, quando comparados aos não inoculados (Wang *et al.*, 2019), o que indica a capacidade de tolerância de espécies do gênero *Acaulospora*.

Nos dois primeiros meses de plantio em microcosmos a altura da planta foi ligeiramente maior nos tratamentos inoculados com *A. longula*, mas ao longo do tempo as mudas associadas com *G. albida* apresentaram maior altura que as dos demais tratamentos, embora sem diferença estatística. O fator tempo foi significativo no estudo de Cesaro e colaboradores (2020), no qual mudas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Rio Grande) inoculadas com *Funneliformis mosseae* apresentaram um aumento da concentração de clorofila *a* e *b* entre os dias 7 e 21 após a inoculação com uma tendência de posterior estabilização, sendo a colonização radicular observada 14 dias após a inoculação. Porém, não foram encontradas diferenças significativas entre as mudas inoculadas e o controle. No presente estudo, os tratamentos inoculados com *G. albida* apresentaram maiores valores de altura e uma tendência de maior crescimento. O comportamento de formação tardia dos esporos de membros da família Gigasporaceae (Chagnon *et al.*, 2013) juntamente com a taxa de crescimento observada nos tratamentos inoculados com *G. albida* (Tabelas 8, 9 e 10) sugere que se o experimento durasse mais tempo, esse padrão ficaria mais definido.

Nos primeiros meses do estabelecimento em condições de campo (microcosmos) as plantas estão sujeitas aos mais diversos tipos de estresses. Assim, simbiontes que conferem resistência ao hospedeiro podem se destacar e fornecer mais benefícios morfológicos e fisiológicos. É o caso de *Acaulospora longula* considerada estresse tolerante, que, em condições iniciais de adaptação (momento do transplantio do cultivo protegido para o microcosmos) pode fornecer mais benefícios ao hospedeiro. Com o passar do tempo, o hospedeiro se habitua às condições do novo ambiente, os efeitos do estresse do transplantio diminuem e, com isso, outras espécies de FMA com diferentes estratégias podem se destacar e fornecer benefícios ao hospedeiro. Foi o caso de *G. albida* que, com característica competidora (Chagnon *et al.*, 2013), apresentou efeito ligeiramente melhor ao final do período de análise.

O maior incremento em altura por espécie da família Gigasporaceae também foi observado por Farias e colaboradores (2014) em estudo com mudas micropropagadas de mirtilheiro (*Vaccinium* sp. cv. Woodard): as mudas inoculadas com *G. margarita* apresentaram maior altura que os demais tratamentos, incluindo o controle. Em um estudo de campo conduzido por Juntahum e colaboradores (2020), a inoculação com *Funneliformis mosseae*, por sua vez, aumentou a biomassa, a absorção de nutrientes (NPK), biomassa vegetal e produtividade de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) da variedade Khon Kaen 3. Mudas micropropagadas de cana-do-reino (*Arundo donax* L.) apresentaram maior altura quando receberam inoculante comercial contendo *Rhizophagus intraradices* e *Funneliformis mosseae* (Tauler e Baraza, 2015).

Quanto à estatura e ao diâmetro do colmo, os tratamentos inoculados com *A. longula* apresentaram as maiores médias durante o período analisado, porém mais uma vez as diferenças não foram significativas. A natureza estresse tolerante dessa espécie pode ter contribuído para o

efeito observado. Porém, com o passar do tempo e a estabilização das condições entre o hospedeiro e a microbiota do solo, essa situação pode mudar. Machineski e colaboradores (2018) avaliaram o efeito da inoculação com FMA (*Dentiscutata heterogama*, *C. etunicatum*, *Rhizophagus clarus*, *Acaulospora scrobiculata* e *A. morrowiae*), em mudas de caqui (*Diospyros kaki* L.) sob condições de casa de vegetação. Ao fim de 360 dias de cultivo, o tratamento que apresentou as maiores médias, inclusive maior espessura do colmo, foi o inoculado com *D. heterogama* (Machineski *et al.*, 2018), espécie da ordem Gigasporales, a mesma de *G. albida* e que engloba espécies competidoras (Chagnon *et al.*, 2013). Esse resultado corrobora, em parte, o evidenciado em relação à altura das plantas na presente pesquisa. Efeitos positivos da inoculação micorrízica na espessura do colmo também foram observados por Adeyemi *et al.* (2020) ao utilizarem um inóculo comercial (Empathy Mycorrhizal Rootgrow™) em experimento com três cultivares de soja (*Glycine max* L.) em duas etapas: casa de vegetação e condições de campo. A inoculação micorrízica, em média, resultou em aumento de altura, espessura do caule, número de folhas e área foliar nas plantas das três cultivares (Adeyemi *et al.*, 2020).

Os teores que mais sofreram variações entre os tratamentos durante o período em microcosmos foram os de clorofila *a* e *b* e, mais uma vez, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos. Vários relatos na literatura evidenciam a influência da inoculação micorrízica no acúmulo do pigmento fotossintético. Em mudas de banana (*Musa* sp.), por exemplo, a inoculação com *F. mosseae* e *Glomus microcarpum* aumentou significativamente o teor de clorofila quando comparado com o tratamento não inoculado (Sahodaran *et al.*, 2019).

Antes do início do experimento o substrato foi avaliado quanto à presença de glomerosporos, mas nenhum foi encontrado. Porém, no final dos experimentos esporos de um FMA não inoculado (*P. occultum*) foram encontrados em todos os tratamentos, em quantidade superior à dos inoculados *C. etunicatum* e *G. albida*. e similar aos tratamentos com *A. longula* e o mix dos três fungos (Tabela 15). O experimento foi mantido ao ar livre, estando sujeito à ação do vento que pode ter trazido propágulos de FMA da vegetação do campo ao redor. A presença do contaminante pode explicar, em parte, o fato de não ter havido diferença significativa entre os tratamentos, com relação aos parâmetros analisados, que em alguns casos apresentaram valores muito próximos. No caso, a presença de *P. occultum* pode ter inibido a ação dos demais FMA. Por outro lado, é possível que a presença desse fungo não tenha interferido na resposta das mudas micropropagadas de cana-de-açúcar à micorrização. Estudos mostraram que mudas inoculadas com *P. occultum* apresentaram menores valores de altura, diâmetro do colmo, biomassa seca (Wu *et al.*, 2011) e menor taxa de colonização (Barbosa *et al.*, 2019) se comparadas com mudas inoculadas com outras espécies de FMA, indicando a baixa efetividade micorrízica desse FMA.

Existe certa variação quanto à taxa de colonização radicular em cana-de-açúcar. No presente estudo, a colonização foi de 32% a 53% (valor máximo observado nas mudas inoculadas com *G. albida*), embora sem diferença significativa. Valores similares foram observados em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *Funneliformis mosseae*, após 12 meses em condições de campo (Juntahum *et al.*, 2020), as quais apresentaram taxas de 24% a 53% de colonização. Porém, em outro estudo que correlacionou fatores edáficos e variação sazonal na colonização radicular por FMA em campos de cana-de-açúcar, a colonização variou de 60 a 89% (Sivakumar, 2013). A ampla variação no percentual de colonização micorrízica indica que as diferentes espécies utilizadas no experimento apresentaram comportamentos distintos quanto à colonização radicular que, por sua vez, refletiu na simbiose. A inoculação por *G. albida*, por exemplo, promoveu maior taxa de colonização radicular, porém nem sempre isso resultou em benefícios para as mudas de cana-de-açúcar.

A maioria dos estudos sobre interação de FMA e cana-de-açúcar tem sido conduzido em condições de campo ou em viveiro (estufa ou casa de vegetação) com mudas propagadas convencionalmente. É o caso, por exemplo, do estudo desenvolvido por Sulistiono e colaboradores (2018), que analisaram o efeito de um mix de isolados de FMA (*Glomus* sp., *Funneliformis* sp., *Acaulospora* sp., *Gigaspora* sp., e *Scutellospora* sp.) no crescimento de raízes secundárias em cinco clones de cana-de-açúcar. Os autores concluíram que 2 a 3 g de inóculo/broto (aproximadamente 3,6 esporos por grama) seriam suficientes para melhorar significativamente a emergência das raízes, sua extensão e área. Esse resultado foi similar ao observado no presente estudo onde a inoculação conjunta também foi, de maneira geral, mais efetiva que a inoculação do FMA de forma isolada.

5.3 Índice de Correlação de Pearson

Os tratamentos inoculados com *G. albida* apresentaram maiores taxas de colonização e maior taxa de crescimento em alguns parâmetros durante o microcosmo. Por isso, optou-se por avaliar a correlação quantitativa dos parâmetros desse tratamento pelo índice de Pearson, sendo indicado que alguns foram significativamente correlacionados entre si. Segundo esse índice, o número de esporos de *Gigaspora albida* foi negativamente relacionado com a biomassa fresca das mudas e com a taxa de colonização. Ou seja, a biomassa fresca das mudas não seria favorecida com aumento da colonização por *G. albida* ou com a utilização de mais inóculo. Porém, em estudo semelhante, utilizando *C. etunicatum*, *G. albida* e um MIX das duas espécies como inoculante em mudas micropropagadas de *Etlingera elatior* (Jack) R.M.Sm., Silva e colaboradores (2017) observaram efeito positivo da inoculação com *G. albida* no desenvolvimento e crescimento das mudas, em comparação com a associação promovida por *C. etunicatum* ou com o MIX das duas

espécies. Apesar da maioria das espécies de FMA formarem associações micorrízicas com grande parte das plantas terrestres, em alguns casos determinadas espécies irão promover maiores benefícios em detrimento de outra. No presente estudo, a combinação de isolados de três espécies (*A. longula*, *C. etunicatum* e *G. albida*) promoveu melhores benefícios em determinados parâmetros como acúmulo de clorofila, espessura relativa e biomassa seca e fresca da parte aérea durante a aclimatização se comparados com as mudas de cana-de-açúcar inoculadas com as espécies isoladas. Por isso é importante a experimentação com diferentes espécies, inoculadas em conjunto ou isoladamente.

A estatura da planta, a altura e o diâmetro do colmo foram positivamente correlacionados. Dessa forma, acredita-se que uma espécie que promova melhoria em um dos parâmetros irá, consequentemente, beneficiar os demais. Na presente pesquisa, as mudas inoculadas com *A. longula* apresentaram maiores valores de altura, estatura e diâmetro do colmo, sustentando tal hipótese. Um estudo conduzido por Agustini e colaboradores (2020) também demonstrou efeitos positivos da inoculação com diferentes espécies de *Acaulospora* em mudas micropropagadas de *Eucalyptus pellita* F. Muell e *Acacia crassicarpa* A.Cunn. ex Benth.. Embora a diferença entre os tratamentos inoculados não tenha sido significativa, a inoculação com *Acaulospora* sp. demonstrou maior impacto na altura da planta, no diâmetro do colmo e na biomassa seca radicular, o que corrobora, em parte, os resultados encontrados na presente pesquisa.

Em geral, nos estudos experimentais com FMA são utilizados apenas os tratamentos inoculados e o controle sem inoculação, mas a escolha do controle não micorrízico vem sendo pauta de algumas pesquisas. Gryndler e colaboradores (2018) realizaram um completo estudo com diferentes controles não-micorrízicos e chegaram à conclusão que a microbiota presente no substrato de multiplicação dos glomerosporos pode influenciar os resultados. Dessa forma, a correta escolha do controle não-micorrízico é um passo fundamental para o sucesso de uma pesquisa.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hipótese de que a inoculação micorrízica iria influenciar positivamente o crescimento de mudas micropropagadas de casa-de-açúcar, variedade B 8008, não foi comprovada. Assim, em condições de cultivo comercial, mudas micropropagadas de cana-de-açúcar dessa variedade em geral não são responsivas ao tratamento de inoculação com FMA, principalmente durante o período de aclimatização. É possível que o custo representado pela presença do fungo tenha superado os benefícios almejados. No entanto, comparando-se apenas a atuação dos fungos inoculados, constata-se que podem influenciar diferentemente o crescimento das mudas de cana-de-açúcar, e de modo geral a inoculação conjunta de isolados de *Claroideoglomus etunicatum*, *Gigaspora albida* e *Acaulospora longula* mostra-se mais promissora do que a inoculação isolada. As condições comerciais aqui estudadas sugerem a possibilidade de novos testes visando à redução nos insumos utilizados que, em geral, podem suprimir a eficiência dos FMA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acedo, V. Z., Tapayan, C., Damasco, O. P., Laurena, A. C., Namuco, L. O. & Lalusin, A. G. 2017. Establishment of micropropagation systems for clean planting materials of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott). *Philippine Journal of Crop Science* 42: 71-.
- Adeyemi, N. O., Atayese, M. O., Olubode, A. A. & Akan, M. E. 2020. Effect of commercial arbuscular mycorrhizal fungi inoculant on growth and yield of soybean under controlled and natural field conditions. *Journal of Plant Nutrition* 43: 487-499.
- Aguilar, E. A., Elleva, L. I. F., Fabro, D. M. A., Garcia, G. R., II, F. A. D. & Aggangan, N. 2018. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Increased Root-Mycorrhizal Association and Enhanced Seedling Growth of Abaca, Papaya, and Sugarcane. *Journal of ISSAAS (International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences)* 24: 22-29.
- Agustini, L., Irianto, R. S. B., Indrayadi, H., Tanna, R. D., Faulina, S. A., Hidayat, A., ... & Turjaman, M. 2020. The effects of arbuscular mycorrhizal inoculation to growth and survivability of micropropagated *Eucalyptus pellita* and *Acacia crassicaarpa* in nursery. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 533(1): 012028.
- Ajadi, A., Ehirim, B. O., Ishaq, M. N., Isah, A., Isong, A., Ghali, A., Kester, O. & Ejizu, A. N. 2018. Research Article Regeneration of industrial sugarcane using in-vitro plant apical meristem. *Electronic Journal of Plant Breeding* 9: 1342-1347.
- Alizadeh, O. (2011). Mycorrhizal Symbiosis. *Advanced Studies in Biology* 6(3): 273-281.
- Antunes, J. F. G., Lampareli, R. A. C., & Rodrigues, L. H. A. 2015. Avaliação da dinâmica do cultivo da cana-de-açúcar no estado de São Paulo por meio de perfis temporais de dados MODIS. *Eng Agr-Jaboticabal* 35: 1127-1136.
- Arencibia, A. D., Vergara, C., Quiroz, K., Carrasco, B. & García-Gonzales, R. 2013. Establishment of photomixotrophic cultures for raspberry micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *Scientia Horticulturae* 160: 49-53.
- Azevedo, L. C. B. D., Stürmer, S. L., & Lambais, M. R. 2014. Early changes in arbuscular mycorrhiza development in sugarcane under two harvest management systems. *Brazilian Journal of Microbiology* 45(3): 995-1005.
- Barbosa, M. V., Pedroso, D. D. F., Pinto, F. A., Santos, J. V. D., & Carneiro, M. A. C. 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi and *Urochloa brizantha*: symbiosis and spore multiplication. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 49, p. 1-8
- Basyal, B., & Emery, S. M. 2020. An arbuscular mycorrhizal fungus alters switchgrass growth, root architecture, and cell wall chemistry across a soil moisture gradient. *Mycorrhiza*: 1-8.
- Benicasa, 2003. Análise de crescimento de plantas: noções básicas. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41p.
- Berbara, R. L., Souza, F. A., & Fonseca, H. M. A. C. 2006. III-Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição. Nutrição mineral de plantas. *Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, MG, 74-85.
- Brasil, Portal Brasil. 2018. Nordeste comemora aumento da produção de cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/economia-e-financas/2018/06/nordeste-comemora-aumento-na-producao-de-cana-de-acucar>> Acesso em: 02 de Mar de 2019.
- Brito, O. D. C., Hernandez, I., Ferreira, J. C. A., Cardoso, M. R., Alberton, O., & Dias-Arieira, C. R. 2018. Association between arbuscular mycorrhizal fungi and *Pratylenchus brachyurus* in maize crop. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 78(4), 521-527.
- Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220: 1108-1115.
- Brundrett, Mark C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154: 275-304.
- Campos, A. S., Carvalho, A. C. P. P. D., Castro, A. C. R. D. & Bertini, C. H. C. D. M. 2018. Micropropagation of two species of foliage anthurium by direct organogenesis. *Ciência Rural* 48: 1-4.

- Cao, J., Feng, Y., He, S. & Lin, X. 2017. Silver nanoparticles deteriorate the mutual interaction between maize (*Zea mays* L.) and arbuscular mycorrhizal fungi: a soil microcosm study. *Applied Soil Ecology* 119: 307-316.
- Cardon, Z. G. & Whitbeck, J. L. (Eds.). (2011). *The rhizosphere: an ecological perspective*. Elsevier.
- Cardoso, J. C., Gerald, L. T. S. & da Silva, J. A. T. 2018. Micropropagation in the Twenty-First Century. In *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press, New York : 17-46.
- Carra, A., Catalano, C., Badalamenti, O., Carimi, F., Pasta, S., Motisi, A., ... & Garfi, G. 2019. Overcoming sexual sterility in conservation of endangered species: the prominent role of biotechnology in the multiplication of *Zelkova sicula* (Ulmaceae), a relict tree at the brink of extinction. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*: 1-10.
- Carvalho, A. C. P. P., Rodrigues, A. D. J. & Santos, E. D. O. 2016. Panorama da produção de mudas micropropagadas no Brasil (2008-2015). *Embrapa Agroindústria Tropical-Documentos (INFOTECA-E)*. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1058487/1/DOC16004.pdf>.
- Carvalho, A. C. P. P.; Rodrigues, A. A. J.; Santos, E. de O. 2012. Panorama da Produção de Mudas Micropropagadas no Brasil. *Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza*: p. 42.
- Cesaro, P., Massa, N., Cantamessa, S., Todeschini, V., Bona, E., Berta, G., ... & Lingua, G. 2020. Tomato responses to *Funneliformis mosseae* during the early stages of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 30: 601-610.
- Chagnon, P. L., Bradley, R. L., Maherali, H. & Klironomos, J. N. 2013. A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. *Trends in Plant Science* 18(9): 484-491.
- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V. & Chandra, R. 2010. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters* 32: 1199-1205.
- Cid, L. P. B., & Teixeira, J. B. 2010. *Cultivo in vitro de plantas*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica: 303.
- Claassens, A., Nock, C. J., Rose, M. T., Van Zwieten, L. & Rose, T. J. 2018. Colonisation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes in the sugarcane crop cycle. *Rhizosphere* 7: 18-26.
- Claassens, A., Nock, C. J., Van Zwieten, L. & Rose, T. J. 2017. *Mycorrhizal fungi interactions with nutrients, pests and pathogens in sugarcane: a review*. Proceedings of the 39th Conference of the Australian Society of Sugar Cane Technologists 326-332.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento 2018. Boletim da Cana – Observatório Agrícola Nacional: Acompanhamento da safra brasileira V.5 Safra 2018/2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>> Acesso em: 02 de mar de 2019.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento 2019. Boletim da Cana – Observatório Agrícola Nacional: Acompanhamento da safra brasileira V.6 Safra 2019/2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>> Acesso em: 15 de dez de 2020.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento 2020. Boletim da Cana – Observatório Agrícola Nacional: Acompanhamento da safra brasileira V.7 Safra 2020/2021. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>> Acesso em: 04 de Dez de 2020.
- Condic, M. L. 2014. Totipotency: what it is and what it is not. *Stem Cells and Development* 23(8): 796-812.
- Copetta, A., Todeschini, V., Massa, N., Bona, E., Berta, G. & Lingua, G. (2020). Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi improves melon (*Cucumis melo*) fruit quality under field conditions and plant performance in both field and greenhouse. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 1-12.
- Crystian, D., Santos, J. M. D., Barbosa, G. V. D. S. & Almeida, C. 2018. Genetic diversity trends in sugarcane germplasm: Analysis in the germplasm bank of the RB varieties. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 18: 426-431.

- Dagla, H. R., 2012. Plant Tissue Culture: Historical Developments and Applied Aspects. *Resonance* 17: 759-767.
- Del-Saz, N. F., Romero-Munar, A., Alonso, D., Aroca, R., Baraza, E., Flexas, J. & Ribas-Carbo, M. 2017. Respiratory ATP cost and benefit of arbuscular mycorrhizal symbiosis with *Nicotiana tabacum* at different growth stages and under salinity. *Journal of Plant Physiology* 218: 243-248.
- Eftekhari, M., Alizadeh, M., Mashayekhi, K. & Asghari, H. R. 2012. In vitro propagation of four Iranian grape varieties: Influence of genotype and pretreatment with arbuscular mycorrhiza. *Vitis* 51: 175-182.
- Essahibi, A., Benhiba, L., Fouad, M. O., Babram, M. A., Ghoulam, C. & Qaddoury, A. 2019. Responsiveness of carob (*Ceratonia siliqua* L.) plants to arbuscular mycorrhizal symbiosis under different phosphate fertilization levels. *Journal of Plant Growth Regulation* 38(4): 1243-1254.
- Estrada-Luna, A. A., Davies Jr, F. T., & Egilla, J. N. (2000). Mycorrhizal fungi enhancement of growth and gas exchange of micropropagated guava plantlets (*Psidium guajava* L.) during ex vitro acclimatization and plant establishment. *Mycorrhiza* 10(1): 1-8.
- Farias, C. P., Carvalho, R. C., Resende, F. M. & Azevedo, L. C. 2018. Consortium of five fungal isolates conditioning root growth and arbuscular mycorrhiza in soybean, corn, and sugarcane. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 90(4): 3649-3660.
- Farias, D. D. H., Pinto, M. A. B., Carra, B., Schuch, M. W. & Souza, P. V. D. D. 2014. Desenvolvimento de mudas de mirtilheiro inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares. *Revista Brasileira de Fruticultura* 36(3): 655-663.
- Fellbaum CR, Mensah JA, Cloos AJ, Strahan GD, Pfeffer PE, Kiers ET, Bücking H. 2014. Fungal nutrient allocation in common mycelia networks is regulated by the carbon source strength of individual host plants. *New Phytologist* 203: 645–656.
- Ferreira, L. T., de Araújo Silva, M. M., Ulisses, C., Camara, T. R., & Willadino, L. 2017. Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC) 128(1): 211-221.
- Fors, R. O., Saggini Júnior, O. J., Carneiro, M. A. C. & Berbara, R. L. L. (2020). Selection of arbuscular mycorrhizal fungi for sugarcane in four soils with the presence of dark septate endophytes. *Acta Scientiarum. Agronomy* 42: 1-11.
- Fortin, J. A., Bécard, G., Declerck, S., Dalpé, Y., St-Arnaud, M., Coughlan, A. P. & Piché, Y. 2002. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Canadian journal of botany*, 80(1), 1-20.
- George, E. F. 2008. Plant Tissue Procedure – Background. In: George, E. F., Hall, M. A., Klerk, G. J. (eds) *Plant Propagation by Tissue Culture* Vol. 1. Academic Press, Elsevier Inc. pp. 1-28.
- Gerdemann, J. W. & Nicolson, T. H. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46(2): 235-244.
- Getnet, B. 2017. Review on in vitro propagation of sugarcane to advance the value of tissue culture. *Agriculture, Research and Technology: Open Access J* 5: 1-7.
- Giovannetti, M., & Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84(3): 489-500.
- Gough, E. C., Owen, K. J., Zwart, R. S. & Thompson, J. P. 2020. A systematic review of the effects of arbuscular mycorrhizal fungi on root-lesion nematodes, *Pratylenchus* spp. *Frontiers in Plant Science* 11: 1-14.
- Grivet, L., Daniels, C., Glaszmann, J. C. & D'Hont, A. (2004). A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. *Ethnobotany Research and Applications* 2: 009-017.
- Gryndler, M., Šmilauer, P., Püschel, D., Bukovská, P., Hršelová, H., Hujslová, M., ... & Jansa, J. 2018. Appropriate nonmycorrhizal controls in arbuscular mycorrhiza research: a microbiome perspective. *Mycorrhiza* 28: 435-450.

- Guleri, R., Gupta, R. P., Gosal, S. K., Pandher, M. S. & Gosal, S. S. 2005. In vitro and in situ mycorrhization of micropropagated sugarcane plants and its effect on yield. *Indian Journal of Microbiology* 45: 71.
- Gumiere, T., Rousseau, A. N., da Costa, D. P., Cassetari, A., Cotta, S. R., Andreote, F. D., ... & Pavinato, P. S. 2019. Phosphorus source driving the soil microbial interactions and improving sugarcane development. *Scientific Reports* 9: 4400.
- Haberlandt, G. 1902. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien., Math.-Naturwiss. Kl., Abt. 1: 69–92.
- Hashem, A., Abd Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Al-Huqail, A. A., Wirth, S. & Egamberdieva, D. 2016. The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and endophytic bacteria enhances plant growth of *Acacia gerrardii* under salt stress. *Frontiers in Microbiology* 7: 1089.
- Hasner, C., de Lima, A. A. & Winter, E. 2019. Technology advances in sugarcane propagation: A patent citation study. *World Patent Information* 56: 9-16.
- Hijikata N, Murase M, Tani C, Ohtomo R, Osaki M. & Ezawa T. 2010. Polyphosphate has a central role in the rapid and massive accumulation of phosphorus in extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 186: 285–289.
- Jaffuel, G., Imperiali, N., Shelby, K., Campos-Herrera, R., Geisert, R., Maurhofer, M., ... & Hibbard, B. E. (2019). Protecting maize from rootworm damage with the combined application of arbuscular mycorrhizal fungi, *Pseudomonas* bacteria and entomopathogenic nematodes. *Scientific Reports* 9(1): 1-12.
- Jenkins, W. R. B. (1964). A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant disease reporter*, 48(9).
- Juntahum, S. & Boonlue, S. 2018. Efficiency of arbuscular mycorrhiza fungal inoculation with rock phosphate on soil-available phosphorus, and drought stress, growth and yield of sugarcane under field conditions. *International Sugar Journal* 120: 624-629.
- Juntahum, S., Jongrungklang, N., Kaewpradit, W., Lumyong, S. & Boonlue, S. 2020. Impact of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Growth and Productivity of Sugarcane Under Field Conditions. *Sugar Technology* 22: 451-459.
- Kapoor, R., Sharma, D. & Bhatnagar, A. K. 2008. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Scientia Horticulturae* 116: 227-239.
- Kelly, R. M., Edwards, D. G., Thompson, J. P. & Magarey, R. C. 2006. Growth responses of sugarcane to mycorrhizal spore density and phosphorus rate. *Australian journal of agricultural research*, 56(12): 1405-1413.
- Koller, R., Rodriguez, A., Robin, C., Scheu, S. & Bonkowski, M. 2013. Protozoa enhance foraging efficiency of arbuscular mycorrhizal fungi for mineral nitrogen from organic matter in soil to the benefit of host plants. *New Phytologist* 199(1): 203-211.
- Kopper, E., Granilshchikova, M., Leichtfried, T. & Reisenzein, H. 2020. Micropropagation and pathogen elimination in elderberry (*Sambucus nigra* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), 142(3), 647-652.
- Krikorian, A. D. & Berquam, D. L. 1969. Plant cell and tissue cultures: The role of Haberlandt. *Botanical Review* 35: 59–67.
- Kumar, Nitish; Reddy, M. P. 2011. In vitro plant propagation: a review. *Journal of Forest and Environmental Science* 27: 61-72.
- Kumari, K., Lal, M. & Saxena, S. 2018. Cumulative effect of thidiazuron and 1-naphthylacetic acid in massive root proliferation of micropropagated sugarcane plantlet. *Plant Root* 12: 16-20.
- Li, Y., Wang, S., Lu, M., Zhang, Z., Chen, M., Li, S. & Cao, R. 2019. Rhizosphere interactions between earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi increase nutrient availability and plant growth in the desertification soils. *Soil and Tillage Research* 186: 146-151.
- Licks, L. A. D. S. 2018. Avaliação da utilização de microcosmos como ferramenta de análise da eficácia de biomonitoramento no controle de vazamento de CO₂. Tese (Doutorado em

Engenharia e Tecnologia de Materiais) - Pontifícia Universidade Católica (PUC) – Rio Grande do Sul. 143 f.

- Lin, C., Wang, Y., Liu, M., Li, Q., Xiao, W., & Song, X. (2020). Effects of nitrogen deposition and phosphorus addition on arbuscular mycorrhizal fungi of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*). *Scientific Reports* 10(1): 1-8.
- Locatelli, L. M., & Lovato, P. E. 2002. Mycorrhizal inoculation and acclimatization of two micropropagated apple rootstocks. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 177-184.
- Loyola-González, O., Medina-Pérez, M. A., Hernández-Tamayo, D., Monroy, R., Carrasco-Ochoa, J. A., & García-Borroto, M. 2019. A Pattern-Based Approach for Detecting Pneumatic Failures on Temporary Immersion Bioreactors. *Sensors* 19: 414.
- Loyola-Vargas, V. M.; Ochoa-Alejo, N. 2018. An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. In: *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press, New York: 3-13.
- Machado, S. S. 2012. Tecnologia da Fabricação do Açúcar. *Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de Goiás. Santa Maria*. Universidade Federal de Santa Maria. Disponível em: <https://www.ufsm.br/app/uploads/sites/413/2018/12/11_tecnologia_fabricacao_acucar.pdf> Acesso em: 25 de Out de 2019.
- Machineski, G. S., Victola, C. A. G., Honda, C., Machineski, O., de Fátima Guimarães, M. & Balota, E. L. 2018. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on early development of persimmon seedlings. *Folia Horticulturae* 30: 39-46.
- Manechini, J. R. V., da Costa, J. B., Pereira, B. T., Carlini-Garcia, L. A., Xavier, M. A., de Andrade Landell, M. G. & Pinto, L. R. 2018. Unraveling the genetic structure of Brazilian commercial sugarcane cultivars through microsatellite markers. *PloS One*, 13: 1-21.
- Mardhiah, U., Caruso, T., Gurnell, A., & Rillig, M. C. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae reduce soil erosion by surface water flow in a greenhouse experiment. *Applied Soil Ecology* 99: 137-140.
- Mathur, A., Mathur, A. K., Verma, P., Yadav, S., Gupta, M. L. & Darokar, M. P. 2008. Biological hardening and genetic fidelity testing of micro-cloned progeny of *Chlorophytum borivillianum* Sant. et Fernand. *African Journal of Biotechnology* 7(8): 1046-1053.
- Mendonça, J. D. J., Gois, L. D. S., Santos, J. F. S., Santos, T. A. D. C., Holanda, F. S. R. & Marino, R. H. 2019. Native microbiota and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on growth of *Paspalum millegrana* Schrad. *Revista Caatinga* 32: 345-353.
- Mensah, J. A., Koch, A. M., Antunes, P. M., Kiers, E. T., Hart, M. & Bücking, H. 2015. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi is associated with differences in phosphate and nitrogen uptake and fungal phosphate metabolism. *Mycorrhiza*, 25: 533-546.
- Millar, N. S.; Bennett, A. E. 2016. Stressed out symbiotes: hypotheses for the influence of abiotic stress on arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 182: 625-641.
- Mohammadi, M., Modarres-Sanavy, S. A. M., Pirdashti, H., Zand, B. & Tahmasebi-Sarvestani, Z. 2019. Arbuscular mycorrhizae alleviate water deficit stress and improve antioxidant response, more than nitrogen fixing bacteria or chemical fertilizer in the evening primrose. *Rhizosphere* 9: 76-89.
- Morone-Fortunato, I., & Avato, P. 2008. Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 93: 139-149.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology* 25: 135-166.
- Murashige, T., & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15: 473-497.
- Nandhakumar, N., Kumar, K., Sudhakar, D., & Soorianathasundaram, K. 2018. Plant regeneration, developmental pattern and genetic fidelity of somatic embryogenesis derived *Musa* spp. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16: 587-598.

- Niazian, M. 2019. Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants. *Planta* 249: 953-973.
- Oliveira, J. R. G. D., Moraes, T. A. D. L., Melo, N. F. D. & Yano-Melo, A. M. 2010. Fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias promotoras de crescimento na aclimatização de *Zingiber spectabile*. *Bragantia* 69(3): 687-694.
- Oliveira, J. R. G. D., Moraes, T. A. D. L., Melo, N. F. D. & Yano-Melo, A. M. 2011. Acclimatization of *Tapeinochilos ananassae* plantlets in association with arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46(9): 1099-1104.
- Oropeza, C., Sáenz, L., Chan, J. L., Sandoval, G., Pérez-Núñez, G., Narvaez, M., ... & Borroto, C. 2016. Coconut micropropagation in México using plumule and floral explants. *Cord* 32: 21-26.
- Ortas, Í., Rafique, M., Akpinar, C., & Kacar, Y. A. 2017. Growth media and mycorrhizal species effect on acclimatization and nutrient uptake of banana plantlets. *Scientia Horticulturae* 217: 55-60.
- Paula, M. D., Reis, V. M., & Döbereiner, J. 1991. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). *Biology and Fertility of Soils* 11: 111-115.
- Pedone-Bonfim, M. V. L., da Silva, D. K. A., Maia, L. C., & Yano-Melo, A. M. 2018. Mycorrhizal benefits on native plants of the Caatinga, a Brazilian dry tropical forest. *Symbiosis* 74: 79-88.
- Pereira, L. S., da Silva Santos, I., Alvim, F. A. C., de Souza Júnior, J. E. O. & Gross, E. 2017. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated *Comanthera mucugensis* spp. *mucugensis* (Eriocaulaceae). *African Journal of Agricultural Research* 12(20): 1772-1780.
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British mycological Society* 55(1): 158-161.
- Pizano, C., Mangan, S. A., Graham, J. H. & Kitajima, K. 2017. Host-specific effects of soil microbial filtrates prevail over those of arbuscular mycorrhizae in a fragmented landscape. *Ecological Applications* 27(6): 1946-1957.
- Quiroz, K. A., Berríos, M., Carrasco, B., Retamales, J. B., Caligari, P. D. & García-González, R. 2017. Meristem culture and subsequent micropropagation of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.). *Biological Research* 50: 1-11.
- Redae, M. H., & Ambaye, T. G. 2018. In Vitro propagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) variety C86-165 through apical meristem. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 14: 228-234.
- Reinhardt, D. H. R., Bartholomew, D. P., Souza, F. V. D., Carvalho, A. C. P. P. D., Pádua, T. R. P. D., Junghans, D. T., & Matos, A. P. D. (2018). Advances in pineapple plant propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura* 40(6): e-302. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452018000604002&lng=en&nrm=iso>.
- Rocha, H. S. 2013. Biofábricas: estrutura física e organização. In: Junghans, T. G.; Souza, A. da S. (eds). *Aspectos práticos da micropropagação de plantas*. 2a ed. Brasília: Embrapa Cap. 5: 134-164.
- Romero-Munar, A., Tauler, M., Gulías, J. & Baraza, E. 2018. Nursery preconditioning of *Arundo donax* L. plantlets determines biomass harvest in the first two years. *Industrial Crops and Products*, 119, 33-40.
- Ruta, C., Tagarelli, A., Vancini, C. & De Mastro, G. 2016. Evaluation of commercial arbuscular mycorrhizal inoculants on micropropagated early globe artichoke during the acclimatization stage. In *IX International Symposium on Artichoke, Cardoon and Their Wild Relatives* 1147 (pp. 369-374).
- Sahodaran, N. K., Arun, A. K. & Ray, J. G. 2019. Native arbuscular mycorrhizal fungal isolates (*Funneliformis mosseae* and *Glomus microcarpum*) improve plant height and nutritional status of banana plants. *Experimental Agriculture* 55(6): 924-933.

- Santana, A. S., Cavalcante, U. M. T., Sampaio, E. V. D. S. B., & Maia, L. C. 2014. Production, storage and costs of inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *Brazilian Journal of Botany* 37(2): 159-165.
- Scherwinski-Pereira, J. E., Costa, F. H. S. & Oliveira, J. P. de. Micropropagação de bananeira visando à produção massal de mudas de elevado padrão genético e fitossanitário. 2009. In: Gonçalves, R. C.; Oliveira, L. C. de (Org.). *Embrapa: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do sudoeste da Amazônia*. Rio Branco: Embrapa Acre 1: 253-290.
- Shasmita, Rai, M. K., & Naik, S. K. 2018. Exploring plant tissue culture in *Withania somnifera* (L.) Dunal: In vitro propagation and secondary metabolite production. *Critical Reviews in Biotechnology* 38: 836-850.
- Shukla, S. K.; Sharma, P.; Swarup, R. 2012. Impact of national certification system for tissue culture raised plants (NCS-TCP) on Indian plant tissue culture industry: a unique quality management system for commercial plant tissue culture. *Journal of Biotechnology & Biomaterials* 2: 6-58.
- Silva, A. R., de Melo, N. F. & Yano-Melo, A. M. 2017. Acclimatization of micropropagated plants of *Etlingera elatior* (Jack) RM Sm. inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *South African Journal of Botany* 113: 164-169.
- Silva, J. A., Solis-Gracia, N., Jifon, J., Souza, S. C. & Mandadi, K. K. 2020a. Use of bioreactors for large-scale multiplication of sugarcane (*Saccharum* spp.), energy cane (*Saccharum* spp.), and related species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*: 1-11.
- Silva, K. B. D., Reiniger, L. R. S., Stefanel, C. M., & Rabaiolli, S. M. D. S. 2020b. Sucrose and substrates on the acclimatization of micropropagated *Luehea divaricata* plants. *Floresta e Ambiente* 27(1): e20171170, Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2179-80872020000100127&lng=en&nrm=iso>.
- Silva, M. A. D., Silva, F. S. B. D., Yano-Melo, A. M., Melo, N. F. D., & Maia, L. C. 2006. Fungos micorrízicos arbusculares e vermicomposto na aclimação de *Alpinia purpurata* (Viell.) Schum e *Zingiber spectabile* Griff.(Zingiberaceae). *Acta Botanica Brasilica* 20(2): 249-256.
- Simões-Neto, D. E. 2008. Variedades de cana-de-açúcar no estado de Pernambuco: contribuição do melhoramento clássico da Ridesa-UFRPE. *Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônomicas* 5: 125-146.
- Sivakumar, N. 2013. Effect of edaphic factors and seasonal variation on spore density and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in sugarcane fields. *Annals of Microbiology* 63: 151-160.
- Smith, S. & Read, D.; 2008. *Mycorrhizal Symbiosis* 3rd edition. Academic Press, New York, NY.
- Snyman, S. J., Shezi, S. N., & Ramburan, S. 2018. Field Assessment of In Vitro Micropropagated NovaCane® Sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). *Sugar Technology* 20: 609-612.
- Sulistiono, W. & Yudono, P. 2018. Application of arbuscular mycorrhizal fungi accelerates the growth of shoot roots of sugarcane seedlings in the nursery. *Australian Journal of Crop Science*, 12(7), 1082-1089.
- Tauler, M. & Baraza, E. 2015. Improving the acclimatization and establishment of *Arundo donax* L. plantlets, a promising energy crop, using a mycorrhiza-based biofertilizer. *Industrial Crops and Products*, 66, 299-304.
- Tedersoo, L., Sánchez-Ramírez, S., Kõljalg, U., Bahram, M., Döring, M., Schigel, D., ... & Abarenkov, K. 2018. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity* 90: 135-159.
- Tesfa, M., Admassu, B. & Bantte, K. 2016. In vitro rooting and acclimatization of micropropagated elite sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) genotypes-N52 and N53. *Journal of Tissue Science and Engineering* 7:1: 1-6.
- Thorpe, T. A., 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37: 169-180.

- Van Der Heijden, M. G., Bardgett, R. D., & Van Straalen, N. M. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11: 296-310.
- Villa, F., Pereira, A. R., Pasqual, M., & de Araujo, A. G. 2015. Influência de substratos alternativos na aclimatização de orquídeas. *Ceres* 54: 501-505.
- Wang, F., Sun, Y., & Shi, Z. 2019. Arbuscular mycorrhiza enhances biomass production and salt tolerance of sweet sorghum. *Microorganisms* 7: 1-14.
- Wang, W., Shi, J., Xie, Q., Jiang, Y., Yu, N., & Wang, E. 2017. Nutrient exchange and regulation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Molecular plant* 10: 1147-1158.
- Weinert, N., Piceno, Y., Ding, G. C., Meincke, R., Heuer, H., Berg, G., ... & Smalla, K. 2011. PhyloChip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: many common and few cultivar-dependent taxa. *FEMS Microbiology Ecology* 75(3): 497-506.
- Wright D. P., Read D. J., & Scholes J. D. 1998. Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant Cell Environment* 21: 881-891.
- Wu, Q. S., Li, G. H., & Zou, Y. N. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient acquisition of peach (*Prunus persica* L. Batsch) seedlings. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 21(4): 746-750.
- Yadav, K., Aggarwal, A., & Singh, N. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi induced acclimatization and growth enhancement of *Glycyrrhiza glabra* L.: a potential medicinal plant. *Agricultural Research* 2: 43-47.
- Yadav, S., Nagaraja, T. E., Lohithaswa, H. C., & Shivakumar, K. V. 2020. Effect of Temperature, Humidity and Light Intensity on Micropropagated Sugarcane (*Saccharum* species hybrid) Genotypes. *Sugar Technology* 22(2): 226-231.
- Yeasmin, R., Bonser, S. P., Motoki, S., & Nishihara, E. 2019. Arbuscular mycorrhiza influences growth and nutrient uptake of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) under heat stress. *HortScience* 54: 846-850.
- Yılmaz, N., Çetiner, S., & Ortaş, İ. 2020. The effects of the mycorrhiza on plant growth during acclimatization of some in vitro grown sweet cherry rootstocks. *International Journal of Agricultural and Natural Sciences* 13: 10-19.
- Zhang, L., Xu, M., Liu, Y., Zhang, F., Hodge, A., & Feng, G. 2016. Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium. *New Phytologist* 210: 1022-1032.