

FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NA ACLIMATIZAÇÃO DE *ZINGIBER SPECTABILE* (1)

JOÃO RICARDO GONÇALVES DE OLIVEIRA (2); THIAGO ALBERTO DE LIMA MORAES (2); NATONIEL FRANKLIN DE MELO (3); ADRIANA MAYUMI YANO-MELO (4*)

RESUMO

Microrganismos benéficos exercem importantes funções para a sobrevivência e o desenvolvimento de plantas micropropagadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e rizobactérias promotores de crescimento de plantas (RPCP), isolados e/ou combinados (em dupla inoculação) na aclimatização de *Zingiber spectabile* Griff. O experimento foi realizado em casa de vegetação utilizando tubetes de 300 mL e pó da casca de coco (Amafibra®) como substrato. O delineamento foi do tipo inteiramente casualizado com dois tratamentos de inoculação com FMA [*Glomus etunicatum* (Ge) e a mistura de *G. etunicatum* com *Gigaspora margarita* (Ge/Gm)], dois tratamentos de inoculação com RPCP [*Bacillus thuringiensis* (HPF₁₄) e *B. pumilus* (HPS₆)], quatro tratamentos com a combinação destes microrganismos [Ge+HPS₆, Ge+HPF₁₄, Ge/Gm+HPS₆ e Ge/Gm+HPF₁₄], e o tratamento-controle (não inoculado), em oito repetições. Após 90 dias de cultivo foram avaliados: percentual de sobrevivência, altura, área foliar, biomassa fresca e seca da parte aérea (BFA e BSA) e radicular (BFR e BSR), colonização micorrízica (CM) e conteúdo de macro e micronutrientes na parte aérea. A coinoculação (Ge/Gm+HPS₆) favoreceu significativamente a micorrização em relação aos demais tratamentos, e resultou em maior BFA em relação às plantas submetidas à inoculação com HPF₁₄. Embora a sobrevivência das mudas na aclimatização tenha sido de 100%, de modo geral o desenvolvimento de *Z. spectabile* inoculado com HPF₁₄ isolado e/ou combinado com os FMA é inferior ao observado para as plantas controle. O resultado sugere que o uso dos microrganismos promotores do crescimento de plantas deve se feito com cautela, considerando a relação custo/benefício da aplicação.

Palavras-chave: Glomeromycota, rizobactérias, *Bacillus* sp., micropropagação, plantas ornamentais.

ABSTRACT

ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI AND PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA IN THE ACCLIMATIZATION OF *ZINGIBER SPECTABILE*

Beneficial microorganisms are important for survival and development of micropropagated plants. The objective of this work was to evaluate the potential of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), isolated and/or combined (in dual inoculation) on acclimatization of *Zingiber spectabile* Griff. The experiment was carried out in a greenhouse using containers of 300 mL and dust from coconut shell (Amafibra®) as substrate. The experimental design was completely randomized with two AMF treatments [*Glomus etunicatum* (Ge) and the mixture of *G. etunicatum* and *Gigaspora margarita* (Ge/Gm)], two treatments with PGPR inoculation [*Bacillus thuringiensis* (HPF₁₄) and *B. pumilus* (HPS₆)], four treatments combining these microorganisms [Ge+HPS₆, Ge+HPF₁₄, Ge/Gm+HPS₆ and Ge/Gm+HPF₁₄] and a control treatment (not inoculated), with eight replicates. After 90 days survival percentage, height, leaf area, fresh and dry biomass of shoots (FBS and DBS) and roots (FBR and DBR), mycorrhizal colonization and content of macro and micronutrients in the shoot were evaluated. Co-inoculation (Ge/Gm+HPS₆) benefited significantly the mycorrhization when compared to the other treatments, resulting in higher FBS than that produced by HPF₁₄ inoculation. Although with 100% survival after the acclimatization period, the development of *Z. spectabile* inoculated with HPF₁₄ isolated and/or combined with AMF is lower than the observed for control plants. The results suggest that the use of plant growth-promoting microorganisms should be done carefully, considering the cost/benefit of the application.

Key words: Glomeromycota, rhizobacteria, *Bacillus* sp., micropropagation, ornamental plants.

(1) Recebido para publicação em 17 de setembro de 2009 e aceito em 23 de fevereiro de 2010

(2) Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Departamento de Micologia, CCB, UFPE, Rua Nelson Chaves, s/n, 50670-420 Recife (PE). E-mail: jrgoliveira@yahoo.com.br.

(3) Embrapa Semiárido, Caixa Postal 23, 56304-970 Petrolina (PE).

(4) Colegiado de Zootecnia, Univasf, Av. José de Sá Maniçoba, s/n, 56304-917, Petrolina (PE). E-mail: amymelo17@hotmail.com (*) Autora correspondente.

1. INTRODUÇÃO

A floricultura tropical é uma atividade econômica de grande relevância no agronegócio nacional e mundial, principalmente devido à elevada rentabilidade, promovendo a criação e fixação de mão-de-obra no campo, bem como a oferta de cultura alternativa para pequenos produtores (LINS e COELHO, 2004). Dentre as plantas ornamentais tropicais de interesse na floricultura, *Zingiber spectabile* Griff. ainda é uma espécie pouco difundida, mas com grande potencial de exploração e excelentes perspectivas de crescimento de cultivo.

Pertencente à família Zingiberaceae e oriunda da Ásia, é conhecida popularmente no Brasil como: sorvetão, gengibre ornamental, maracá ou xampu. São plantas perenes, herbáceas, robustas, rizomatosas, caracterizadas por sua inflorescência composta de brácteas amarelo-brilhante de grande durabilidade pós-colheita muito apreciada na ornamentação de ambientes (LUZ et al., 2005). A propagação desta espécie para fins comerciais é feita vegetativamente, o que favorece o acúmulo e a disseminação de doenças através de gerações sucessivas de propagação clonal. Deste modo, uma das alternativas é a micropropagação, na qual é possível obter, em curto espaço de tempo e em qualquer época do ano, grande número de indivíduos de boa qualidade fitossanitária e autenticidade varietal (MACIEL et al., 2000). Contudo, o sucesso da micropropagação depende da eficiência na fase crítica de aclimatização, uma vez que esta etapa envolve a transição de condições heterotróficas *in vitro* para a condição autotrófica, na qual as plântulas necessitam ativar a fotossíntese e a absorção de água e nutrientes, estando mais suscetíveis ao déficit hídrico (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Além disso, plantas micropropagadas, devido ao cultivo auxotrófico, são desprovidas de microrganismos benéficos, tornando-se mais suscetíveis a estresses ambientais, como o ataque de microrganismos sapróbios e eventuais patógenos (MELLO et al., 2002).

Uma das tecnologias alternativas para o melhor desenvolvimento de plantas é a inoculação de microrganismos benéficos, que isolados ou combinados exercem funções importantes para a sobrevivência do hospedeiro e, conseqüentemente, podem aumentar a produtividade (ARTURSSON et al., 2006). Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) têm sido utilizados na produção de mudas e na aclimatização de plantas micropropagadas com respostas promissoras dos hospedeiros. Esta associação simbiótica mutualista expande a zona de absorção da raiz, aumentando a superfície de contato com o solo, favorecendo maior absorção de nutrientes como fósforo (P), zinco (Zn), cobre (Cu), potássio (K) (BRESSAN et al., 2001) e nitrogênio (GUPTA et al., 2002), resultando no aumento da tolerância

do vegetal a estresses abióticos e bióticos (MAIA et al., 2006). De forma similar, as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) aumentam o rendimento de vegetais micropropagados por meio da supressão de doenças, da produção e/ou alteração da concentração de fito-hormônios, além de aumentar a eficiência na absorção de nutrientes, em especial os de baixa mobilidade como o ferro (Fe) e o P (VESSEY, 2003).

Benefícios proporcionados em várias culturas de importância econômica pela inoculação com FMA (STANCATO e SILVEIRA, 2006; YANO-MELO et al., 1999), RPCP (YASMIN et al., 2007; MENA-VIOLANTE e OLALDE-PORTUGAL, 2007), além do uso combinado destes microrganismos (KOHLENER et al., 2007; ROESTI et al., 2006) têm sido observados. Assim, a produção de mudas micropropagadas, aliada à inoculação isolada ou combinada de FMA e/ou RPCP pode se constituir em ferramenta biotecnológica de interesse para o cultivo de espécies ornamentais.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de FMA e RPCP, isolados e/ou combinados, na aclimatização de *Z. spectabile*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo, substrato e plantas utilizadas

O experimento foi realizado em casa de vegetação, sob condições ambientais controladas (temperatura: 27 ± 2 °C; umidade relativa: 75%; luminosidade: 250 a $560 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). O substrato utilizado foi pó da casca de coco - Golden-Mix (Amafibra®) com as seguintes características: pH 5,8, P $8,9 \text{ g kg}^{-1}$, N $6,1 \text{ g kg}^{-1}$, K $5,5 \text{ g kg}^{-1}$, Ca $6,8 \text{ g kg}^{-1}$, Mg $2,8 \text{ g kg}^{-1}$, S $5,0 \text{ g kg}^{-1}$, B $64,9 \text{ mg kg}^{-1}$, Cu $134,0 \text{ mg kg}^{-1}$, Fe $1164,0 \text{ mg kg}^{-1}$, Mn $120,0 \text{ mg kg}^{-1}$, Zn $128,0 \text{ mg kg}^{-1}$ além de $100,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de Na.

Foram utilizadas plantas micropropagadas de sorvetão (*Zingiber spectabile* Griff.), provindas da multiplicação em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 4 mg L^{-1} de 6-benzilaminopurina.

Microrganismos

Foram utilizados os isolados dos FMA *Gigaspora margarita* Becker & Hall e *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann, multiplicados na casa de vegetação em vasos contendo areia:solo (1:1 v/v) previamente desinfestados, tendo como hospedeiro o sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench.). Após a multiplicação, o inóculo produzido foi avaliado quanto ao número de glomerosporos empregando-se as técnicas de decantação e peneiramento úmido, seguido por centrifugação em água e sacarose (40% p/v), e a contagem realizada em placas canaletadas, em estereomicroscópio (40 x). Através da contagem dos esporos foi determinada a

alíquota a ser utilizada como inóculo, que continha cerca de 200 glomerosporos, além de pedaços de raiz colonizada e micélio micorrízico.

Dois isolados de RPCP provenientes do Setor de Fitopatologia da Embrapa Semi-Árido: HPF₁₄ (*Bacillus thuringiensis* Berlinev subvar. kurstakii) e HPS₆ (*B. pumilus* Meyer & Gottheil), conservadas em papéis de filtro dessecados, foram reativadas passando por repiques no meio de cultura NYDA (extrato de carne – 3 g; extrato de levedura – 5 g; peptona – 5 g; dextrose – 10 g; ágar – 18 g; água destilada – 1000 mL) (PUSEY e WILSON, 1984) contido em placas de Petri para multiplicação e obtenção de colônias isoladas. Estas colônias foram repicadas para Erlenmeyer (capacidade de 250 mL) contendo 50 mL de meio NYD (extrato de carne – 3 g; extrato de levedura – 5 g; peptona – 5 g; dextrose – 10 g; água destilada – 1000 mL), submetido à agitação a 125 rpm por 24 horas. A suspensão bacteriana obtida foi diluída para se obter a concentração de inóculo de 10⁸ UFC/mL, confirmada pela leitura em espectrofotômetro (580 nm) correspondente a 0,52 de absorbância.

Delineamento experimental

O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos de inoculação de FMA [*Glomus etunicatum* (Ge) e a mistura de *G. etunicatum* com *Gigaspora margarita* (Ge/Gm)], dois tratamentos de inoculação de RPCP [*Bacillus thuringiensis* (HPF₁₄) e *B. pumilus* (HPS₆)], quatro tratamentos com a combinação destes microrganismos [Ge + HPS₆, Ge + HPF₁₄, Ge/Gm + HPS₆ e Ge/Gm + HPF₁₄], além do controle (não inoculado), com oito repetições o que totalizou 72 parcelas experimentais.

As plântulas micropropagadas de *Z. spectabile* foram retiradas dos frascos de crescimento e lavadas em água corrente até completa remoção do meio de cultura, sendo selecionadas a fim de se obter uniformidade de tamanho e número de folhas. No momento do transplante para tubetes de 300 mL contendo o substrato (pó da casca de coco), as plântulas foram inoculadas ou não, dependendo do tratamento. Quando submetidas à inoculação com RPCP, o sistema radicular passou por imersão em 10 mL da suspensão bacteriana correspondente a 10⁸ UFC mL⁻¹, por aproximadamente 10 minutos, sendo a suspensão restante vertida no colo das plântulas de acordo com o tratamento. A aplicação dos FMA foi realizada com cerca de 200 glomerosporos na região radicular na forma de solo-inóculo (contendo solo, raízes colonizadas, hifas e glomerosporos). Nos tratamentos- controle foram adicionados 2 mL de filtrado, oriundo do peneiramento (em malha de 45 µm) de todos os inóculos testados, visando equilibrar a microbiota do solo.

Parâmetros avaliados

Durante os 90 dias de aclimatização foram avaliados a altura e o número de folhas e no fim do experimento foi determinada a taxa de sobrevivência, área foliar, biomassa fresca e seca da parte aérea e radicular, colonização micorrízica, número de glomerosporos e conteúdo de nutrientes na parte aérea.

Para determinação da biomassa seca, amostras de folhas e raízes de *Z. spectabile* foram colocadas em estufa (65 °C) até massa constante. Após a pesagem, amostras da parte aérea foram trituradas em moinho do tipo Willye, onde porções de 0,5 g dessas amostras foram mineralizadas por digestão nítrico-perclórica para posterior determinação dos teores de Ca e Mg por espectrofotometria de absorção atômica (EAS); P por colorimetria, K e Na por fotometria de emissão de chama. O teor de N foi determinado em 100 mg de amostra digerida com ácido sulfúrico em presença de uma mistura de selênio em pó, sulfato de cobre e sulfato de potássio, pelo método Kjeldahl. Todas as análises foram realizadas conforme metodologia da Embrapa (1999). Os valores de concentração obtidos foram multiplicados pela biomassa seca produzida para obtenção do conteúdo de nutrientes por planta.

A colonização micorrízica foi estimada pelo método de McGonigle et al. (1990), após diafanização das raízes com KOH 10% e H₂O₂ 10%, acidificação em HCl 1% e posterior coloração com azul de Trypan (0,05%). O número de glomerosporos foi avaliado por contagem, empregando-se as técnicas descritas anteriormente. A área foliar foi estimada em um medidor digital de área foliar e para determinação do incremento produzido pela presença dos inóculos de FMA e/ou RPCP utilizou-se a seguinte fórmula: $I (\%) = [(Tr - T) T^{-1}] \times 100$, sendo: I (%) = incremento da variável; Tr = valor médio para o tratamento inoculado; T = valor médio do controle.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as variáveis com diferenças significativas foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observaram-se em plantas de *Z. spectabile* diferentes respostas aos inóculos utilizados na aclimatização, não sendo constatado efeito sobre a sobrevivência durante esta fase. A inoculação combinada e/ou isolada do *Bacillus thuringiensis* (HPF₁₄) trouxe prejuízo significativo ao desenvolvimento vegetal sendo observados valores, em média, inferiores ao controle e demais tratamentos em quase todos os parâmetros avaliados. Utilizando duas cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, com o objetivo de avaliar

o efeito sobre microrganismos presentes na rizosfera do sorgo, BRASIL et al. (2006) observaram que apesar de estimular a colonização micorrízica os inóculos reduziram o crescimento das plantas. No presente trabalho, nem a colonização micorrízica nem a produção de glomerosporos foi estimulada pela utilização do inóculo HPF₁₄ (Tabela 1); entretanto, de forma similar ao referido por BRASIL et al. (2006), tanto a produção de biomassa, como o desenvolvimento das plantas de *Z. spectabile* foram reduzidos (Tabelas 2 e 3).

Em plantas de *Heliconia psittacorum*, isolados de *B. cereus* e *B. subtilis* também induziram redução na área foliar e biomassa seca aérea (SANTOS et al., 2005). Por outro lado, em outros trabalhos com isolados de *B. thuringiensis* os efeitos foram positivos ou neutros no crescimento vegetal. Utilizando o isolado ENF16 em mudas de abacaxizeiro micropropagado, MELLO

et al. (2002) observaram aumentos na altura e na produção de biomassa aérea em relação à testemunha. Similarmente, GOMES et al. (2003) relataram aumento de 43% da matéria fresca total trabalhando com mudas de alface, quando o isolado C25 de *B. thuringiensis* foi utilizado. Em mudas de pepino, o mesmo isolado produziu respostas negativas de crescimento (SILVEIRA et al., 2004). Relata-se ainda o efeito neutro para o crescimento de plantas de alface, apesar do estímulo à colonização micorrízica promovida pela coinoculação *B. thuringiensis*/*G. intraradices* e *B. thuringiensis*/*G. mosseae* (VIVAS et al., 2003). O tratamento com *Bacillus pumilus* (HPS₆), isoladamente, foi o único a proporcionar aumento significativo ($P < 0,05$) na produção de biomassa fresca e seca radicular de *Z. spectabile* (Tabela 2) com incrementos de respectivamente, 226% e 133%, em relação ao controle. Outros isolados de *B. pumilus*,

Tabela 1. Área foliar, colonização micorrízica e número de glomerosporos na rizosfera de plantas de *Zingiber spectabile* Griff. inoculadas com FMA [*Glomus etunicatum* (Ge) e a mistura *G. etunicatum* com *Gigaspora margarita* (Ge/Gm)] e/ou RPCP [*Bacillus thuringiensis* (HPF₁₄) e *B. pumilus* (HPS₆)], após 90 dias em casa de vegetação

Tratamento	Área foliar cm ²	Colonização %	N.º de Glomerosporos g ⁻¹ substrato
Controle	75,96 bc	0 d	0 e
Ge/Gm	97,95 ab	17,26 bc	1,46 b
Ge	106,14 a	4,52 d	2,12 a
HPS ₆	90,62 ab	0 d	0 e
HPF ₁₄	52,24 cd	0 d	0 e
Ge/Gm+HPS ₆	72,60 bc	60,33 a	1,16 bc
Ge/Gm+HPF ₁₄	33,93 d	19,18 b	0,62 d
Ge+HPS ₆	71,01 bc	11,75 bc	1,26 b
Ge+HPF ₁₄	40,60 d	9,55 cd	0,82 cd

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2. Produção de biomassa fresca e seca da parte aérea e radicular de *Zingiber spectabile* Griff. inoculadas com FMA [*Glomus etunicatum* (Ge) e a mistura *G. etunicatum* com *Gigaspora margarita* (Ge/Gm)] e/ou RPCP [*Bacillus thuringiensis* (HPF₁₄) e *B. pumilus* (HPS₆)], após 90 dias em casa de vegetação

Tratamento	Produção de Biomassa			
	Fresca		Seca	
	Aérea	Radicular	Aérea	Radicular
	g			
Controle	2,71 ab	1,02 b	0,29 abc	0,15 b
Ge/Gm	3,49 a	1,06 b	0,37 ab	0,15 b
Ge	3,68 a	1,28 b	0,50 a	0,21 b
HPS ₆	3,37 a	3,33 a	0,42 ab	0,35 a
HPF ₁₄	2,32 abc	0,77 b	0,32 abc	0,11 b
Ge/Gm+HPS ₆	2,95 a	1,27 b	0,33 abc	0,13 b
Ge/Gm+HPF ₁₄	1,47 bc	0,62 b	0,17 c	0,09 b
Ge+HPS ₆	2,46 abc	1,53 b	0,26 bc	0,16 b
Ge+HPF ₁₄	1,26 c	0,71 b	0,16 c	0,09 b

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

como ENF10 e C116, proporcionaram benefícios à altura e biomassa seca aérea em abacaxizeiro micropropagado (MELLO et al., 2002), além de incrementos na ordem de 50% para a biomassa fresca total em mudas de alface (GOMES et al., 2003).

O uso do isolado HPS₆ combinado à mistura de *G. etunicatum* e *G. margarita* (tratamento Ge/Gm+HPS₆) proporcionou elevada colonização micorrízica. Este fato, pode estar relacionado ao estímulo no crescimento da biomassa micelial proporcionado por algumas rizobactérias (BRASIL et al., 2006), aumentando as chances de estas hifas iniciarem a colonização radicular. No entanto, benefício adicional ao mix fúngico e às plantas não foram verificados, visto que o número de glomerosporos tanto no tratamento isolado (Ge/Gm) como no combinado (Ge/Gm+HPS₆) foram estatisticamente similares (Tabela 1) e a área foliar, biomassa, altura e número de folhas não diferiram do controle (Tabelas 1, 2 e 3). Resultados similares de estímulo à colonização micorrízica sem benefícios aos hospedeiros foram verificados em plantas cultivadas em solo contaminado por Zn (VIVAS et al., 2006) e em bananeiras micropropagadas (ANJOS, 2008). O inverso foi observado no tratamento apenas com *G. etunicatum* (Ge) que, apesar da menor colonização micorrízica, proporcionou maior área foliar, com incremento de 39,7% em relação ao controle, além de maior número de

glomerosporos, diferindo significativamente dos demais tratamentos inoculados (Tabela 1). Ressalta-se ainda que, apesar de não significativa, a inoculação com Ge proporcionou o maior incremento para biomassa fresca aérea (35,7%) e para biomassa seca aérea (72,4%) em relação ao controle e aos demais tratamentos (Tabela 2); além disso, a partir da diferença entre a biomassa fresca e seca, o maior valor obtido foi observado em Ge, demonstrando assim, que plantas submetidas a este tratamento retiveram maior quantidade de água, aspecto importante na fase de aclimatização.

Testando também a influência da inoculação com *G. etunicatum* na aclimatização de mudas de *Z. spectabile* em diferentes substratos, SILVA et al. (2006) não observaram interações significativas, justificadas, entre outros fatores, pelos elevados teores de P, especialmente nos tratamentos adubados. A baixa concentração de P (8,9 g kg⁻¹) presente no pó da casca de coco deste experimento pode ter contribuído para o desempenho positivo do inóculo de Ge testado, uma vez que elevadas concentrações desse macronutriente afetam a funcionalidade da simbiose e consequentemente os benefícios advindos da micorrização (SIQUEIRA et al., 2004).

A altura das plantas submetidas aos tratamentos Ge/Gm, Ge, HPS₆ e Ge/Gm+HPS₆ foi numericamente maior apesar de não diferir significativamente do controle, com incrementos aos 45 dias, fato não

Tabela 3. Altura e número de folhas de *Zingiber spectabile* Griff. inoculadas com FMA [*Glomus etunicatum* (Ge) e a mistura *G. etunicatum* com *Gigaspora margarita* (Ge/Gm)] e/ou RPCP [*Bacillus thuringiensis* (HPF₁₄) e *B. pumilus* (HPS₆)], aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias em casa de vegetação

Tratamentos	Tempo (dias)					
	15	30	45	60	75	90
	Altura (cm)					
Controle	5,62 a	6,00 a	9,43 ab	12,25 ab	12,25 ab	12,87 a
Ge/Gm	5,00 a	4,62 a	7,50 ab	11,12 ab	12,62 ab	15,42 a
Ge	5,37 a	7,25 a	10,87 a	14,25 a	14,56 a	15,50 a
HPS ₆	6,00 a	6,62 a	10,06 a	12,00 ab	13,37 a	14,50 a
HPF ₁₄	4,12 a	4,25 a	5,56 c	6,87 d	7,75 c	9,37 b
Ge/Gm+HPS ₆	4,87 a	5,50 a	7,93 ab	10,87 ab	13,31 a	14,37 a
Ge/Gm+HPF ₁₄	4,62 a	4,50 a	6,37 bc	7,71 cd	8,00 c	9,71 b
Ge+HPS ₆	5,12 a	4,75 a	6,12 bc	8,50 bc	9,12 bc	9,50 b
Ge+HPF ₁₄	4,50 a	4,25 a	6,12 bc	7,75 cd	8,87 bc	9,00 b
	N.º folhas					
Controle	5,87 a	6,12 a	8,12 a	7,87 a	6,37 a	7,12 ab
Ge/Gm	4,50 a	5,25 a	7,50 a	5,87 ab	6,50 a	8,85 a
Ge	6,25 a	5,75 a	7,0 a	6,62 ab	6,12 a	6,37 b
HPS ₆	5,37 a	5,25 a	7,62 a	7,12 ab	6,25 a	7,00 ab
HPF ₁₄	3,50 a	3,87 a	5,00 a	4,50 c	4,62 a	5,87 b
Ge/Gm+HPS ₆	5,75 a	4,37 a	5,87 a	5,75 ab	4,87 a	6,12 b
Ge/Gm+HPF ₁₄	4,37 a	3,62 a	5,57 a	5,14 bc	5,14 a	6,28 b
Ge+HPS ₆	4,50 a	3,75 a	5,25 a	5,00 bc	4,50 a	5,37 b
Ge+HPF ₁₄	3,50 a	3,12 a	4,25 a	4,25 c	4,37 a	4,62 b

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna e para cada variável avaliada, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

observado para o número de folhas, pois somente aos 90 dias os tratamentos Ge/Gm e HPS₆, respectivamente, foram os mais promissores (Tabela 3).

Os teores e conteúdos de nutrientes, exceto nitrogênio (N), não puderam ser determinados para as plantas do tratamento-controle em função da técnica empregada devido à baixa produção de matéria seca (Tabela 4). Efeito de diluição para os teores de P, Ca e Na foram constatados nos tratamentos Ge/Gm, Ge, HPS₆, Ge/Gm+HPS₆ e Ge+HPS₆. Esses resultados eram esperados, devido ao melhor desenvolvimento aéreo das plantas de *Z. spectabile* nesses tratamentos. Diminuição nos teores de certos nutrientes correlacionados ao maior desenvolvimento de grávidas submetidas à inoculação com FMA também foram observados (CHU et al., 2001).

Apesar do efeito de diluição, observado inclusive em plantas que receberam o inóculo HPF₁₄, os conteúdos de P e Na na parte aérea não diferiram entre os tratamentos. O baixo desenvolvimento das plantas submetidas à inoculação e/ou coinoculadas com HPF₁₄ refletiu-se no conteúdo de N na parte aérea das plantas (Tabela 4). Segundo MELLO et al. (2002), o aumento no vigor das plantas inoculadas com RPCP, entre elas *B. thuringiensis* (ENF10), esta relacionado ao maior

acúmulo do N, fato que pode ser observado também nas plantas associadas com Ge (Tabelas 1, 2 e 3).

Os teores de P, Ca e Na foram maiores nos tratamentos Ge/Gm+HPF₁₄ e Ge+HPF₁₄, demonstrando o efeito sinérgico da dupla inoculação para o aumento na absorção destes nutrientes. Por outro lado, o teor de K foi maior nos tratamentos Ge/Gm, Ge, HPS₆ e HPF₁₄, observando-se nesse caso um efeito redutivo da dupla inoculação na aquisição desse nutriente (Tabela 4), possivelmente relacionado a um antagonismo entre os microrganismos aplicados. KOHLER et al. (2007) também obtiveram maior teor de K quando os isolados de FMA (*Glomus intraradices*) e RPCP (*Bacillus subtilis*) foram usados separadamente em plantas de alface. No entanto, ROESTI et al. (2006) tiveram diminuição deste macronutriente na presença isolada ou coinoculada. Dessa forma, constata-se a necessidade de conhecer a resposta da inoculação isolada ou em conjunto sobre os mecanismos diretos e indiretos que podem atuar na absorção, visando sugerir inoculantes microbianos para produção de mudas, em especial de flores tropicais.

A aplicação da mistura de diferentes isolados representa uma importante estratégia na promoção do crescimento, dependendo da combinação e compatibilidade dos microrganismos envolvidos, visto

Tabela 4. Teor e conteúdo dos macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg) e sódio (Na) na parte aérea de *Zingiber spectabile* Griff. inoculados com FMA [*Glomus etunicatum* (Ge) e a mistura *G. etunicatum* com *Gigaspora margarita* (Ge/Gm)] e/ou RPCP [*Bacillus thuringiensis* (HPF₁₄) e *B. pumilus* (HPS₆)]

Tratamentos	Teor					
	N	P	K	Ca	Mg	Na
	g kg ⁻¹					mg kg ⁻¹
Controle	11,77 a	-	-	-	-	-
Ge/Gm	11,42 a	0,92 c	11,07 a	5,88 c	5,01 ab	252,0 e
Ge	11,02 a	1,14 bc	10,25 a	6,59 bc	5,59 a	287,6 de
HPS ₆	10,96 a	1,07 bc	10,49 a	6,90 bc	4,79 b	324,0 cd
HPF ₁₄	11,31 a	0,98 bc	9,70 a	6,30 bc	4,62 bc	332,0 cd
Ge/Gm+HPS ₆	10,44 a	1,27 b	3,30 b	5,76 c	4,83 ab	390,0 b
Ge/Gm+HPF ₁₄	11,07 a	1,70 a	4,42 b	7,01 ab	5,28 ab	532,8 a
Ge+HPS ₆	10,73 a	1,13 bc	3,14 b	5,96 c	3,96 c	370,0 bc
Ge+HPF ₁₄	10,90 a	1,76 a	4,54 b	7,42 a	5,03 ab	484,0 a
Tratamentos	Conteúdo					
	N	P	K	Ca	Mg	Na
	g planta ⁻¹					mg planta ⁻¹
Controle	3,51 abc	-	-	-	-	-
Ge/Gm	4,72 ab	0,34 a	4,28 a	2,26 ab	1,94 abc	95,27 a
Ge	5,19 a	0,49 a	4,68 a	2,96 a	2,43 a	133,10 a
HPS ₆	4,84 ab	0,48 a	4,56 a	2,75 a	2,11 ab	140,44 a
HPF ₁₄	2,80 c	0,24 a	2,53 ab	1,57 ab	1,18 bc	81,57 a
Ge/Gm+HPS ₆	3,38 abc	0,48 a	1,47 b	1,94 ab	1,62 abc	110,21 a
Ge/Gm+HPF ₁₄	2,10 c	0,29 a	0,83 b	1,27 b	0,98 bc	91,00 a
Ge+HPS ₆	2,94 bc	0,35 a	0,92 b	1,68 ab	1,15 bc	100,70 a
Ge+HPF ₁₄	1,96 c	0,27 a	0,88 b	1,33 b	0,89 c	86,06 a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

que interações entre diferentes grupos RPCP e FMA foram observadas, embora o mecanismo ainda não seja totalmente compreendido (KOHLENER et al., 2007). Apesar do número reduzido de isolados testados neste trabalho, alguns foram promissores, em especial os tratamentos Ge/Gm, Ge e HPS₆, que, de forma geral, beneficiaram o desenvolvimento e o estado nutricional de mudas de *Zingiber spectabile* durante a fase de aclimatização. Novos testes devem ser realizados com estes isolados separadamente ou em misturas, com o objetivo de esclarecer os mecanismos ativos de promoção do crescimento e da interação FMA e RPCP para melhor eficiência da sua aplicação.

4. CONCLUSÕES

1. A rizobactéria *Bacillus pumilus* HPS₆, quando associada a *Glomus etunicatum* / *Gigaspora margarita* estimula a colonização micorrízica de plantas de *Z. spectabile*;

2. A inoculação com *B. thuringiensis* afeta negativamente o desenvolvimento vegetativo de *Z. spectabile* durante a aclimatização;

3. Isolados de *G. etunicatum* / *G. margarita*, *G. etunicatum* e *B. pumilus* são promissores para a produção de mudas de *Z. spectabile* micropropagadas em substrato constituído de casca de coco;

4. A inoculação com FMA e RPCP afeta positivamente o teor nutricional de P, K, Ca e Na das plantas micropropagadas de *Z. spectabile*, dependendo da combinação utilizada;

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo, ao CNPq pela bolsa de PQ concedida a AM Yano-Melo e N.F. Melo; à FACEPE pelo auxílio à pesquisa e a todos os funcionários do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semi-Árido pelo apoio na execução dos experimentos.

REFERÊNCIAS

ANJOS, E.C.T. **Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas e fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de mudas micropropagadas de bananeira**. 2008. 182f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ARTURSSON, V.; FINLAY, R.D.; JANSSON, J.K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. **Environmental Microbiology**, v.8, p.1-10, 2006.

BRASIL, C.; MATSUMOTO, L.S.; NOGUEIRA, M.A.; SPAGO, F.R.; RAMPAZO, L.G.; CRUZ, M.F.; ANDRADE, G. Effect of *Bacillus thuringiensis* on microbial functional groups in sorghum rhizosphere. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.873-877, 2006.

BRESSAN, W.; SIQUEIRA, J.O.; VASCONCELLOS, C.A.; PURCINO, A.A.C. Fungos micorrízicos e fósforo, no crescimento, nos teores de nutrientes e na produção do sorgo e soja consorciados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p.250-260, 2001.

CHU, E.Y.; MOLLER, M.R.F.; CARVALHO, J.G. Efeitos da inoculação micorrízica em mudas de graviola em solo fumigado e não fumigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p.671-680, 2001.

EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Solos/Embrapa Informática Agropecuária/Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 370p.

GOMES, A.M.A.; MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; MESQUITA, J.C.P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito da utilização de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, v.21, p.699-703, 2003.

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

GUPTA, M.L.; PRASAD, A.; RAM, M.; KUMAR, S. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. **Bioresource Technology**, v.81, p.77-79, 2002.

KOHLER, J.; CARAVACA, F.; CARRASCO, L.; ROLDA, A. Interactions between a plant growth-promoting rhizobacterium, an AM fungus and a phosphate-solubilising fungus in the rhizosphere of *Lactuca sativa*. **Applied Soil Ecology**, v.35, p.480-487, 2007.

LINS, S.R.O.; COELHO, R.S.B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.332-335, 2004.

LUZ, P.B.; ALMEIDA, E.F.A.; PAIVA, P.D.O.; RIBEIRO, T.R. Cultivo de flores tropicais. **Informe Agropecuário**, v.26, p.62-72, 2005.

MACIEL, A.L.R.; SILVA, A.B.; PASQUAL, M. Aclimação de plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha* Wendl) obtidas *in vitro*: efeitos do substrato. **Ciência Agrotécnica**, v.24, p.9-12, 2000.

MAIA, L.C.; SILVEIRA, N.S.S.; CAVALCANTI, U.M.T. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and root pathogens. In: RAI, M.K. (Org.). **Handbook of Microbial Biofertilizers**. New York: The Haworth Press, 2006. p.325-352.

- MCGONIGLE, T.P.; MILLER, M.H.; EVANS, D.G.; FAIRCHILD, G.L.; SWAN, J.A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.115, p.495-501, 1990.
- MELLO, M.R.F.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, M.; CÂMARA, T.R.; ASSIS, S.M.P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopathologica**, v.28, p.222-228, 2002.
- MENA-VIOLANTE, H. G.; OLALDE-PORTUGAL, V. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. **Scientia Horticulturae**, v.113, p.103-106, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.
- PUSSEY, P. L.; WILSON, C. L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, v.68, p.753-756, 1984.
- ROESTI, D.; GAUR, R.; JOHRI, B.N.; IMFELD, G.; SHARMA, S.; KAWALJEET, K.; ARAGNO, M. Plant growth stage, fertilizer management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.1111-1120, 2006.
- SANTOS, M.H.L.C., MARIANO, R.L.R., CAMARA, T.R., ANDRADE, A.G., WILLADINO, L.; LIMA, G.P.P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, v.32, p.301-308, 2005.
- SILVA, M.A.; SILVA, F.S.B.; YANO-MELO, A.M.; MELO, N.F.; MAIA, L.C.. Fungos micorrízicos arbusculares e vermicomposto na aclimação de *Alpinia purpurata* (Viell.) Schum e *Zingiber spectabile* Griff. (Zingiberaceae). **Acta Botanica Brasílica**, v.20, p.249-256, 2006.
- SILVEIRA, E.B.; GOMES, A.M.A; MARIANO, R.L.R.; SILVA, N.E.B. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, v.22, p.217-221, 2004.
- SIQUEIRA, J.O.; ANDRADE, A.T.; FAQUIM, V. O papel dos microrganismos na disponibilização e aquisição de fósforo pelas plantas. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S. (Eds.). **Fósforo na agricultura brasileira**. Piracicaba: Potafos, 2004. p.117-149.
- STANCATO, G.C.; SILVEIRA, A.P.D. Associação de fungos micorrízicos arbusculares e cultivares micropropagadas de antúrio. **Bragantia**, v.65, p.511-516, 2006.
- VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v.255, p.571-586, 2003.
- VIVAS, A.; MARULANDA, A.; GÓMEZ, M.; BAREA, J.M.; AZCÓN R. Physiological characteristics (SDH and ALP activities) of arbuscular mycorrhizal colonization as affected by *Bacillus thuringiensis* inoculation under two phosphorus levels. **Soil Biology and Biochemistry**, v.35, p.987-996, 2003.
- VIVAS, A.; BIRÓ, B.; RUÍZ-LOZANO, J.M.; BAREA, J.M.; AZCÓN, R. Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity. **Chemosphere**, v.62, p.1523-1533, 2006.
- YANO-MELO, A.M.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; LIMA-FILHO, J.M.; MELO, N.F.; MAIA, L.C. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatization of micropropagated banana plantlets. **Mycorrhiza**, v.9, p.119-123, 1999.
- YASMIN, F.; OTHMAN, R.; SIJAM, K.; SAAD, M.S. Effect of PGPR inoculation on growth and yield of sweetpotato. **Journal of Biological Sciences**, v.7, p.421-424, 2007.