

INTERAÇÃO ENTRE O FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR *Glomus clarum* E *Fusarium oxysporum f.sp herbemontis* EM PORTA-ENXERTOS DE VIDEIRA MICROPROPAGADOS

Paula Carolina Kath¹ ; Liliane Martins de Brito²

INTRODUÇÃO

O cultivo da uva está ligado ao homem pela história, pelas religiões e especialmente no caso do ocidente, pela colonização das Américas, África e Austrália. No Brasil, a vitivinicultura está relacionada principalmente com os estados da região sul. Em Santa Catarina, a vitivinicultura é uma exploração agrícola tradicional ligada à sócio-economia de regiões de origem italiana, principalmente do Vale do Rio do Peixe e de Urussanga. Contudo, desenvolve-se no estado nova região, que compreende as cidades do planalto serrano. A cultura nesses locais está se desenvolvendo não em função da imigração italiana, mas baseada em resultados de pesquisas técnicas (BRITO, 2012).

Com a crescente pressão nos custos de produção através da alta de insumos e mão-de-obra, torna-se cada vez mais importante que o viticultor busque a profissionalização, a racionalização de insumos, o aumento da qualidade da produção e a proteção ambiental, adotando tecnologias mais adequadas que, segundo PROTAS *et al.* (2001), ainda apresenta potencial enológico inferior aos dos países vizinhos, como o Chile e a Argentina.

Portanto, tais perspectivas indicam que o êxito da atividade em uma região vitivinícola, dependerá, sobretudo, de variedades adequadas que apresentem características qualitativas na produção de uva e vinho. Nesse sentido, a escolha do

¹ Aluno do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense, Videira. Curso técnico em Agropecuária. E-mail: paulakath_11@hotmail.com

² Professora Orientadora do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense, Videira. Curso técnico em Agropecuária. E-mail: lilianebrito@ifc-videira.edu.br

porta-enxerto é fundamental para o bom resultado na implantação do vinhedo. Cada porta-enxerto adapta-se a determinadas condições de solo e clima e tem comportamento diferente segundo a variedade enxertada (CAMARCO, 1994).

Na década de 90, observou-se nas regiões vitivinícolas de Santa Catarina, uma queda considerável na produtividade dos vinhedos e uma forte redução da área plantada, decorrentes da morte de plantas, causadas, em parte, pela fusariose (*Fusarium oxysporum f.sp. Herbemontis*). Em virtude da ocorrência de moléstias, foram realizados trabalhos de seleção, propagação *in vitro*, produção e certificação de plantas matrizes e mudas (BORGHEZAN *et al.*, 2003) e, mais recentemente, levaram à estudos sobre micro-organismos capazes de antagonizar com fungos patogênicas do solo.

O domínio do processo propagativo através do cultivo *in vitro* e a definição do comportamento de um grupo de porta-enxertos de videiras de interesse comercial inoculados com micro-organismos antagônicos da rizosfera da videira como o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* poderá estimular os produtores ao cultivo e a implantação de videiras com alto padrão genético-sanitário.

PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O experimento está sendo conduzido nos municípios de Videira, Lages e Caçador, com o apoio da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI de Videira, Caçador e Lages, durante o período de 2013 a 2016.

Para os estudos, estão sendo utilizados os porta-enxertos 110R (*Vitis rupestris* x *Vitis berlandieri*), 3309C (*Vitis riparia* x *Vitis rupestris*) e 5BB (*Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*) por apresentarem características favoráveis ao cultivo de vinhedos nas regiões de altitude em Santa Catarina, nova região de cultivo (Martins, 2006; BRITO, 2012) porém susceptíveis à fusariose. O porta-enxerto P1103 (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) está sendo utilizado como a variedade testemunha por apresentar resistência à moléstia (SÔNEGO, 1998; BORGHEZAN *et al.*, 2003;

GIOVANINNI, 2008). As plantas matrizes dos porta-enxertos estão sendo mantidas em casa de vegetação da EPAGRI de Videira.

Os esporos do Fungo Micorrízico Arbuscular (FMA) *Glomus clarum* estão sendo providenciados com a Universidade Federal de Santa Catarina, por cooperação entre as instituições de ensino. Para a multiplicação do inóculo dessa espécie, estão sendo utilizadas plantas de manjeriço (*Ocimum basiculum*) como hospedeiras, cultivadas em vasos previamente desinfestados, com substrato autoclavado preparado à base de solo, composto termofílico e vermiculita (2:3:3,v:v:v), já testado em trabalhos anteriores (CASSOL, 1996, citado por PEREIRA, 2006).

Para o isolamento do fungo patogênico *Fusarium oxysporum f.sp herbemontis*, utilizou-se o meio com Batata Dextrose Ágar (BDA), acrescido de antibiótico, a partir de segmentos de raízes de videiras com sintomas da moléstia. Utilizou-se 500mL de BDA, depois de autoclavado adicionou-se 1 cápsula de rifampicina. A cápsula foi diluída em 10 mL de acetona e acrescentou-se na solução do meio de BDA, procedimento realizado em câmara de fluxo laminar. As placas inoculadas com o fungo patogênico foram colocadas na BOD a 20°C, por 12 horas de claro + 12 horas de escuro para o crescimento micelial. A identificação morfológica da espécie foi realizada através da observação em microscópio óptico.

Para a produção das mudas micro-propagadas, os explantes das plantas matrizes passaram por limpeza, ou seja, os ramos foram lavados com uma escovinha nova em água corrente e detergente, enxaguados com água destilada. Posteriormente, os segmentos nodais foram cortados com uma ou duas gemas. Em câmara de fluxo laminar, o material foi embebido em álcool 70% por 30 segundos. Após, em água sanitária (marca comercial Q-bom 80%) com 1 gota de detergente Tween 20, agitados, por 15 minutos. Foram lavados três vezes em água destilada e, posteriormente, implantados no meio de cultura DSD1 (SILVA da & DOAZAN, 1995). Os frascos estão sendo mantidos em câmaras de crescimento durante 40 dias ou até as plantas atingirem altura em torno de 8 cm para posterior repicagem.

A aclimação e plantio das plântulas está sendo realizado em bandejas cobertas com vidros contendo Plantmax®, momento em que se procederá à adição dos inóculos de *Fusarium oxysporum f.sp herbemontis* pelo contato do patógeno e transferidas para câmara de crescimento com temperatura de 25°C e 80% de umidade relativa do ar.

Os experimentos sobre a inoculação de *Fusarium oxysporum* e a combinação com o fungo micorrízico arbuscular sobre a fusariose em porta-enxertos de videira ainda não foram finalizados devido ao tempo requerido para a multiplicação e desenvolvimento dos porta-enxertos e dos fungos, além da possibilidade de visualização da interação entre as espécies.

Os experimentos sobre a inoculação de *Fusarium oxysporum* e a combinação com o fungo micorrízico arbuscular sobre a fusariose em porta-enxertos de videira será realizado em delineamento completamente casualizado com 16 repetições e, quando houver efeitos significativos dos tratamentos, as médias serão separadas pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ao nível de 5% de probabilidade. Serão feitas análises de correlação simples entre os parâmetros de crescimento, a identificação da presença ou ausência do patógeno e colonização radicular (definido pelo número de segmentos infectados por estruturas de colonização - hifas, vesículas e arbúsculos/ total segmentos analisados) pelo FMA por porta-enxerto, empregando-se o coeficiente de correlação de Pearson (r) com valores máximos representados por $r = 1$ e $r = -1$.

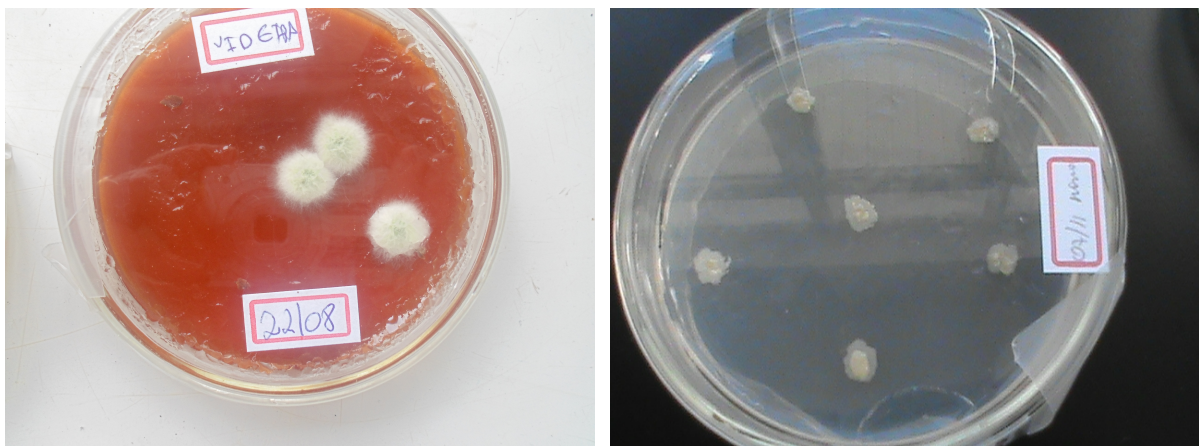
RESULTADOS E DISCUSSÕES

A coleta a campo aconteceu nos dias 20 e 21 de agosto de 2013, a partir de segmentos de raízes de videiras afetadas pela doença conhecida como fusariose, doença causada pelo fungo *Fusarium oxysporum f.sp herbemontis* que ataca o sistema radicular da planta (BORGHEZAN *et al.*, 2003). A cultivar utilizada para a coleta dos segmentos infectados foi a *Cabernet sauvignon* e o local foi área Experimental da Estação Experimental da Epagri de Videira, Santa Catarina.

Um dia após a coleta, 22 de agosto de 2013, procedeu-se a inoculação das placas com o fungo patogênico. Tecidos da raiz da videira com sintomas da doença foram colocados no meio de cultura BDA com antibiótico. O procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar da Estação Experimental da Epagri de Caçador.

Posteriormente, as placas inoculadas com o fungo patogênico foram colocadas na BOD, a 20°C, para o crescimento micelial e sua identificação. No dia 02 de setembro 2013 foi possível perceber o crescimento dos fungos nas placas de Petri, como observado na fotografia 01. Das nove placas, apenas 3 desenvolveram fungos. Os próximos passos foram a repicagem e a manutenção das colônias em placas de Petri com BDA, sem antibiótico.

Fotografia 01 – Colônias de fungos isolados em meio ágar batata dextrose, com antibiótico, e colônias monospóricas contaminadas com bactérias.



Os estudos dos conídios e a identificação das colônias de fungos foram realizados com o auxílio do engenheiro agrônomo Walter F. Becker, pesquisador da Epagri, em Caçador.

A fotografia 01 também mostra que ao se proceder as culturas monospóricas, em 14 de novembro de 2013, todas as placas apresentaram contaminação com bactérias. Culturas monospóricas são aquelas oriundas de um único esporo. Para a coleta de um único esporo foi necessário obter uma suspensão através da raspagem superficial do micélio, com auxílio de um pincel. Uma gota

dessa porção foi estriada em placa contendo meio ágar/água para diluição dos conídios e obtenção dos isolados monospóricos (diluição dos esporos e plaqueamento em agar- água). Após 48 horas, os esporos germinados foram retirados da placa, com auxílio de um estilete, sob microscópio e em câmara de fluxo laminar.

Ao estudar o desenvolvimento de bactérias nas colônias monospóricas, enquanto nas colônias anteriores não apareceram, observou-se que elas se encontravam no ambiente de crescimento das colônias, porém suprimidas pelo desenvolvimento do fungo. Ao selecionar um esporo, esse crescimento foi menor e as bactérias puderam se desenvolver e suprimir o crescimento fúngico.

Foram necessárias outras tentativas até que em 18 de dezembro de 2013, nenhuma placa com as colônias monospóricas apresentaram contaminações com bactérias. A partir da obtenção das colônias monospóricas do fungo causador da fusariose, as placas foram conservadas em geladeira para ser utilizada posteriormente nos estudos. Segundo a literatura científica, as colônias podem ser mantidas viáveis na geladeira por até 7 anos.

A primeira e a segunda experiência de introdução dos genótipos *in vitro* aconteceram nos dias 9 – 10/01/2014 e 23 -24/01/2014. Com o material retirado das plantas da estufa foi possível realizar duas experiências de introdução dos explantes em meio de cultura. Contudo, não foram bons os resultados devido à contaminação com fungos e, eventualmente, com bactérias.

Na segunda experiência, apenas foi aumentado o tempo no álcool de 30 para 40 segundos e na água sanitária de 15 para 20 minutos. No entanto, não foi possível eliminar os esporos dos fungos, que rapidamente germinaram e se proliferaram no meio de cultura. Como resultado, apenas um explante do porta-enxerto P1103 conseguiu se desenvolver, apresentando, em 21/03/2014, 5 folhas.

Na terceira tentativa de introdução dos genótipos em cultura *in vitro*, os explantes foram desinfestados acrescentando-se à sequência a diluição de cloreto de mercúrio a 0,12%, por 5 minutos, procedimento realizado em 28/02 e 01/03. A tabela 01 mostra o resultado da introdução *in vitro* dos porta-enxertos, em 21 de março de 2014. Observa-se que os porta-enxertos P1103 e 5BB se desenvolveram

adequadamente na condição *in vitro* utilizada e o porta-enxerto 110R aquele que demonstrou menor desenvolvimento nessas condições, apresentando gema inchada para o posterior brotamento, enquanto os demais já haviam brotado e desenvolvido folha.

Tabela 01 - Resultado da introdução *in vitro* dos porta-enxertos, em 21/03/2014:

Porta-enxertos	Número de explantes viáveis/ 30 explantes (sem contaminação ou oxidados)	Desenvolvimento dos explantes
P1103	25	Bem desenvolvidos com 2 folhas em média
110R	12	Pouco desenvolvidos com gema inchada
3309C	15	Bem desenvolvidos com 1 folha em média
5BB	22	Bem desenvolvidos com 1 folha em média

Contudo, no dia 28 de março, realizou-se a repicagem e a introdução dos explantes do meio de cultura DSD1 transferindo-os para MS/2, com BAP (5 μ M). Essa alteração no meio de cultura fez-se necessária devido ao desenvolvimento das plântulas de alguns porta-enxertos, requerendo um meio mais rico em nutrientes, apesar da utilização do meio MS ((MURASHIGE & SKOOG, 1962, citado por LIMA DA SILVA & DOAZAN, 1995) ser meia força. Também essa alteração serviu para estimular brotações nos explantes, com a utilização do hormônio vegetal 6-benzilaminopurina. Contudo, a concentração de 5 μ M teve que ser posteriormente diminuída para 2 μ M por provocar encurtamento dos segmentos nodais e vitrificação das plântulas em desenvolvimento.

Posteriormente, no início de abril (11/04/2014), observou-se o desenvolvimento de bactérias endógenas ao explante, provocando a morte das plântulas e novas alterações no meio de cultura foram realizadas. Introduziu-se ao meio de cultura MS/2, com BAP (2 μ M), o antibiótico *Streptomycin sulphate* (50 mg/l). Desde esse momento, as plântulas estão se desenvolvendo e sendo repicadas (Fotografias 02). Um único explante foi introduzido em tubo de ensaio para o desenvolvimento da parte aérea e raízes. A utilização de tubos de ensaio facilita os estudos posteriores com fungos, a interação entre fungo/planta no desenvolvimento de sistemas fitopatogênicos.

Para os estudos da interação entre o porta-enxerto P1103 e o fungo patogênico *Fusarium oxysporium f.sp herbemontis*, foram utilizadas plântulas micropropagadas de 30 dias de idade, ou com 8 cm de altura e entorno de 6 folhas. Os fungos foram inseridos na base das plântulas desenvolvidas no meio de cultura, através de segmentos culturais de micélios desenvolvidos em BDA. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar para evitar contaminação com micro-organismos indesejáveis.

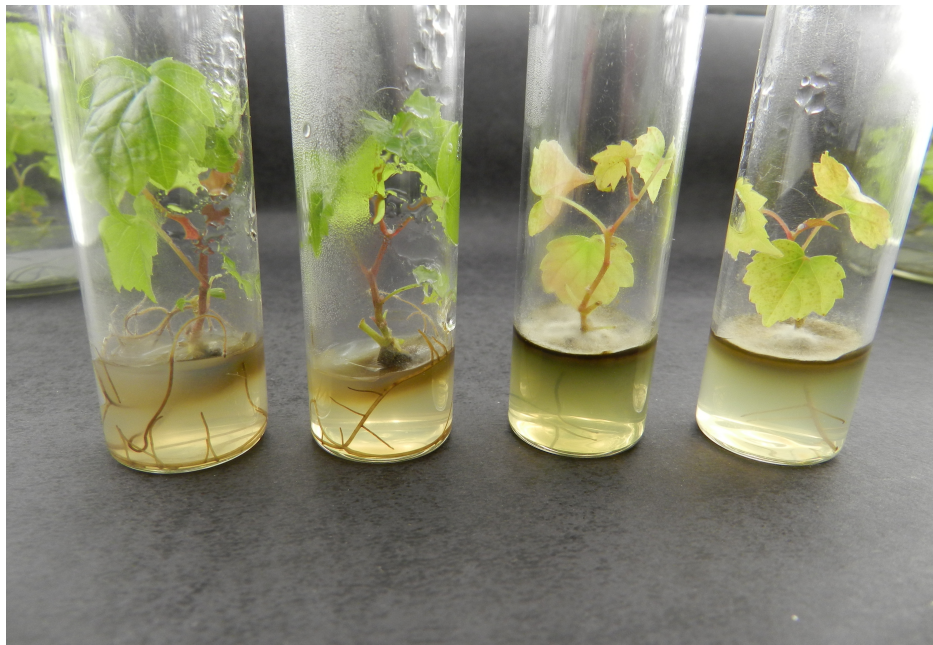
Fotografia 02 – Micropropagação do porta-enxerto P1103 realizado pela bolsista Paula Kath e detalhe do desenvolvimento do porta enxerto de videira em meio de cultura na sala de crescimento, a 25°C e iluminação artificial.



Após vinte dias da inserção do fungo patogênico no meio de crescimento *in vitro*, observou-se que, das 36 plântulas utilizadas no estudo, 12 (33,3%) apresentaram sintomas da doença, ou seja, mostraram-se amareladas, com crescimento deficiente. Como esse fungo afeta o câmbio vascular das raízes da planta, a coloração amarelada das folhas é sinal de falta de nutrientes não translocados para o necessário desenvolvimento das plântulas em meio *in vitro* (Fotografia 03). Vinte (20) plântulas, ou 66,7 %, apresentaram crescimento normal, mesmo após a introdução e desenvolvimento do fungo patogênico no meio de cultura.

Observou-se que tais plântulas emitiram novas raízes acima do meio com o crescimento micelial, demonstrando uma considerável resistência do porta-enxerto em relação a doença em estudo (Fotografia 03). Apesar dos resultados serem indicativos do comportamento do porta-enxerto em relação à fusariose, serão necessários estudos que considerem um tempo maior para o desenvolvimento e infecção do fungo nas plântulas, bem como o aparecimento dos sintomas dessa doença vascular. Também deverá ser testada essa interação em vasos com substrato, *ex vitro*, associados ou não com o fungo micorrízico arbuscular, além de repetir a experiência com os demais porta-enxertos micro-propagados para os estudos (110R, 3309C e 5BB).

Fotografia 03 – plântulas do porta-enxerto P1103 micro-propagadas com o fungo patogênico causador da fusariose. As duas primeiras plântulas apresentando crescimento normal. As duas últimas apresentando sintomas da doença, com coloração das folhas amarelada e crescimento menor.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

A introdução dos explantes em meio *in vitro* não foi simples, devido a contaminação com micro-organismos e ao pequeno desenvolvimento de determinados porta-enxertos. Observou-se que alguns porta-enxertos se desenvolveram melhor em ambiente *in vitro*, como foi o caso do Pausen 1103, cruzamento entre *Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*. Outros porta-enxertos necessitaram meio de crescimento mais rico em nutrientes, como o MS, e com a adição do hormônio BAP – 6- benzilaminopurina. Entretanto, percebeu-se que a utilização desse hormônio pode provocar, além do esperado brotamento dos explantes, o encurtamento dos entre-nós e plantas pequenas vitrificadas. A redução da concentração de BAP de 5 μM para 2 μM fez-se necessário.

Os estudos da interação entre o porta-enxerto P1103 com o fungo *Fusarium oxysporium f.sp herbemontis* demonstraram uma considerável resistência do porta-enxerto em relação a doença fusariose, pois aproximadamente 67% das plântulas se desenvolveram normalmente, sem apresentar os sintomas característicos da moléstia. Das plântulas estudadas, apenas entorno de 33% apresentaram-se doentes, apresentando crescimento deficiente e folhas amareladas. Apesar dos resultados da interação entre o porta-enxerto P1103 serem indicativos de seu comportamento em relação à fusariose, serão necessários estudos que considerem um tempo maior para o desenvolvimento e infecção do fungo nas plântulas, bem como o aparecimento dos sintomas dessa doença vascular. Também deverá ser testada essa interação em vasos, *ex vitro*, com os demais porta-enxertos micro-propagados selecionados para o estudo.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, W.; DALL'ORTO, F. A. C.; OJIMA, M.; CAMPOS, S. A. F. C.; TOMBOLATO, A. F. C.. Propagação vegetativa in vitro de cultivares de macieira. *Bragantia*, Campinas 45(1): p. 143 – 154, 1986.

BIASI, L. A.; PASSOS, I.R. da S.; POMMER, C.V. Estabelecimento in vitro de porta-enxertos de videira através de ápices meristemáticos e segmentos nodais. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 55, n. 2, p.45-49, 1998.

BORGHEZAN, M.; MORAES, L. K. A, de; MOREIRA, F. M.; SILVA, A. L. Propagação in vitro e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 38, n. 7, p. 783-789, jul. 2003.

BOTTON, M.; SORIA, S. de J.; HICKEL, E. R. Uvas viníferas para processamento em regiões de clima temperado. *Embrapa Uva e Vinho. Sistema de Produção*, 4. ISSN 1678-8761. Versão Eletrônica. Jul./2003.

BRITO, F. A. Uva e vinho. *Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina*. 2010-2011. Instituto Cepa – Epagri. Versão Eletrônica. Nov./2012. p. 83-88.

CAMARGO, U.A. *Uvas do Brasil*. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Uva e Vinho, 1994. 90 p.

CARNIEL, E. Uso de fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de porta-enxertos de videira e no controle biológico de *Fusarium oxysporum f. sp. herbemontis*. Porto Alegre. UFRGS. Dissertação de Mestrado. 2004. 73p.

GIOVANNINI, E. *Produção de uvas para vinho, suco e mesa*. Porto Alegre: Renascença, 3ª edição, 2008. 368 p.

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

GUERRA, C. C. Maturação da uva e condução da vinificação para a elaboração de vinhos finos. In: REGINA, M. A. (Ed). *Viticultura e enologia: atualizando conceitos*. Caldas: EPAMIG – FECD, 2001, p. 179 – 192.

LIMA-DA-SILVA, A. & DOAZAN, J.P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des porte-greffes de vigne in vitro. *J. Int. Sc. Vigne Vin*, 29:1-9, 1995.

MARTINS, L. Comportamento vitícola e enológico das variedades chardonnay, pinot noir, e cabernet sauvignon, na Lomba Seca, em São Joaquim (SC). Florianópolis. UFSC. Dissertação de Mestrado. 2006. 144p.



PEREIRA, F. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e *Fusarium oxysporum* f.sp herbemontis nos porta-enxertos de videira SO4, R-110 e 043-43. Florianópolis. UFSC. Dissertação de Mestrado. 2006. 89p.

PEREIRA, F.; LOVATO, P. E. Seleção de substratos e fungos micorrízicos arbusculares para aclimatização de porta-enxertos de videira. Relatório ao Programa Pibic/CNPq 2002.

PROTAS, J. F. da S.; CAMARGO, U. A.; MELO, L. M. R. A viticultura brasileira: realidade e perspectivas. In: REGINA, M. A. (Ed.). Viticultura e enologia: atualizando conceitos. Caldas: EPAMIG-FECD, 2001, p. 17-32.

RAVEN, P. H. et al. Biologia Vegetal [coordenação da tradução Jane Elizabeth Kraus; revisão técnica Jane Elizabeth Kraus, Neuza Maria de Castro; tradução Ana Cláudia de Macêdo Vieira... ET al.]. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. il.; 329 p.

SÔNEGO, O. R. Avaliação de porta-enxertos de videira frente à fusariose, em condições de campo. Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho. Comunicado Técnico, nº28. Ago. 1998. p. 1-4.