

**JOSY MORAES ZEMKE**

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA  
ACLIMATIZAÇÃO E NO CONTROLE BIOLÓGICO DA  
FUSARIOSE EM PORTA-ENXERTOS MICROPROPAGADOS  
DE VIDEIRA (*Vitis* spp)**

**FLORIANÓPOLIS - SC**

**2003**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA  
ACLIMATIZAÇÃO E NO CONTROLE BIOLÓGICO DA  
FUSARIOSE EM PORTA-ENXERTOS MICROPROPAGADOS  
DE VIDEIRA (*Vitis* spp)**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre em  
Biotecnologia, do Centro de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de Santa  
Catarina.

Orientador: Prof. Paulo Emílio Lovato

Co-orientador: Prof. Aparecido Lima da  
Silva

Eng.<sup>a</sup> Agrônoma Josy Moraes Zemke

Florianópolis - SC

2003.

Termo de Aprovação

**JOSY MORAES PEREIRA**

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA  
ACLIAMATIZAÇÃO E NO CONTROLE BIOLÓGICO DA  
FUSARIOSE EM PORTA-ENXERTOS MICROPROPAGADOS  
DE VIDEIRA (*Vitis* spp)**

Banca Examinadora:

Prof. Paulo Vitor Dutra de Souza

Departamento de Horticultura e Sivicultura - UFRGS

Prof. Aparecido Lima da Silva

Co-orientador: Departamento de Fitotenia – UFSC

Prof. Paulo Emílio Lovato

Orientador: Departamento de Engenharia Rural – UFSC

Prof. Enio Luiz Pedrotti

Suplente: Departamento de Fitotecnia - UFSC

**Florianopolis, 24 de fevereiro de 2003.**

*Ào meu esposo Elton W. Zemke*

*com todo amor,*

*e por estar presente*

*em minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter dado-me forças para concluir esta caminhada.

Ao professor orientador, Paulo Emílio Lovato, pela grande contribuição nesta etapa da minha formação, pela amizade e, também, por ter aceitado-me como aluna.

Aos meus pais, e especialmente a minha querida irmã Aline, aos meus irmãos Toni e Felipe e ao cunhado Leopoldo, por todo apoio e carinho.

A todos os colegas do Laboratório de Ecologia do Solo, em especial a Lucir, Cláudio e Murilo pela fundamental colaboração no desenvolvimento do trabalho e, principalmente, pela amizade.

Aos funcionários Chico e Luizinho, do Laboratório de Solos, Água e Tecidos Vegetais, pelo auxílio na execução dos experimentos, sem esquecer os momentos de descontração.

Ao professor co-orientador, Aparecido Lima da Silva, e seus bolsistas do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, pelo treinamento e auxílio nos trabalhos de micropropagação da videira.

Ao professor Paul Richard Monsen Miller, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos professores Fábio Dal Soglio e Paulo Vitor Dutra de Souza, da UFRGS, pela colaboração e sugestões durante a execução dos experimentos.

À FAPERGS pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
2.1 Objetivos Gerais: .....	10
2.2 Objetivos específicos: .....	10
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
3.1 Interação entre substratos e inoculação micorrízica na aclimatização de porta-enxertos de videira micropropagados. ....	11
3.2 Formação <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> de raízes de porta-enxertos micropropagados de videira. ....	14
3.3 Controle biológico da fusariose por fungos micorrízicos arbusculares e antagonistas a patógenos .....	15
3.3.1 Avaliação da compatibilidade entre fungos micorrízicos arbusculares e antagonistas a patógenos.....	15
3.3.2 Fungos micorrízicos arbusculares e antagonistas a patógenos no controle de fusariose. ....	16

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>19</b>
4.1 Interação entre substratos e inoculação micorrízica na aclimatização de porta-enxertos de videira micropropagados. ....	19
4.1.1 Inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de videira ( <i>Vitis</i> spp) micropropagados. ....	19
4.1.2 Acúmulo de fósforo e substâncias de reserva em porta-enxertos de videira micropropagados. ....	26
4.2 Formação <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> de raízes de porta-enxertos micropropagados de videira .....	29
4.3 Controle biológico da fusariose por fungos micorrízicos arbusculares e antagonistas a patógenos.....	33
4.3.1 Avaliação da compatibilidade entre fungos micorrízicos arbusculares e antagonistas a patógenos.....	33
4.3.2 Fungos micorrízicos arbusculares e antagonistas a patógenos no controle de fusariose .....	37
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>46</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>48</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teores de carbono orgânico, pH, Al, macronutrientes e micronutrientes em substratos usados na aclimatização e no cultivo de porta-enxertos micropropagados de videira .....	12
Tabela 2. Peso da matéria seca de parte aérea (MSA) e comprimento radicular do porta-enxerto Paulsen 1103 micorrizado (MIC) ou não micorrizado (NM), cultivado em seis substratos em duas fase após aclimatização.....	20
Tabela 3. Peso da matéria seca de parte aérea (MSA) e comprimento radicular do porta-enxerto SO4 micorrizado (MIC) ou não micorrizado (NM), cultivado em seis substratos em duas fase após aclimatização.....	21
Tabela 4. Conteúdo nutricional de fósforo (%) da parte aérea dos porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e SO4 micorrizados (MIC) e não micorrizados (NM), em seis substratos, após dez semanas de aclimatização .....	27
Tabela 5. Substâncias de reserva foliar dos porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e SO4 micorrizados (MIC) e não micorrizados (NM), em seis substratos, após dez semanas da aclimatização .....	28
Tabela 6. Percentagem de sobrevivência (%) dos porta-enxertos de videira aclimatizados com e sem raízes formadas <i>in vitro</i> .....	31
Tabela 7. Comprimento radicular dos porta-enxertos de videira micropropagados em meio de cultura contendo ou não violeta de genciana .....	32
Tabela 8. Matéria fresca de parte aérea (MFA), matéria seca de parte aérea (MSA) e peso fresco de raiz dos porta-enxertos Paulsen 1103 e SO4, micropropagados em meio de cultura com e sem violeta de genciana .....	32
Tabela 9. Matéria seca de parte aérea e de raiz e comprimento radicular (cm) do porta-enxerto Paulsen 1103 inoculados ou não com os antagonistas a patógenos <i>Bacillus</i> sp., <i>Gliocadium roseum</i> e <i>Trichoderma</i> sp.....	32

Tabela 10. Matéria seca de parte aérea e de raiz e comprimento radicular (cm) do porta-enxerto SO4 inoculados ou não com os antagonistas a patógenos <i>Bacillus</i> sp., <i>Gliocadium roseum</i> e <i>Trichoderma</i> sp.....	36
Tabela 11. Matéria seca de parte aérea (MSA) e de raiz (MSR) do porta-enxerto Paulsen 1103 micorrizado (MIC) e não micorrizado (NM), inoculados com um dos antagonistas <i>Bacillus</i> sp., <i>Gliocadium roseum</i> ou <i>Trichoderma</i> sp., e com <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>herbemontis</i> presente ou ausente .....	43
Tabela 12. Matéria seca de parte aérea (MSA) e de raiz (MSR) do porta-enxerto SO4 micorrizado (MIC) e não micorrizado (NM), inoculados com um dos antagonistas <i>Bacillus</i> sp., <i>Gliocadium roseum</i> ou <i>Trichoderma</i> sp., e com <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>herbemontis</i> presente ou ausente .....	44

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Colonização micorrízica no porta-enxerto Paulsen 1103 em seis substratos, no final e dez semanas após a aclimatização. Média com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Newman- Keuls a 5% de probabilidade .....22
- Figura 2. Colonização micorrízica no porta-enxerto SO4 em seis substratos, no final e dez semanas após a aclimatização. Média com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Newman- Keuls a 5% de probabilidade .....23
- Figura 3. Percentagem de arbúsculos nos porta-enxertos Paulsen 1103 e SO4 em seis substratos, dez semanas após a aclimatização. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls a 5% de probabilidade .....24
- Figura 4. Raízes do porta-enxerto Paulsen 1103 formadas *in vitro* - coradas com violeta de genciana- e raízes formadas *ex vitro*, após 5 semanas de aclimatização .....30
- Figura 5. Raízes do porta-enxerto SO4 formadas *in vitro* - coradas com violeta de genciana - e raízes formadas *ex vitro*, após 5 semanas de aclimatização .....30
- Figura 6. Colonização micorrízica (%) do porta-enxerto Paulsen 1103 inoculados ou não com os antagonistas a patógenos *Bacillus* sp., *Gliocadium roseum* ou *Trichoderma* sp.. Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Newman - Keuls a 5% de probabilidade .....33
- Figura 7. Colonização micorrízica (%) do porta-enxerto SO4 inoculados ou não com os antagonistas a patógenos *Bacillus* sp., *Gliocadium roseum* ou *Trichoderma* sp.. Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Newman - Keuls a 5% de probabilidade .....34
- Figura 8. Índice da doença (ID) na região do colo do porta-enxerto SO4, 30 após a inoculação do patógeno. As barras indicam o erro padrão da média .....38
- Figura 9. Percentagem de colonização micorrízica do porta-enxerto Paulsen 1103, 30 dias após a inoculação do patógeno no substrato comercial. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade .....40

Figura 10. Percentagem de colonização micorrízica do porta-enxerto SO4, 30 dias após a inoculação do patógeno no substrato comercial. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade .....41

## LISTA DE ABREVIATURAS

Al - Alumínio

BDA - Batata Dextrose Ágar

C – Carbono orgânico

Ca - Cálcio

Cu – Cobre

DSD1 – Meio de cultura para micropropagação de videira

Mg – Magnésio

Mn – Manganês

K - Potássio

P – Fósforo

N:C:A - Nitossolo:Composto:Areia

N:C:CAC - Nitossolo:Composto:Casca de arroz carbonizada

N:C - Nitossolo:Composto

N:C:V - Nitossolo:Composto:Vermiculita

N:V - Nitossolo:Vermiculita

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Zn – Zinco

## RESUMO

Uma das causas do declínio dos vinhedos catarinenses é o ataque pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*. Para reposição dos vinhedos têm potencial a micropropagação e o controle biológico da doença. Para isso pode ser feita a introdução de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e de antagonistas aos patógenos. Faz-se necessário, portanto, determinar as condições favoráveis ao estabelecimento das plantas e ao uso, conjunto ou isolado, desses agentes de controle biológico. Foram conduzidos experimentos em câmara de crescimento com o objetivo de selecionar substratos que promovam a micorrização; avaliar o enraizamento *in vitro* e *ex vitro* na aclimatização; verificar a compatibilidade entre os FMAs e os antagonistas e testar o uso em conjunto desses microrganismos no controle da fusariose. Foram testados seis substratos, à base de solo e aditivos, com e sem inoculação micorrízica, para aclimatização de dois porta-enxertos. Após 12 semanas as melhores combinações para produção de biomassa vegetal e colonização micorrízica (%M) foi o substrato à base de solo, composto termofílico e areia, para o porta-enxerto Paulsen 1103; enquanto para o porta-enxerto SO4 destacou-se o substrato à base de solo, composto e vermiculita. O substrato comercial usado proporcionou o aumento na biomassa vegetal, mas causou baixa %M. As raízes formadas *in vitro* sobreviveram e se mostraram necessárias à sobrevivência das plantas na aclimatização. A introdução dos antagonistas a patógenos *Trichoderma* sp., *Gliocadium roseum* e *Bacillus* sp. não interferiram na intensidade de colonização das raízes pelo FMA e no crescimento das plantas. Essas combinações antagonistas e FMAs foram testadas para o controle da fusariose. Após 30 dias da inoculação do patógeno observaram-se sintomas de fusariose no porta-enxerto susceptível. Dentre as combinações testadas a FMA/*Bacillus* sp. e FMA/*Trichoderma* sp. são mais promissora que a combinação FMA/*G.roseum*. Os FMAs são eficientes para o controle de fusariose nos porta-enxertos susceptíveis à doença, quando inoculados isoladamente.

**Termos para indexação:** *Bacillus* sp., enraizamento *in vitro*, *Fusarium oxysporum herbemontis*, *Gliocadium*, micorrizas, micropropagação, substratos, *Trichoderma* sp., *Vitis*.

## ABSTRACT

Vineyards in the State of Santa Catarina, many of which have been damaged by the soil born fungus *Fusarium oxysporum f. sp. herbemonti*, may be reestablished through the use of micropropagation techniques, associated with the inoculation of arbuscular mycorrhizal fungal and of microorganisms having an antagonistic action on the pathogen. It is therefore necessary to determine the conditions leading to the successful establishment of grapevine plantlets and to the functioning of the biological control agents. Experiments were performed under controlled-conditions, aiming to: select substrates conducive to the establishment of arbuscular mycorrhizas in micropropagated grapevine rootstocks; study the *in vitro* and *ex vitro* rooting of the plantlets; check the compatibility between the pathogen antagonists and arbuscular mycorrhizal fungi; evaluate the performance of the biological control agents to control the establishment of the pathogen in the plant roots. Micropropagated SO4 and Paulsen 1103 rootstock plantlets were weaned for three weeks in six mycorrhizal fungal-inoculated or uninoculated substrates prepared with soil, compost, calcined rice hulls, vermiculite and sand. A commercially available substrate was also used. At the end of the weaning period and after ten more weeks in individual pots, shoot and root growth and mycorrhizal root colonization attained their highest values in the substrate prepared with soil, compost and sand, for the Paulsen 1103 rootstock, and with the substrate prepared with soil, compost and vermiculite for the SO4 rootstock. The commercial substrate was associated with the highest increases in shoot and root mass, but it decreased mycorrhizal colonization. Roots formed *in vitro* survived through the weaning phase and appear to be necessary to plant development. The pathogen antagonists *Trichoderma* sp., *Gliocadium roseum* e *Bacillus* sp. did not affect plant growth nor the colonization of roots by the arbuscular mycorrhizal fungi. Combinations of the pathogen antagonists and AMF were used to control *Fusarium* damage to grapevine roots. After 30 days following pathogen introduction in the substrates, the combinations of FMA/*Bacillus* sp. and FMA/*Trichoderma* sp. were more efficient than FMA/*G. roseum* for pathogen control. However, the best method to prevent root damage by *Fusarium* was the use of AMF alone.

**Index terms:** *Bacillus*, *in vitro* rooting, *Fusarium oxysporum herbemontis*, *Gliocadium*, mycorrhizas, micropropagation, substrate, *Trichoderma*, *Vitis*.

# 1 INTRODUÇÃO

No Brasil o cultivo da videira se concentra nas Regiões Sul, Sudeste e Nordeste. A maior área vitícola do País está concentrada no Rio Grande do Sul, responsável por mais de 60% da produção nacional de uvas e 85% da produção nacional de vinhos no ano de 2000. Além dos estados onde a viticultura já está estabelecida, no decorrer dos últimos anos ela tem se expandido para outras regiões, nas quais o cultivo se destina tanto à produção de uvas de mesa, como de uvas para vinho (KUHN *et al*, 1984; SOUSA, 1996; EPAGRI, 2000; MELO, 2000; ICEPA - SC, 2000). Santa Catarina responde por 4% da produção de uva sendo o segundo produtor nacional de vinhos e mosto, com 5% da produção nacional. A atividade é de grande importância, por possibilitar uma fonte de renda a muitos fruticultores catarinenses (EPAGRI, 2000; ICEPA - SC, 2002).

O estado de Santa Catarina cultivou, no ano de 1999, aproximadamente 3.000 hectares de vinhedos, proporcionando uma colheita de 38.909 toneladas de uva, que foram convertidos em quase 15 milhões de litros de vinho e mosto (EPAGRI, 2000). A vitivinicultura catarinense está concentrado na microrregião de Joaçaba, que inclui os municípios situados na região de Alto Vale do Rio do Peixe, onde a produção de uvas representa em torno de 60% da produção estadual e concentra as principais cantinas do estado (SOUSA, 1996; ICEPA - SC, 2002). Nessas regiões, as propriedades têm aproximadamente 30 hectares, com área média de vinhedos de 2,3 hectares, o que os caracteriza como pequenos produtores, que utilizam a mão-de-obra familiar, e têm importante papel na fixação do homem no meio rural (LOSSO, 1994; MELO, 2000). São cultivadas quase que exclusivamente uvas americanas e híbridas (92%), destinadas ao consumo *in natura*, ou à elaboração de vinhos de consumo corrente e/ou de suco de uva (EMBRAPA, 1986; SOUSA, 1996; ROSIER & LOSSO, 1997; MELO, 2000).

Vários fatores têm contribuído para que os viticultores tenham abandonado o cultivo das uvas viníferas, optando por outras mais rústicas; entre eles estão a falta de estrutura adequada de vinificação e comercialização, além de sensibilidade excessiva das variedades européias às doenças fúngicas. Estas, além de aumentarem drasticamente o

custo de produção, pioram a qualidade da uva, que acaba sendo colhida antes de completar a maturação (SCHUCK *et al.*, 1999). Além disto, os viticultores vêm enfrentando nos últimos anos um problema grave, que é o declínio e morte de plantas provocados pela fusariose. Essa doença tem predominado em relação a outras doenças de solo, e vem causando sérios danos nas regiões vitícolas do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Ela é uma doença causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum f. sp. herbemontis*, que ataca o sistema radicular, especialmente nas cultivares *Vitis riparia* x *V. berlandieri* (SO4) (GALLOTTI, 1991; GALLOTTI & SCHUCK, 1991; ANDRADE *et al.*, 1993; GRIGOLETTI, 1993; ROSIER & LOSSO, 1997). As áreas de vinhedo contaminadas com esse fungo de solo trazem prejuízos, pois se tornam improdutivas para videira (SÔNEGO, 1998). Por essas razões, a fusariose provocou, a partir da década de 90, uma considerável redução na área plantada e na produtividade dos vinhedos catarinenses (LOSSO, 1994; ICEPA - SC, 2000).

Os patógenos do sistema radicular, principalmente os que causam doenças vasculares, são de difícil controle. Os métodos de controle químico são de alto custo, acarretando grande uso de mão-de-obra e de produtos fitossanitários de custo elevado. Além disso, os tratamentos químicos testados têm mostrado pouca eficiência, não se mostrando viáveis por exigir custos adicionais em mão-de-obra e equipamentos, para aplicação e incorporação desses produtos no solo. O método de controle ideal, mais eficiente e econômico, é o emprego de cultivares de porta-enxertos resistentes que possam desempenhar importante papel no controle da doença (GALLOTTI, 1991; ANDRADE *et al.*, 1993; SOUSA, 1996). Existem diferentes graus de resistência a *Fusarium sp.*, sendo que os porta-enxertos originados dos grupos *Vitis riparia* x *V. berlandieri* são os mais sensíveis, como é o caso do porta-enxerto SO4. Cultivares de *V. berlandieri* x *V. rupestris*, como o Paulsen 1103, possuem resistência intermediária, e atualmente este é o porta-enxerto mais importante e utilizado na viticultura do Sul do Brasil, sendo a variedade recomendada oficialmente (SCHUCK *et al.*, 2002).

Com o objetivo de aumentar a disponibilidade de porta-enxertos adequados às condições brasileiras, surge a necessidade de material vegetativo sadio para a formação ou reposição dos vinhedos, o que gera uma grande demanda desses porta-enxertos. Formas mais rápidas de multiplicação de material propagativo sadio são importantes neste contexto, tanto para formação de matrizeiros como para a propagação em larga escala dos

porta-enxertos. A multiplicação rápida já foi obtida com sucesso por meio de técnicas de micropropagação (BIASI, 2000).

As aplicações comerciais e industriais da cultura de tecidos vegetais *in vitro* representam um ramo importante da Biotecnologia. A utilização de micropropagação já é realidade em diversas regiões do mundo, com destaque para os países da Europa Ocidental e dos Estados Unidos. Atualmente, dezenas de espécies de plantas são multiplicadas vegetativamente em horticultura. Portanto, a técnica assume importância para a multiplicação de porta-enxertos de fruteiras de clima temperado e árvores-elites de essências florestais de rápido crescimento (CALDAS, 1985; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A micropropagação tem aplicações na horticultura (VESTBERG, 1992) e em espécies florestais (KERBAUY, 1997), por oferecer vantagens sobre a propagação vegetativa convencional, como a maior rapidez na obtenção de um grande número de mudas e a erradicação das pragas e doenças, principais responsáveis pela baixa produtividade de muitas culturas. No entanto, o uso comercial da micropropagação é limitado, pois os custos de produção são relativamente elevados, devido aos altos gastos com laboratórios, relação desfavorável de crescimento *in vitro* e baixa percentagem de sobrevivência durante a aclimatização das plantas (KOZAI, 1997).

A produção de plantas enraizadas *ex vitro* pode promover a redução dos custos (GRIBAUDO *et al.*, 1995; THOMAS & RAVINDRA, 1997). ISUTSA *et al.* (1994) obtiveram taxas maiores de sobrevivência de plantas micropropagadas de mirtilo, com o enraizamento *ex vitro*, o que encurtou em seis meses o período de aclimatização quando comparado ao protocolo de enraizamento *in vitro*. Esse procedimento diminuiu o tempo de permanência da planta em câmaras de crescimento e em outros ambientes controlados, que têm manutenção onerosa. Pode-se, assim, promover uma diminuição nos custos de produção. Há uma tendência em fazer-se o enraizamento *ex vitro* para um número crescente de espécies vegetais, porque essa técnica apresenta uma relativa simplicidade em seus aspectos operacionais, além de não adicionar etapas e processos complexos na multiplicação *in vitro* (SAGGIN JÚNIOR & LOVATO, 1999).

Além disso, em plantas micropropagadas de videira, o enraizamento *ex vitro* e a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) na aclimatização assegura um padrão de uniformidade às plantas aclimatizadas (THOMAS & RAVINDRA, 1997), e

proporciona uma rápida formação e melhor desenvolvimento do sistema radicular depois do transplante (SCHELLENBAUM *et al.*, 1991).

As micorrizas são uma associação mutualística, na qual as raízes das plantas são invadidas por fungos específicos, ocorrendo uma perfeita integração funcional entre os simbiossiontes (SMITH & READ, 1997). A íntima relação entre os fungos micorrízicos e as plantas existe há, no mínimo, 350 milhões de anos (SIMON *et al.*, 1993). Trata-se de uma simbiose praticamente universal, não só pelo grande número de plantas que formam a associação, como também por sua ocorrência generalizada na maioria dos habitats naturais (SILVEIRA, 1998; DODD, 2000; SYLVIA & CHELLEMI, 2002).

Os benefícios dessa simbiose, expressos principalmente como o estímulo ao crescimento vegetal, devem-se a fatores nutricionais, principalmente o aumento da absorção de fósforo. SCHUBERT & LUBRACO (2000), inoculando fungos micorrízicos arbusculares em plantas micropropagadas de macieira em substratos comerciais, verificaram um aumento no conteúdo de nutrientes dessas plantas e, conseqüentemente, no crescimento vegetativo. A presença de micorrizas também contribui para o aumento no crescimento de porta-enxertos de videira (SCHUBERT *et al.*, 1988; 1990; BAVARESCO & FOGHER, 1996b; BIRICOLTI *et al.*, 1997; LINDERMANN & DAVIES, 2001), não só aumentando a biomassa vegetal, mas também influenciando a distribuição proporcional da biomassa entre a parte aérea e a raiz de videira e de outras frutíferas (RAVOLANIRINA *et al.*, 1989; VARNA & SCHUEPP, 1994; SCHUBERT & LUBRACO, 2000). Além disso, os fungos micorrízicos arbusculares podem influenciar na morfogênese e na arquitetura das raízes de plantas de videira micropropagadas (SCHELLENBAUM *et al.*, 1991).

Essa simbiose, além de melhorar o estado nutricional das plantas, acelera o crescimento e melhora o vigor das plantas na fase de formação (COLOZZI-FILHO *et al.*, 1994), favorece sua adaptação a diferentes ecossistemas e aumenta a tolerância a fatores estressantes bióticos e abióticos. Como conseqüência, obtêm-se aumentos da produtividade e da sobrevivência, tanto de mudas micropropagadas durante a aclimatização quanto das transplantadas para o campo (SIQUEIRA & SAGGIN JÚNIOR, 1995). A inoculação de FMAs em mudas de espécies florestais, utilizadas para formação de matas ciliares em solos degradados, permitiu o crescimento dessas mudas após o transplante para as áreas degradadas a serem revegetadas (POUYÚ-ROJAS & SIQUEIRA, 2000). Em áreas onde o crescimento da videira foi inibido, devido à doença do replante, a inoculação com FMAs

nas mudas, proporcionou um maior acúmulo de matéria seca da parte área e maior área foliar nesse solo de replantio (WASCHKIES *et al.*, 1994).

A inoculação de FMAs, na fase de aclimatização, em plantas micropropagadas contribui para melhorias nas características comerciais, além de tornar-se uma alternativa importante e desejável (AZCÓN-AGUILAR *et al.*, 1997; SAGGIN JÚNIOR & LOVATO, 1999), visto que a aclimatização é uma etapa delicada para plantas micropropagadas. Na fase *in vitro* as plantas crescem em condição heterotrófica e, quando são transferidas para o ambiente natural, elas passam para a condição autotrófica, ocorrendo o desenvolvimento do aparato fotosintético. E ainda nessa fase de aclimatização, as plantas ficam muito susceptíveis ao estresse hídrico, pois a planta passa de uma situação de reduzido fluxo transpiratório e elevada umidade relativa do ar, para uma ambiente que demanda um incremento na taxa de transpiração (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; AMÂNCIO *et al.*, 1999).

Muitas árvores frutíferas são naturalmente associadas com fungos micorrízicos arbusculares. Por isso muitos problemas podem surgir pela ausência da simbiose fúngica durante a fase de aclimatização. Entre tais problemas estão o estresse provocado pelo transplante e a própria aclimatização. A ausência desses fungos exige o uso de substratos ricos em nutrientes e pobres em microrganismos, para que se possam assegurar o crescimento e a sanidade das plantas. Atualmente, isso é obtido através de substratos artificiais ou desinfestados, associados ao uso de grandes quantidades de produtos químicos. Dessa forma, é importante inocular os FMAs nas plantas micropropagadas para que estas possam superar o estresse da aclimatização. Também podem reduzir-se os custos com os insumos agrícolas industrializados, que provocam efeitos negativos sobre o ambiente (HOOKER *et al.*, 1994; VARMA & SCHÜEPP, 1995; LOVATO *et al.*, 1996; AZCÓN-AGUILAR & BAREA, 1997; SUBHAN *et al.*, 1998).

De acordo com GRIBAUDO *et al.* (1996), os fungos micorrízicos arbusculares colonizam raízes de videira, tanto formadas *ex vitro* como formadas *in vitro*. Porém, RAVOLANIRINA *et al.* (1989) demonstrou que o melhor período para a inoculação dos FMAs em porta-enxertos de videira é no início da fase de aclimatização. Nessa fase, a presença das micorrizas proporcionou aumento acentuado no crescimento dos porta-enxertos de videira em relação a plantas inoculadas em condições *in vitro*.

Outro aspecto que deve ser considerado durante a aclimatização é a composição física e química do substrato utilizado, pois pode afetar a sobrevivência das plantas e instalação de micorrizas arbusculares. Os principais fatores que afetam a micorrização são a aeração (SAIF, 1981), o teor de matéria orgânica e disponibilidade de nutrientes, especialmente o fósforo. De maneira geral, formulam-se substratos utilizando materiais disponíveis, de preferência leves e de boa drenagem (SAGGIN & LOVATO, 1999). Misturas à base de solo, turfa e vermiculita fornecem os melhores resultados no crescimento de plantas micorrizadas (CASSOL, 1996).

Na micropropagação comercial de fruteiras, em geral não se utilizam substratos à base de solo, à fim de se evitarem problemas com patógenos, e sim substratos comerciais ricos em nitrogênio, fósforo e potássio. No entanto, como os substratos comerciais são formulados para garantir o crescimento das plantas, os FMAs vão apresentar pequeno potencial de infecção e lento desenvolvimento, limitando a resposta em crescimento vegetal (SMITH & READ, 1997). Já foi observado o efeito benéfico da presença de solo na composição do substrato para a formação de micorrizas e desenvolvimento das plantas micropropagadas (VIDAL *et al.*, 1992). Entretanto, SCHUBERT & LUBRACO (2000) constataram que a micorrização em macieira micropropagada pode ser obtida em substratos comerciais ricos em nutrientes, o que proporciona aumento no conteúdo de nutrientes e, conseqüentemente, no crescimento vegetativo dessas plantas.

Esta interação entre os FMAs e os substratos tem sido avaliada para várias espécies micropropagadas (SCHUBERT *et al.*, 1990; AZCÓN-AGUILAR *et al.*, 1992; UOSUKAINEN & VESTBERG, 1994; VESTBERG & ESTAÚN, 1997; ESTAÚN *et al.*, 1999), pois a composição do substrato pode variar em função da espécie de FMAs e da planta aclimatizada. Deve-se sempre buscar a melhor combinação planta-fungo-substrato para uma dada produção.

Além de todos os aspectos benéficos mencionados da introdução de fungos micorrízicos no sistema, a associação das plantas com os FMAs vem adquirindo importância crescente no controle biológico de doenças. Atualmente, muitos fitopatologistas estudam os fungos micorrízicos arbusculares com o objetivo de utilizá-los como controle biológico, pois existem muitos relatos dos efeitos benéficos dos FMAs na proteção das plantas ao ataque de fungos e nematóides que causam doenças às plantas (DEHNE, 1982; GUILLEMIN *et al.*, 1994; TROTTA *et al.*, 1996; PINOCHET *et al.*,

1998; FILION *et al.*, 1999; GRAHAM, 2001; AZCON-AGUILAR *et al.*, 2002; DECLERCK *et al.*, 2002; YAO *et al.*, 2002).

O controle biológico dos patógenos de plantas é uma prática chave na agricultura sustentável pois está baseada no manejo dos recursos naturais, além de proporcionar a redução no uso de produtos químicos e preservar o meio ambiente. Os microrganismos presentes na rizosfera são componentes dos ecossistemas, e alguns grupos podem proteger as plantas dos patógenos, como os fungos micorrízicos arbusculares. A associação micorrízica pode assegurar a sanidade das plantas através de vários mecanismos e ou interações, que melhoram a capacidade das plantas de tolerar estresses bióticos e abióticos, como no caso, o ataque de patógenos de solo (AZCON-AGUILAR & BAREA, 1996)

Os mecanismos envolvidos na proteção das plantas associadas a FMAs incluem a compensação dos danos causados nas plantas pela melhoria no crescimento e no estado nutricional (ZAMBOLIM & SCHENCK, 1983; GUILLEMIN *et al.*, 1994; PINOCHET *et al.*, 1998). Um menor índice da doença foi observado em bananeiras micorrizadas devido ao aumento no teor de fósforo foliar e no crescimento vegetal. As plantas micorrizadas apresentaram maior crescimento quando foram submetidas à inoculação com o patógeno. Em condições de estresse, como no caso a presença do patógeno, os FMAs apresentam efeitos positivos no crescimento de bananeiras (DECLERCK *et al.*, 2002). Entretanto, somente a melhoria na nutrição de fósforo e o aumento no crescimento das plantas não explicaram a redução nos sintomas de *Phytophthora nicotianae*; existem outros mecanismos envolvidos na tolerância das plantas micorrizadas ao ataque de patógenos, como a própria presença dos FMAs nas raízes, a competição entre os FMAs e fungos patogênicos por sítios de infecção e a indução de resistência com modificações bioquímicas no hospedeiro (TROTTA *et al.*, 1996).

As alterações microbianas na rizosfera, a ativação dos mecanismos de defesa da planta, e também a indução de resistência sistêmica (CORDIER *et al.*, 1998; POZO *et al.*, 2002a) são mecanismos envolvidos no controle de patógenos de solo. O controle biológico por FMAs é resultado de uma combinação de mecanismos de resistência local e sistêmica. A resistência sistêmica induzida pelos FMAs é verificada nas plantas que tinham parte das raízes não micorrizada através do acúmulo de moléculas, para a formação de calose. A calose é uma barreira formada durante a ativação dos mecanismos de defesa da planta que impede a penetração da hifa do patógeno. Enquanto, a resistência localizada foi

caracterizada pela incapacidade do patógeno invadir as células que contêm arbúsculos (CORDIER *et al.*, 1998). As reduções nos sintomas da doença e no desenvolvimento do patógeno nos tecidos de partes das raízes não micorrizadas de uma planta micorrizada são conseqüências da resistência sistêmica (POZO *et al.*, 2002a).

As micorrizas alteram a atividade dos microrganismos de forma seletiva (GRAHAM, 1988). Resultados obtidos *in vitro* mostram que a presença do *Glomus intraradices* interfere no crescimento de diferentes organismos, estimulando o crescimento de antagonistas a patógenos, como *Trichoderma harzianum*, e inibindo o crescimento de patógenos como o *Fusarium oxysporum chrysanthemi*. Os FMAs formam um novo ambiente microbiano, e assim podem contribuir para proliferação de microrganismos específicos, além de alterar potencialmente a população de patógenos (ST-ARNAUD *et al.*, 1995; FILION *et al.*, 1999).

O controle de doenças também pode ser feito através de microrganismos antagonistas, como fungos e bactérias (MELO, 1991; LIU *et al.*, 1995; NEMEC *et al.*, 1996; BENCHIMOL *et al.*, 2000). TOMAZI *et al.* (1998) demonstraram a ação antagonista *in vitro* do fungo *Trichoderma* sp. e de um isolado de *Bacillus* sp. ao crescimento de *Phytophthora cactorum* L. e *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*. Além disso, os antagonistas a patógenos podem despertar nas plantas a resistência sistêmica induzida pela presença do patógeno (LIU *et al.*, 1995; HOFFLAND *et al.*, 1996). Desta forma, o controle biológico por FMAs pode ser explorado em cooperação com outros microrganismos que demonstrem eficiência antagonista a patógenos. A combinação dos FMAs e agentes de controle biológico, como os fungos *Trichoderma* sp. e *Gliocadium* sp., e as bactérias como o *Bacillus* sp., podem produzir um nível de controle da doença superior aos efeitos dos organismos inoculados sozinhos (WYSS *et al.*, 1992; NEMEC *et al.*, 1996; GREEN *et al.*, 1999). No entanto, a presença de antagonistas a patógenos pode estimular ou inibir a associação micorrízica, por isso deve ser determinada a interação para cada planta e patógeno (AZCÓN, 1989; WYSS *et al.*, 1992; MCALLISTER *et al.*, 1994a; 1994b; GREEN *et al.*, 1999; GRYNDLER *et al.*, 2002). O comprimento das hifas externas do *Glomus intraradices* foi reduzido pela presença do *Trichoderma harzianum* (GREEN *et al.*, 1999), assim com a formação das micorrizas pelo *Trichoderma koningui* (MCALLISTER *et al.*, 1994a) e pelo *Bacillus* sp. (ANDRADE *et al.*, 1995). Entretanto, há trabalhos demonstrando que o antagonista a patógenos *Trichoderma* sp. libera substâncias

capazes de acelerar a germinação dos esporos e o crescimento do micélio dos FMAs (CALVET *et al.*, 1992), e também não promove competição entre os FMAs e os antagonistas a patógenos em *Tagetes erecta* (CALVET *et al.*, 1993). Do mesmo modo, algumas bactérias têm efeitos benéficos na colonização micorrízica (AZCÓN, 1989; BAVARESCO & FOGHER, 1996a), e estimulam o desenvolvimento do micélio, sem afetar a atividade e o comprimento das hifas dos FMAs (GRYNDLER *et al.*, 2002). Os resultados de pesquisa das interações entre os fungos saprófitos ou rizobactérias e os FMAs diferem muito. Tal é o caso do *Trichoderma* spp que apresenta tanto efeito antagonico (WYSS *et al.*, 1992) e sinérgico da colonização micorrízica (CALVET *et al.*, 1992). Sendo assim, é necessário definir as interações positivas entre os agentes de controle biológico que são utilizados em conjunto. Obviamente que os microrganismos selecionados para o controle biológico de patógenos de solo não podem interferir na associação micorrízica, pois os FMAs são altamente benéficos para as plantas.

Como visto acima, métodos biológicos para o controle de patógenos de solo que provocam doenças em árvores frutíferas, inclusive nas videiras, oferecem alternativas promissoras aos métodos químicos (UTKHEDE, 1992). É, portanto, essencial o desenvolvimento de procedimentos de manejo com vistas ao controle de patógenos de solo. O controle biológico vem tendo destaque pois se conhecem cada vez mais problemas associados ao controle químico, como o desenvolvimento de resistência pelo patógeno, alto custo, efeito negativo sobre os organismos benéficos e poluição ambiental, como a contaminação das águas e conseqüente dano a saúde humana. Hoje, o mercado está cada vez mais interessado no produto ecológico, cujo sistema de cultivo preserve os mecanismos naturais responsáveis pelo equilíbrio da fertilidade do solo e das cadeias alimentares naturais. Para isso, é necessário hoje produzir plantas com comunidade rizosférica constituída por fungos micorrízicos arbusculares, pois estes que desempenham diferentes papéis benéficos em diferentes etapas. Além disso, devem incluir-se outros organismos benéficos, como os antagonistas a patógenos que sejam compatíveis com os FMAs e com os efeitos destes. As comunidades rizosféricas devem ser desenvolvidas especificamente para determinadas condições ambientais (SAGGIN & LOVATO, 1999). Portanto, são necessárias pesquisas locais, selecionando microrganismos e técnicas de manejo adaptados a condições específicas de planta, clima e solo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais:

Desenvolver um sistema de aclimatização e micorrização de mudas micropropagadas de videira, com vistas ao controle biológico do *Fusarium oxysporum f. sp. herbermontis*.

### 2.2 Objetivos específicos:

- Selecionar substratos adequados para micorrização dos porta-enxertos de videira;
- Aclimatizar porta-enxertos de videira micropropagados enraizados *in vitro* e *ex vitro*;
- Testar a compatibilidade entre fungos micorrízicos arbusculares e antagonistas a patógenos;
- Obter mudas micropropagadas de videira associadas a uma comunidade rizosférica que permita a proteção contra a *Fusarium oxysporum f. sp. herbermontis*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Interação entre substratos e inoculação micorrízica na aclimatização de porta-enxertos de videira micropropagados.

Os porta-enxertos de videira Paulsen 1103 (*Vitis rupestris* x *Vitis berlandieri*) e SO4 (*Vitis riparia* x *Vitis berlandieri*) foram micropropagados em meio de cultura DSD1 (LIMA DA SILVA & DOAZAN, 1995) com sacarose (20,0g L<sup>-1</sup>) e ágar-ágar (5,5g L<sup>-1</sup>), isento de reguladores de crescimento e com pH 6,4. Os frascos foram mantidos durante 60 dias a 25±1°C, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossinteticamente ativa de 40 - 45µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> no nível do frasco, umidade relativa do ar de 60-70%. Para a aclimatização dos porta-enxertos foram realizadas podas para conservar três folhas basais e 1,0 – 1,5 cm de raiz.

O experimento, um fatorial 2 x 6, foi composto dos tratamentos de inoculação (inoculação micorrízica e não micorrízica) e de seis substratos: Nitossolo Vermelho Distroférico, composto termofílico e vermiculita (N:C:V) na proporção de 2:3:3 (v:v:v); Nitossolo Vermelho Distroférico, composto termofílico e casca de arroz carbonizada (N:C:CAC) 3:1:1 (v:v:v); Nitossolo Vermelho Distroférico, composto termofílico e areia (N:C:A) 1:1:1 (v:v:v); Nitossolo Vermelho Distroférico e composto termofílico (N:C) 3:2,5 (v:v); Nitossolo Vermelho Distroférico e vermiculita (N:V) 2:3 (v:v) e do substrato comercial Plantmax® (Eucatex Agro, São Paulo-SP), constituído de mistura de cascas de árvore, turfa, vermiculita e calcário. O composto termofílico é elaborado a partir da coleta seletiva de sobras de preparo do restaurante universitário da UFSC, aparas de grama, restos vegetais e cama de pequenos roedores saudáveis, resultando em um produto uniforme e de composição final conhecida. As características químicas dos substratos estão descritas na Tabela 1.

Cada porta-enxerto recebeu 2,0 g de inóculo micorrízico, constituído de uma mistura de *Glomus etunicatum*, *Glomus clarum* e *Acaulospora* sp, multiplicados em vasos com *Paspalum notatum* var *saurae*. As plantas também receberam a microbiota não

**Tabela 1.** Teores de carbono orgânico, pH, Al, macronutrientes e micronutrientes em substratos usados na aclimatização e no cultivo de porta-enxertos micropropagados de videira.

SUBSTRATOS	C g kg <sup>-1</sup>	pH	----- mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----							----- mgdm <sup>-3</sup> -----			
			Al	Mg	Ca	P	K	Mn	Zn	Cu			
Nitossolo:composto:areia	44	5.9	0	100	31	375	290	6	16	0.3			
Nitossolo:composto:vermiculita	42	5.3	2	120	75	179	250	16	13	0.5			
Nitossolo:composto:casca de arroz carbonizada	31	5.0	3	85	30	145	251	32	15	0.7			
Nitossolo:composto	49	5.5	0	130	43	202	258	20	19	0.3			
Nitossolo:vermiculita	6	4.8	16	24	24	10	74	11	0.7	2.2			
Comercial	200	5.9	0	410	240	792	1800	4	8.4	0.1			

micorrízica do solo, que foi obtida através da suspensão de 40g de inóculo em 1L de água destilada. Após agitação intensa, a suspensão foi passada em papel filtro e adicionou-se 1 mL do filtrado a cada célula nos tratamentos correspondente.

Os substratos testados para aclimatização das plantas, exceto o substrato comercial Plantmax®, foram desinfestados por 10 minutos em forno de microondas (National NE 7770KK, 2450 Mhz, 1420W) e distribuídos em bandejas de polipropileno com alvéolos de 20 mL cada. Em seguida os porta-enxertos foram transferidos para as bandejas alveoladas, e a partir do décimo-quinto dia houve a abertura progressiva do vidro a fim de aclimatizar as plantas à atmosfera ambiente.

Após três semanas, metade das plantas foi transferida para os vasos individuais de 400 cm<sup>3</sup>, contendo os mesmos tratamentos, e mantidos por dez semanas em sala de crescimento, a 26±2°C, fotoperíodo 16 horas e radiação fotossinteticamente ativa de 150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Todas as plantas receberam água destilada diariamente e semanalmente aplicaram-se 5 mL de solução nutritiva de Long Ashton (RESH, 1997) com 10% da concentração original de fósforo.

Ao final das três semanas de aclimatização e das dez semanas em câmara de crescimento após a aclimatização foram determinados peso da matéria seca de parte aérea, comprimento radicular e a colonização micorrízica. Também foram determinados os conteúdos nutricionais de fósforo e de substâncias de reserva foliar, dos porta-enxertos após dez semanas em câmara de crescimento de acordo com a metodologia utilizada por SILVEIRA *et al.*, (2002). Essas determinações foram realizadas pela Faculdade de Agronomia – Departamento de solos – UFRGS. O comprimento das raízes foi avaliado pela técnica da grade quadriculada (TENNANT, 1975). A intensidade de colonização micorrízica foi avaliada pela técnica de TROUVELOT *et al.* (1986), após descoloração das raízes em KOH 10% e coloração com azul de tripano em glicerol acidificado (KOSKE & GEMMA, 1989). Utilizou-se um delineamento completamente casualizado com 6 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, (programa StatGraphics, versão 7.0) e as médias foram comparadas pelo teste de Newman-Keuls, a  $p \leq 0,05$  (STEEL & TORRIE, 1980).

### 3.2 Formação *in vitro* e *ex vitro* de raízes de porta-enxertos micropropagados de videira em diferentes meios de cultivo.

Foram micropropagados os porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e SO4 em tubos tipo Pyrex® (22 x 220mm) contendo 15 mL de meio de cultura DSD1 (LIMA DA SILVA & DOAZAN, 1995) com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e ágar-ágar (5,5 g L<sup>-1</sup>), isento de reguladores de crescimento e com pH 6,4. Também foram micropropagados os mesmos porta-enxerto, em meio de cultura DSD1 adicionado de 0,15 mg L<sup>-1</sup> de violeta de genciana (Fluka Chemie AG,CH) (GRIBAUDO et al., 1995), além dos demais componentes citados anteriormente. Os tubos contendo as plantas micropropagadas foram mantidos durante 60 dias a 25°±1C, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossinteticamente ativa de 40-45µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, umidade relativa do ar de 60-70%.

Para aclimatização das plantas micropropagadas em meio de cultura DSD1 com e sem violeta de genciana foram realizadas podas para conservar três folhas basais e 1,5 - 2,0 cm de raízes formadas *in vitro*. Para aclimatização das mudas sem raízes formadas *in vitro*, foram formadas microestacas das plantas micropropagadas em meio de cultura DSD1 sem violeta de genciana.

As microestacas e as plantas com raízes formadas *in vitro* foram transferidas para as bandejas alveoladas contendo o substrato formado pela mistura de Nitossolo Vermelho Distroférico, composto termofílico e areia na proporção de 1:1:1(v:v:v), para aclimatização do porta-enxerto Paulsen 1103. Para aclimatização do porta-enxerto SO4 usou-se o substrato formado pela mistura de Nitossolo Vermelho Distroférico, composto termofílico e vermiculita na proporção de 2:3:3 (v:v:v), de acordo com os resultados obtidos no experimento anterior (3.1). Os substratos foram desinfestados por 10 minutos em forno de microondas (National NE 7770KK, 2450 Mhz, 1420W) e distribuídos em bandejas de polipropileno com alvéolos de 20 mL.

Na transferência para aclimatização, as plantas receberam os tratamentos de inoculação micorrízica e não micorrízica. Cada porta-enxerto recebeu 2,0 g de inóculo micorrízico, constituído de uma mistura de *Glomus etunicatum*, *Glomus clarum* e *Acaulospora* sp, multiplicados em vasos com *Paspalum notatum* var *saurae*. A microbiota não micorrízica do solo foi obtida através da suspensão de 40g de inóculo em 1L de água destilada. Após agitação intensa, a suspensão foi passada em papel filtro e adicionou-se 1 mL do filtrado a cada célula no tratamento correspondente. Os porta-enxertos foram

transferidos para as bandejas em caixas cobertas com vidro com vistas à aclimatização. A partir do décimo-quinto dia houve a abertura progressiva do vidro, e o processo de aclimatização durou 5 semanas. Ao final desse período, avaliou-se a percentagem de sobrevivência, a matéria fresca e seca de parte aérea, a matéria fresca de raiz e o comprimento radicular. O comprimento das raízes foi avaliado pela técnica da grade quadriculada (TENNANT, 1975). A intensidade de colonização micorrízica foi avaliada pela técnica de TROUVELOT *et al.* (1986), após descoloração das raízes em KOH 10% e coloração com azul de tripano em glicerol acidificado (KOSKE & GEMMA, 1989). Utilizou-se um delineamento completamente casualizado, com 10 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, (programa StatGraphics, versão 7.0) e as médias foram comparadas pelo teste de Newman-Keuls, a  $p \leq 0,05$  (STEEL & TORRIE, 1980).

### **3.3 Controle biológico da fusariose por fungos micorrízicos arbúculares e antagonistas a patógenos.**

#### **3.3.1 Avaliação da compatibilidade entre fungos micorrízicos arbusculares e antagonistas a patógenos.**

Os porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e SO4 foram micropropagados em meio de cultura DSD1 (LIMA DA SILVA & DOAZAN, 1995) com sacarose ( $20,0\text{g L}^{-1}$ ) e ágar-ágar ( $5,5\text{g L}^{-1}$ ), isento de reguladores de crescimento e com pH 6,4. Os frascos foram mantidos durante 60 dias a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossinteticamente ativa de  $40 - 45\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  no nível do frasco, umidade relativa do ar de 60-70%.

Para a aclimatização dos porta-enxertos foram realizadas podas para conservar três folhas basais e 1,0 – 1,5 cm de raiz. Os porta-enxertos foram transferidos para as bandejas contendo os mesmos substratos utilizados no item anterior 3.2. Os substratos foram desinfestados por 10 minutos em forno de microondas (National NE 7770KK, 2450 Mhz, 1420W) e distribuídos em bandejas de polipropileno com alvéolos de 20 mL. Na transferência para aclimatização, as plantas receberam os tratamentos de inoculação micorrízica e não micorrízica como descrito no item 3.1.

Ao final de três semanas de aclimatização, as plantas foram transferidas para os vasos individuais de  $400 \text{ cm}^3$ . Em cada vaso foram inoculados os tratamentos contendo um dos antagonistas a patógenos *Trichoderma* sp., *Gliocadium roseum* ou *Bacillus* sp. e um

tratamento controle sem antagonistas. Os antagonistas e patógenos foram multiplicados em meio de batata dextrose agar (BDA), em tubos inclinados. Foram obtidas suspensões contendo os antagonistas, através de lavagens desses tubos com solução salina 0,35%. Foram inoculadas 10 mL dessas suspensões em cada vaso, contendo  $243 \times 10^7$  UFC de *Gliocadium roseum*,  $223 \times 10^7$  UFC de *Trichoderma* sp. ou  $145 \times 10^2$  de UFC do *Bacillus* sp.

Os porta-enxertos nos vasos, foram mantidos por 12 semanas em câmara de crescimento, a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossinteticamente ativa de  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Todas as plantas receberam água destilada diariamente, e semanalmente aplicou-se 5 mL de solução nutritiva de Long Ashton (RESH, 1997) com 10% da concentração original de fósforo.

Ao final das 12 semanas foram determinados o peso da matéria seca de parte aérea e de raiz, comprimento radicular e colonização micorrízica. O comprimento das raízes foi avaliado pela técnica da grade quadriculada (TENNANT, 1975). A intensidade de colonização micorrízica foi avaliada pela técnica de TROUVELOT *et al.* (1986), após descoloração das raízes em KOH 10% e coloração com azul de tripano em glicerol acidificado (KOSKE & GEMMA, 1989). Utilizou-se um delineamento completamente casualizado, com 6 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, (programa StatGraphics, versão 7.0) e as médias foram comparadas pelo teste de Newman-Keuls, a  $p \leq 0,05$  (STEEL & TORRIE, 1980).

### **3.3.2 Fungos micorrízicos arbusculares e antagonistas a patógenos no controle de fusariose.**

Foram utilizados os porta-enxertos Paulsen 1103 (*Vitis rupestris* x *Vitis berlandieri*), variedade atualmente recomendada por apresentar resistência a fusariose, e o porta-enxerto SO4 (*Vitis riparia* x *Vitis berlandieri*), variedade susceptível à doença. Os porta-enxertos Paulsen 1103 e SO4 foram micropropagados em meio de cultura DSD1 (LIMA DA SILVA & DOAZAN, 1995) com sacarose ( $20,0 \text{g L}^{-1}$ ) e ágar-ágar ( $5,5 \text{g L}^{-1}$ ), isento de reguladores de crescimento e com pH 6,4. Os frascos foram mantidos durante 60 dias a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossinteticamente ativa de  $40 - 45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  no nível do frasco, umidade relativa do ar de 60-70%.

Para a aclimatização dos porta-enxertos foram realizadas podas para conservar três folhas basais e 1,0 –1,5 cm de raiz. Os porta-enxertos foram transferidos para as bandejas contendo os mesmos substratos utilizados no item anterior 3.2. Os substratos foram desinfestados por 10 minutos em forno de microondas (National NE 7770KK, 2450 Mhz, 1420W) e distribuídos em bandejas de polipropileno com alvéolos de 20 mL. Na transferência para aclimatização, as plantas receberam os tratamentos de inoculação micorrízica e não micorrízica como descrito no item 3.1.

Ao final de três semanas de aclimatização as plantas foram transferidas para os vasos individuais de 400 cm<sup>3</sup>, contendo os mesmos substratos utilizados para aclimatização dos porta-enxertos. Após 12 semanas na câmara de crescimento, as plantas foram transferidas para sacos individuais de polietileno preto de 1,0 dm<sup>3</sup> de capacidade, contendo uma mistura de substrato comercial (Plantmax® Eucatex Agro, São Paulo-SP), vermiculita e areia, na proporção de 1:1:1. A mesma mistura foi usada para os dois porta-enxertos. As plantas foram mantidas por 4 semanas na câmara de crescimento.

Em cada vaso foram inoculados os tratamentos contendo um dos antagonistas a patógenos: *Trichoderma* sp., *Gliocadium roseum* ou *Bacillus* sp., além de um tratamento controle sem antagonistas. As plantas também receberam os tratamentos com e sem inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*. Os antagonistas a patógenos foram multiplicados em batata dextrose ágar (BDA), em tubos inclinados. Foram obtidas suspensões contendo os antagonistas, através de lavagens desses tubos com solução salina 0,35%. Foram inoculadas 10 mL dessas suspensões em cada vaso, contendo 243 x 10<sup>7</sup> UFC de *Gliocadium roseum*, 223 x 10<sup>7</sup> UFC de *Trichoderma* sp. ou 145 x 10<sup>2</sup> de UFC do *Bacillus* sp.

Os isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*, fornecidos pelo Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS foram conservados meio de batata dextrose agar (BDA) em placas de petri e em tubos com meio inclinado. O inóculo do patógeno foi obtido através de lavagens dessas placas de petri com água destilada autoclavada. Em seguida foi distribuído em elenmeyers contendo grãos de aveia autoclavados. Foram inoculados 10 g de grãos de aveia infectados com o fungo ou 10g de grãos de aveia autoclavado para os tratamentos controle.

Os porta-enxertos foram mantidos em câmara de crescimento, a 26±2°C, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossinteticamente ativa de 150µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Todas as

plantas receberam água destilada diariamente, e semanalmente aplicou-se 5 mL de solução nutritiva de Long Ashton (RESH, 1997) com 10% da concentração original de fósforo.

Ao final das 16 semanas em câmara de crescimento foram determinados o índice da doença, peso da matéria seca de parte aérea e de raiz, comprimento radicular e colonização micorrízica. Foram atribuídos graus para os sintomas de fusariose avaliados na região do colo das plantas: 0 = ausência de infecção, 1 = menos de 20% de infecção, 2 = 20 – 40% de infecção, 3 = 40 – 60% de infecção, 4 = 60 – 80% de infecção e 5 = 80 – 100% de infecção. A partir desses graus de infecção foram calculados os índices da doença (ID), para cada repetição, de acordo com STADNIK & DHINGRA (1997) e MATSUBARA *et al.* (2002):

$$ID (\%) = \sum [(f \times g) / n \times v] \times 100$$

onde,  $\sum$  = somatório, f = frequência do grau de infecção, g = grau de infecção, n = número total de plantas usadas, e v = o valor máximo do grau de infecção.

O comprimento das raízes foi avaliado pela técnica da grade quadriculada (TENNANT, 1975). A intensidade de colonização micorrízica foi avaliada pela técnica de TROUVELOT *et al.* (1986), após descoloração das raízes em KOH 10% e coloração com azul de tripano em glicerol acidificado (KOSKE & GEMMA, 1989). Utilizou-se um delineamento completamente casualizado, com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, (programa StatGraphics, versão 7.0) e as médias foram comparadas pelo teste de Newman-Keuls, a  $p \leq 0,05$  (STEEL & TORRIE, 1980).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Interação entre substratos e inoculação micorrízica na aclimatização de porta-enxertos de videira micropropagados.

#### 4.1.1 Inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de videira (*Vitis spp*) micropropagados.

No final da aclimatização, a produção de matéria seca de parte aérea dos porta-enxertos micropropagados variou em função do substrato e da presença dos FMAs, e a interação entre os dois fatores foi significativa para os dois porta-enxertos (Tabelas 2 e 3). A interação foi afetada pela espécie ou cultivar da planta, pelo isolado do fungo micorrízico e pelas características do substrato (VESTBERG, 1992; ESTAÚN *et al.*, 1999). As percentagens de colonização micorrízica, nos dois porta-enxertos, foram significativamente diferentes em função dos substratos (Figuras 1 e 2). Tais diferenças podem ser atribuídas às características químicas (Tabela 1) e físicas dos substratos, variáveis segundo as proporções de solo e condicionadores usados. No final da aclimatização, os substratos N:C:A, N:C e N:V proporcionaram as maiores taxas de colonização micorrízica no porta-enxerto Paulsen 1103 (Figura 1) e os substratos N:C:A e N:C:V promoveram a maior colonização no porta-enxerto SO4 (Figura 2). Nessa etapa, também houve uma resposta à inoculação em termos de crescimento da parte aérea do porta-enxerto Paulsen 1103 aclimatizado nos substratos N:C e N:V (Tabela 2), e do porta-enxerto SO4 nos substratos N:C:V, N:C e N:V (Tabela 3). Para ambos porta-enxertos, o substrato N:C:A proporcionou a maior taxa de colonização micorrízica no final da aclimatização (Figuras 1 e 2). É importante que o substrato selecionado para o crescimento de mudas micropropagadas favoreça a associação micorrízica e também o crescimento vegetal, pois plantas micorrizadas vão ter melhor desenvolvimento do sistema radicular após o transplante, menor mortalidade, além de haver efeitos da simbiose na proteção das plantas contra patógenos do solo (AZCÓN-AGUILAR & BAREA, 1996; POZO *et al.*, 2002b).

**Tabela 2.** Peso da matéria seca de parte aérea (MSA) e comprimento radicular do porta-enxerto Paulsen 1103 micorrizado (MIC) ou não micorrizado (NM), cultivado em seis substratos, em duas fases após aclimatização.

SUBSTRATOS	MSA g planta <sup>-1</sup>					
	FMA	Final da aclimatização	Dez semanas após aclimatização	Final da aclimatização	Dez semanas após aclimatização	Comprimento radicular (cm)
Nitossolo:Composto:Areia	MIC	0,035 b <sup>(1)</sup>	1,118 c	18 a	624 c	
Nitossolo:Composto:Areia	NM	0,035 b	1,319 c	22 a	642 c	
Nitossolo:Composto:Vermiculita	MIC	0,040 a	1,641 b	18 a	736 c	
Nitossolo:Composto:Vermiculita	NM	0,038 a	1,704 b	19 a	1116 b	
Nitossolo:Composto:Casca de arroz carbonizada	MIC	0,030 b	0,579 d	23 a	479 cd	
Nitossolo:Composto:Casca de arroz carbonizada	NM	0,032 b	0,805 d	23 a	713 c	
Nitossolo:Composto	MIC	0,040 a	1,061 c	17 a	683 c	
Nitossolo:Composto	NM	0,033 b	0,608 d	16 a	521 cd	
Nitossolo:Vermiculita	MIC	0,025 b	0,298 e	16 a	489 cd	
Nitossolo:Vermiculita	NM	0,018 c	0,079 f	13 a	196 d	
Comercial	MIC	0,030 b	2,229 a	19 a	1233 a	
Comercial	NM	0,035 b	2,144 a	25 a	1596 a	
----- Análise de variância -----						
SUBSTRATOS		* <sup>(2)</sup>	***	NS	***	
FMA		*	NS	NS	NS	
FMA X SUBSTRATOS		*	NS	NS	NS	

<sup>(1)</sup> Valores seguidos da mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Newman-Keuls.

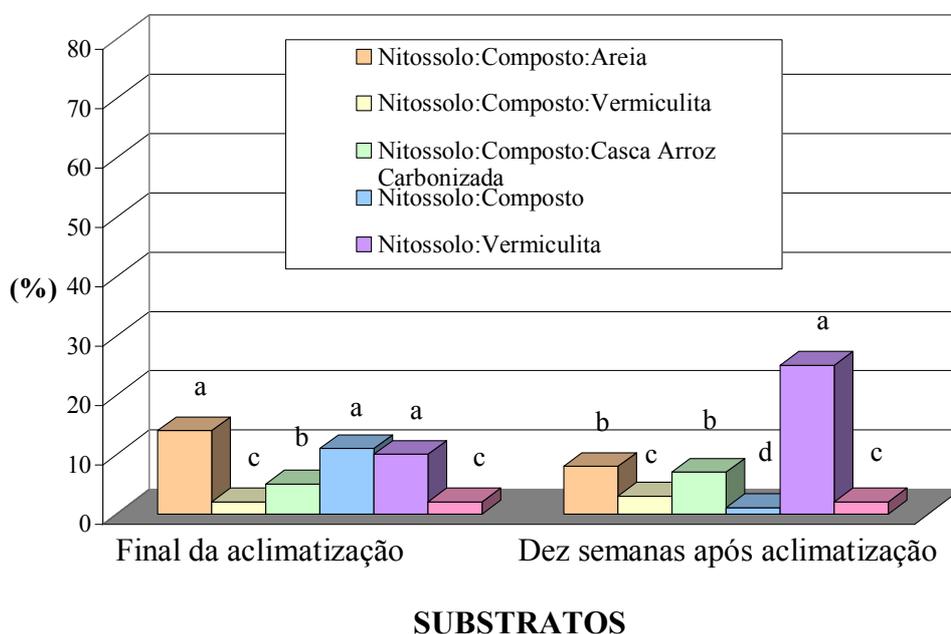
<sup>(2)</sup> Os efeitos dos fatores e suas interações são significativos a \*\*\* P < 0,01; \*\* P < 0,1; \* P < 0,05 ou Não Significativo (NS).

**Tabela 3.** Peso da matéria seca de parte aérea (MSA) e comprimento radicular do porta-enxerto SO4 micorrizado (MIC) ou não micorrizado (NM), cultivado em seis substratos, em duas fase após aclimatização.

SUBSTRATOS	FMA	MSA g planta <sup>-1</sup>				Comprimento radicular (cm)
		Final da aclimatização	Dez semanas após aclimatização	Final da aclimatização	Dez semanas após aclimatização	
Nitossolo:Composto:Areia	MIC	0,047 b <sup>(1)</sup>	1,194 c	20 a	602 c	
Nitossolo:Composto:Areia	NM	0,035 b	1,352 c	21 a	916 c	
Nitossolo:Composto:Vermiculita	MIC	0,053 a	1,890 b	20 a	1293 b	
Nitossolo:Composto:Vermiculita	NM	0,038 b	1,857 b	22 a	1395 b	
Nitossolo:Composto:Casca de arroz carbonizada	MIC	0,045 b	0,617 d	23 a	756 c	
Nitossolo:Composto:Casca de arroz carbonizada	NM	0,030 b	0,691 d	20 a	791 c	
Nitossolo:Composto	MIC	0,065 a	1,084 c	31 a	759 c	
Nitossolo:Composto	NM	0,032 b	1,142 c	19 a	854 c	
Nitossolo:Vermiculita	MIC	0,033 b	0,229 d	21 a	402 d	
Nitossolo:Vermiculita	NM	0,017 c	0,113 d	25 a	194 d	
Comercial	MIC	0,043 b	2,105 a	21 a	1743 a	
Comercial	NM	0,067 a	2,226 a	26 a	1729 a	
----- Analise de variância -----						
SUBSTRATOS		** <sup>(2)</sup>	***	NS	***	
FMA		**	NS	NS	NS	
FMA X SUBSTRATOS		**	NS	NS	NS	

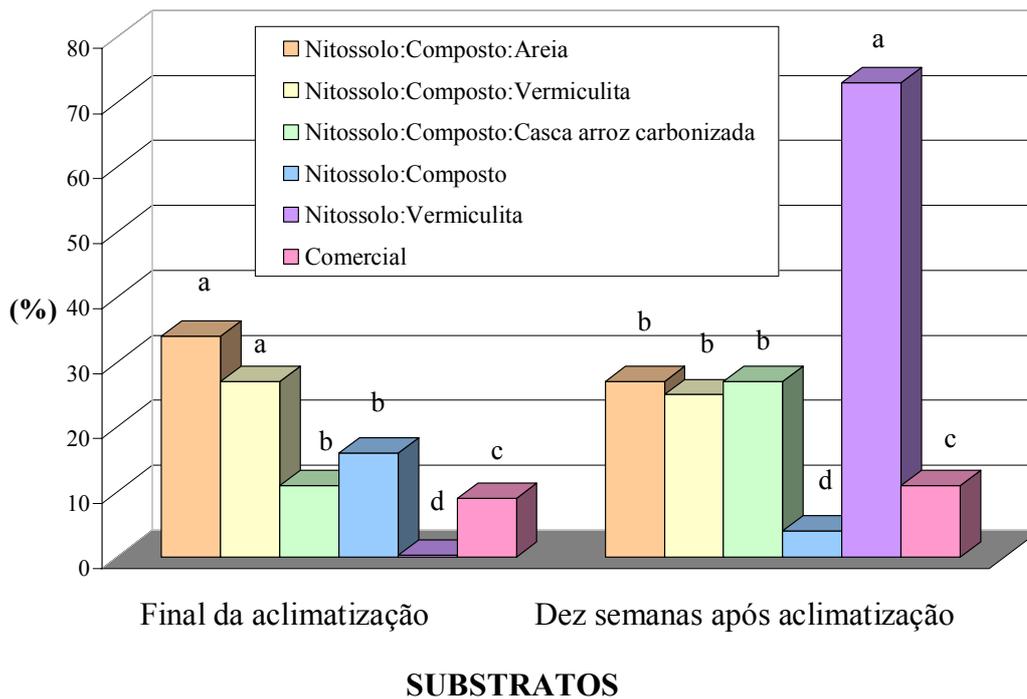
<sup>(1)</sup> Valores seguidos da mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Newman-Keuls.

<sup>(2)</sup> Os efeitos dos fatores e suas interações são significativos a \*\*\* P < 0,01; \*\* P < 0,1; \* P < 0,05 ou Não Significativo (NS).



**Figura 1.** Colonização micorrízica no porta-enxerto Paulsen 1103 em seis substratos, no final e dez semanas após a aclimatização. Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

Os FMAs aparentemente não afetaram a sobrevivência dos dois porta-enxertos de videira na aclimatização pois no final dessa fase houve colonização micorrízica, com intensidades dependentes do substrato utilizado (Figuras 1 e 2). O comprimento radicular dos dois porta-enxertos não foi afetado pela introdução dos FMAs ou pelos substratos (Tabelas 2 e 3), porém o substrato usado nesta etapa de aclimatização afetou as taxas de sobrevivência das plantas. O substrato N:V, além de prejudicar o crescimento esteve associado a uma sobrevivência de apenas 70%, índice que foi superior a 90% nos demais substratos. Esse substrato tinha o mais baixo teor de carbono (Tabela 1) o que explica que para garantir a sobrevivência de plantas micropropagadas na aclimatização são utilizados substratos ricos em matéria orgânica e nutrientes (SCHUBERT & LUBRACO, 2000).

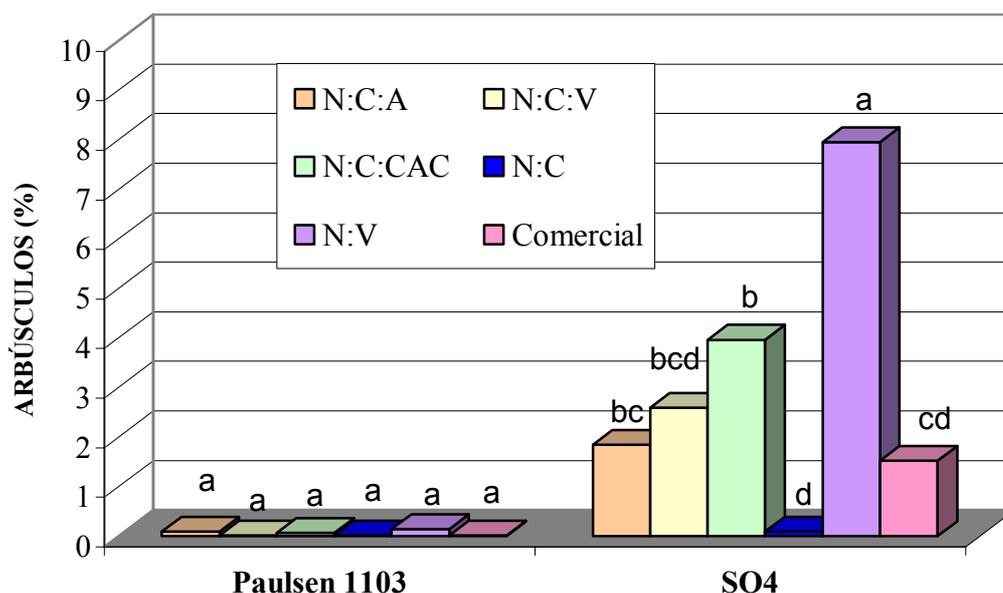


**Figura 2.** Colonização micorrízica no porta-enxerto SO4 em seis substratos, no final e dez semanas após a aclimatização. Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

Após o período de dez semanas que se seguiu à aclimatização, o crescimento de parte aérea e do sistema radicular dos porta-enxertos SO4 e Paulsen 1103 sofreu efeitos significativos apenas dos substratos (Tabelas 2 e 3). Possivelmente, a ausência de resposta à inoculação de FMAs está ligada à baixa percentagem de arbúsculos (Figura 3) que atuam nos processos de trocas de nutrientes (HAYMAN, 1983). A luminosidade relativamente baixa da câmara de crescimento pode ter provocado a ocorrência de poucos arbúsculos, principalmente para o porta-enxerto Paulsen 1103. Para o porta-enxerto SO4 a percentagem de arbúsculos apresentou diferenças significativas entre os substratos, que foram utilizados dez semanas após aclimatização. Contudo esses índices foram baixos e não refletiram em estímulos ao crescimento vegetal.

Além disso, é importante considerar que em trabalhos recentes a mesma espécie de *Glomus* tem apresentado variações genéticas entre os isolados. Há evidências de perda das seqüências genéticas de isolados da mesma espécie de FMAs quando são mantidos em condições diferentes no laboratório (CLAP *et al.*, 2001). Isso indica que pode haver uma

seleção gradual em sub-populações de FMAs adaptados às condições que prevalecerem no laboratório. A diversidade genética presente nos esporos dos FMAs utilizados como propágulos é alterada rapidamente sob diferentes condições de cultivos, durante a produção dos inóculos (VOSTAKA & DODD, 2002). Para obter melhores resultados com a inoculação micorrízica é importante que além de o inóculo dos FMAs seja isolado da região de origem da cultura, a sua conservação no laboratório deve ser levada em consideração.



**Figura 3.** Percentagem de arbúsculos nos porta-enxertos Paulsen 1103 e SO4 em seis substratos, dez semanas após a aclimatização. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

Entretanto, também deve se considerar que o importante papel das micorrizas sobre o crescimento vegetal na aclimatização atenua-se ou mesmo desaparece após essa fase crítica (VIDAL *et al.*, 1992; ESTAÚN *et al.*, 1999; AZCÓN-AGUILAR & BAREA, 1997).

O substrato comercial proporcionou, nos dois porta-enxertos, valores de peso da matéria seca de parte aérea e comprimento radicular significativamente maiores que os demais substratos, na avaliação feita dez semanas após aclimatização (Tabelas 2 e 3). No entanto, nesse substrato as plantas tiveram uma baixa colonização micorrízica (Figuras 1 e 2), devido a seus altos níveis de nutrientes disponíveis (Tabela 1), principalmente o

fósforo, que inibe a colonização micorrízica e afeta a resposta em crescimento das plantas (SMITH & READ, 1997). A inoculação micorrízica é mais eficiente que o uso de substratos com alta fertilidade para se promover o crescimento das plantas após o transplante e em condições desfavoráveis (ESTAÚN *et al.*, 1999). Além disso, as micorrizas podem reduzir o estresse do transplante e atuar como controle biológico, além de facilitar a adaptação das plantas às condições de campo, principalmente as perenes, como as frutíferas (LINDERMANN & DAVIES, 2001). Os fungos micorrízicos arbusculares também podem influenciar na morfogênese e na arquitetura das raízes de plantas de videira micropropagadas, assegurando uma rápida formação e melhor desenvolvimento do sistema radicular depois do transplante (SCHELLENBAUM *et al.*, 1991).

A maior porcentagem de colonização das raízes nos porta-enxertos Paulsen 1103 e SO4 ocorreu no substrato à base de solo e vermiculita (N:V), dez semanas após a aclimatização (Figura 1 e 2). A adição de solo na formulação do substrato geralmente resulta em níveis altos de colonização micorrízica (VIDAL *et al.*, 1992). Os níveis relativamente baixos de matéria orgânica e de nutrientes disponíveis (Tabela 1) e a boa porosidade e aeração deste substrato N:V devem ter favorecido a colonização micorrízica e, conseqüentemente, a resposta em crescimento nos tratamentos inoculados, visto que a presença de micorrizas contribui para o aumento no crescimento da videira (SCHUBERT *et al.*, 1990; LINDERMANN & DAVIES, 2001).

A combinação de solo e composto termofílico (N:C) resultou em um substrato pouco poroso, sugerindo aeração pobre. Por isso, o crescimento das plantas e a colonização micorrízica podem ter sido limitados, pois baixas concentrações de O<sub>2</sub> inibem severamente a germinação dos esporos e a colonização das raízes (SAIF, 1981; GAUR & ADHOLEYA, 2000). O substrato favorável à infecção micorrízica deve apresentar balanço adequado de água e permitir o desenvolvimento do sistema radicular (WANG *et al.*, 1993). Dessa forma, dez semanas após aclimatização os porta-enxertos Paulsen 1103 e SO4 tiveram a menor colonização micorrízica no substrato N:C (Figuras 1 e 2). O porta-enxerto Paulsen 1103 teve níveis razoáveis de colonização micorrízica nos substratos N:C:A e N:C:CAC (Figura 1), mas o primeiro (N:C:A) proporcionou o maior peso da matéria seca de parte aérea e comprimento radicular (Tabela 2). Os substratos N:C:A, N:C:V e N:C:CAC favoreceram a micorrização do porta-enxerto SO4 (Figura 2), mas somente o substrato N:C:V, além de

favorecer a micorrização, esteve associado aos maiores valores de peso da matéria seca de parte aérea e comprimento radicular (Tabela 3).

A adição de composto termofílico nos substratos (N:C:A, N:C:V, N:C:CAC e N:C) aumentou os valores de fósforo, potássio e do pH (Tabela 1), conseqüentemente foi nesses substratos que ocorreu o maior crescimento das plantas e a menor colonização micorrízica, e o inverso foi observado nas plantas cultivadas no substrato a base de nitossolo e vermiculita (N:V), que não continha composto termofílico. Deste modo, para essas plantas cultivadas nos substratos formulados com composto termofílico, os efeitos benéficos da associação micorrízica podem aparecer num estágio mais prolongado de desenvolvimento, visto que na produção de porta-enxertos de videira a micorrização é importante, não somente para a promoção de crescimento mas também para o proteger as plantas do ataque de patógenos de solo, como o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*.

#### **4.1.2 Acúmulo de fósforo e substâncias de reserva em porta-enxertos de videira micropropagados.**

Nos porta-enxertos, Paulsen 1103 e SO4, a inoculação dos fungos micorrízicos arbusculares proporcionou um aumento significativamente maior no conteúdo de fósforo foliar em relação às plantas não inoculadas. Esse aumento no conteúdo de fósforo foliar variou com o substrato de cultivo e com o porta-enxerto. A presença dos FMAs favoreceu o aumento no conteúdo de fósforo foliar do porta-enxerto SO4 cultivado nos substratos N:C:A, N:C e N:V, enquanto os substratos N:C:V e N:C, além do substrato comercial, contribuíram para o aumento no conteúdo de fósforo do porta-enxerto Paulsen 1103 (Tabela 4). Devido à pouca quantidade de biomassa vegetal obtida, em alguns tratamentos não foi possível a determinação de fósforo no tecido foliar. No entanto, os dados obtidos indicam que, de forma geral, a presença da associação micorrízica resulta em maior absorção de fósforo.

No porta-enxerto Paulsen 1103 cultivado no substrato comercial, a inoculação micorrízica proporcionou maior concentração de fósforo foliar que em plantas recebendo apenas a microbiota não micorrízica. Assim, em substratos comerciais, com altos níveis de nutrientes disponíveis, os FMAs podem fornecer às plantas micropropagadas um adicional no conteúdo de nutrientes, mesmo que a inoculação micorrízica não apresente efeito no crescimento desse porta-enxerto (Tabela 2).

Para o porta-enxerto SO4 cultivado no substrato N:V, que tinha um nível de fósforo extraível de 10 mg dm<sup>-3</sup>, a presença dos FMAs assegurou um conteúdo de fósforo semelhante ao dos porta-enxertos não micorrizados cultivados no substrato N:C:A, com nível de fósforo extraível de 375 mg dm<sup>-3</sup>. Isso ocorreu provavelmente devido à maior colonização micorrízica das plantas cultivadas no substrato N:V que nas mudas cultivadas no substrato N:C:A (Figuras 1 e 2).

**Tabela 4.** Conteúdo nutricional de fósforo (%) da parte aérea dos porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e SO4 micorrizados (MIC) e não micorrizados (NM), em seis substratos, após dez semanas de aclimatização.

SUBSTRATOS	FMA	Conteúdo de fósforo (%)	
		Paulsen 1103	SO4
Nitossolo:Composto:Areia	MIC	0,175 e	0,200 b <sup>(1)</sup>
Nitossolo:Composto:Areia	NM	0,155 def	0,150 cd
Nitossolo:Composto:Vermiculita	MIC	0,255 c	nd <sup>(2)</sup>
Nitossolo:Composto:Vermiculita	NM	0,160 def	0,165 c
Nitossolo:Composto:Casca arroz carbonizada	MIC	Nd	0,205 b
Nitossolo:Composto:Casca arroz carbonizada	NM	0,105 f	Nd
Nitossolo:Composto	MIC	0,210 d	0,200 b
Nitossolo:Composto	NM	0,110 f	0,140 d
Nitossolo:Vermiculita	MIC	0,135 ef	0,160 c
Nitossolo:Vermiculita	NM	0,155 def	0,135 d
Comercial	MIC	0,695 a	0,525 a
Comercial	NM	0,460 b	Nd

<sup>(1)</sup> médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem significativamente pelo teste de SNK a 5% de probabilidade.

<sup>(2)</sup> valores não determinados devido à quantidade insuficiente de material vegetal.

A inoculação micorrízica exerce consideráveis efeitos nas concentrações de fósforo foliar das plantas. Para os porta-enxertos de videira, particularmente, existem vários trabalhos demonstrando o incremento no conteúdo de fósforo nas folhas das plantas, e a alta dependência da videira aos fungos micorrízicos quando submetidas a condições estressantes (KARAGIANNIDIS *et al.*, 1995; BIRICOLTI *et al.*, 1997; LINDERMANN & DAVIES, 2001; AGOSTINI, 2002; MOTOSUGI *et al.*, 2002). Muitos isolados de FMAs

favorecem as plantas na aquisição de nutrientes essenciais para o crescimento vegetal. A associação micorrízica também pode amenizar os problemas causados pelas deficiências nutricionais, encontradas por plantas que crescem em solos com baixos níveis de nutrientes e/ou possuem pH baixo (CLARK *et al.*, 1999). Além disso, as micorrizas podem aumentar a resistência das plantas através de vários mecanismos, e proporcionar as plantas tolerância a patógenos de solo (AZCON-AGUILAR *et al.*, 2002), e aumento na absorção de água (AUGÉ, 2001).

Com relação às substâncias de reserva foliar não houve diferenças significativas entre tratamentos com e sem inoculação micorrízica, nem entre os substratos, para os dois porta-enxertos (Tabela 5). Foi demonstrado, em outro trabalho, que a micorrização dos porta-enxertos de videira 101-14 Millardet et de Grasset e Paulsen 1103 não proporcionou aumentos significativos nos teores de substâncias de reserva. (AGOSTINI, 2002).

**Tabela 5.** Substâncias de reserva foliar dos porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e SO4 micorrizados (MIC) e não micorrizados (NM), em seis substratos, após dez semanas da aclimatização.

SUBSTRATOS	FMA	Substâncias de reserva aérea	
		(%)	
		Paulsen 1103	SO4
Nitossolo:Composto:Areia	MIC	37,41 a	41,10 ab <sup>(1)</sup>
Nitossolo:Composto:Areia	NM	37,18 a	40,89 ab
Nitossolo:Composto:Vermiculita	MIC	37,96 a	43,84 a
Nitossolo:Composto:Vermiculita	NM	nd <sup>(2)</sup>	43,49 a
Nitossolo:Composto:Casca arroz carbonizada	MIC	nd	37,87 ab
Nitossolo:Composto:Casca arroz carbonizada	NM	39,29 a	35,39 b
Nitossolo:Composto	MIC	37,83 a	Nd
Nitossolo:Composto	NM	nd	Nd
Nitossolo:Vermiculita	MIC	nd	Nd
Nitossolo:Vermiculita	NM	nd	40,81 ab
Comercial	MIC	38,95 a	40,79 ab
Comercial	NM	38,83 a	40,80 ab

<sup>(1)</sup> médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem significativamente pelo teste de SNK a 5% de probabilidade

<sup>(2)</sup> valores não determinados devido à quantidade insuficiente de material vegetal.

A transferência das substâncias de reserva entre as plantas e os FMAs é feita pela translocação direta de compostos fotossintetizados pelo hospedeiro. Esse processo de transferência ocorre através dos arbúsculos e por isso os fatores que influem na fotossíntese do hospedeiro, como a intensidade luminosa, fotoperíodo e/ou desfolhamento da planta, podem alterar tal fornecimento (SILVEIRA, 1998). Neste caso, é importante lembrar da luminosidade relativamente baixa da câmara de crescimento pode ter provocado a ocorrência de poucos arbúsculos (Figura 3) e, conseqüentemente não interferiram no processo de transferência de substâncias de reserva. Entretanto, os FMAs podem acumular substâncias de reserva nas mudas, e contribuir para a sobrevivência após o transplante (AGOSTINI, 2002).

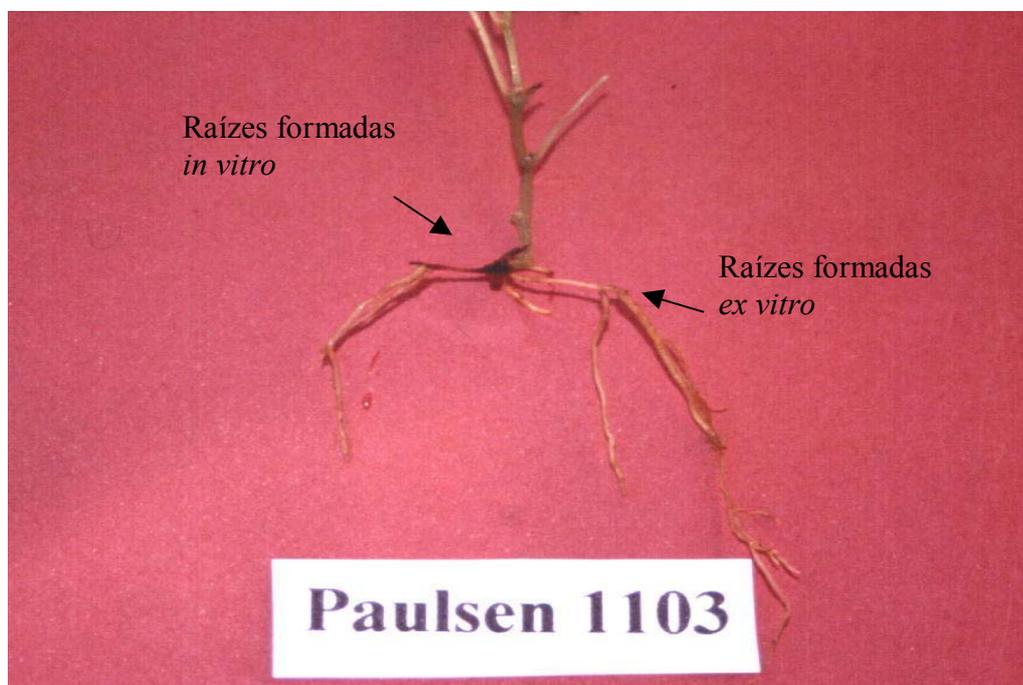
A redução da severidade de doenças de plantas pode ser influenciada pelos FMAs através de vários mecanismos, incluindo a competição por fotossintatos do hospedeiro e o aumento do fornecimento de nutrientes às plantas (LARANJEIRAS, 2001; DECLERCK *et al.*, 2002). Desta forma, mesmo que a associação micorrízica não se reflita em ganhos na biomassa vegetal, teores mais elevados de fósforo e/ou de substâncias de reserva podem tornar as plantas mais tolerantes a diferentes condições de estresse.

#### **4.2 Formação *in vitro* e *ex vitro* de raízes de porta-enxertos micropropagados de videira em diferentes meio de cultura.**

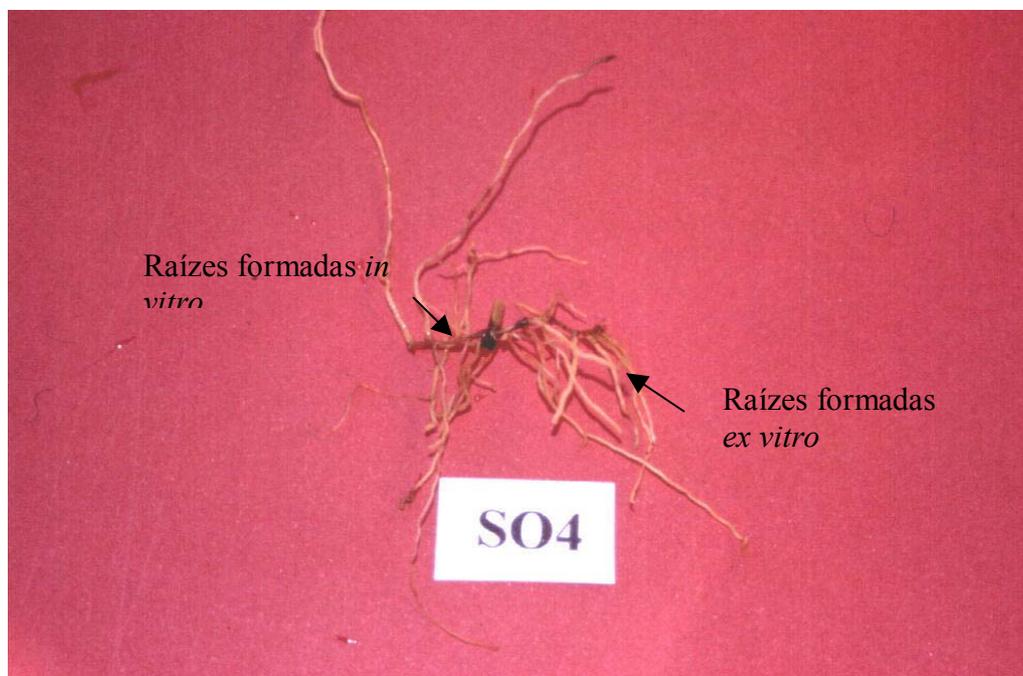
Após cinco semanas de aclimatização foi possível distinguir as raízes formadas durante a fase *ex vitro* daquelas formadas na fase anterior (*in vitro*). A adição de violeta de genciana no meio de cultura para micropropagação dos porta-enxertos de videira, além de permitir distinguir as raízes formadas *in vitro* das formadas *ex vitro*, tornou possível observar que todas as raízes formadas *in vitro* sobrevivem até o final da fase de aclimatização das plantas. Como se observa nas Figuras 4 e 5, as raízes formadas *in vitro* não só sobrevivem na aclimatização das plantas, mas a partir delas houve um crescimento vigoroso de raízes laterais.

Há trabalhos demonstrando que as raízes formadas *in vitro* degeneram-se e são substituídas por raízes novas durante a aclimatização (MCCLELLAND *et al.*, 1990) mas, para outros autores, essas raízes sobrevivem depois da transferência para aclimatização, o que foi verificado no presente estudo (APTER *et al.*, 1993; GRIBAUDO *et al.*, 1995,

1996). Como o desenvolvimento do sistema vascular que conecta as raízes formadas *in vitro*



**Figura 4.** Raízes do porta-enxerto Paulsen 1103 formadas *in vitro* - coradas com violeta de genciana - e raízes formadas *ex vitro*, após 5 semanas de aclimatização.



**Figura 5.** Raízes do porta-enxerto SO4 formadas *in vitro* - coradas com violeta de genciana – e raízes formadas *ex vitro*, após 5 semanas de aclimatização.

*in vitro* com a parte aérea é incompleto (MCCLELLAND *et al.*, 1990), poderão ser deficientes à movimentação da água, a absorção de nutrientes, como o fósforo e o crescimento das plantas (APTER *et al.*, 1993).

A sobrevivência dos porta-enxertos Paulsen 1103 e SO4, enraizados *in vitro*, foi em torno de 95%. Entretanto, as plantas aclimatizadas na forma de microestacas, cujas raízes formadas *in vitro* foram totalmente podadas, não sobreviveram durante a fase de aclimatização (Tabela 6). Esses resultados demonstram que as raízes formadas *in vitro* são viáveis e capazes de crescer durante a aclimatização (Tabela 7), além de garantirem a sobrevivência dos porta-enxertos a essa fase. As raízes formadas *in vitro* podem ser importantes para atender à demanda de nutrientes e ao aumento da taxa de transpiração exigida pela parte aérea durante a fase de aclimatização (GRIBAUDO *et al.*, 1996). Além disso, as raízes são necessárias na aclimatização de plantas micropropagadas, pois as raízes formadas *in vitro* darão suporte para formação de novas folhas e caules, que são produzidas durante a aclimatização das plantas (MCCLELLAND *et al.*, 1990).

**Tabela 6.** Percentagem de sobrevivência (%) dos porta-enxertos de videira aclimatizados com e sem raízes formadas *in vitro*.

<b>Porta-enxerto</b>	<b>Raízes formadas <i>in vitro</i></b>	<b>Sobrevivência (%)</b>
Paulsen 1103	Sim	90
Paulsen 1103	Não	0
SO4	Sim	95
SO4	Não	0

Muitos pesquisadores adotam o enraizamento *in vitro* em função das altas percentagens de sobrevivência, de enraizamento e da maior uniformidade das plantas (MCCLELLAND *et al.*, 1990). Entretanto, para outros pesquisadores o método de enraizamento *ex vitro* é superior ao *in vitro*. Para plantas micropropagadas de mirtilo, as maiores taxas de sobrevivência foram obtidas com o enraizamento *ex vitro*, além de ter encurtado em seis meses o período de aclimatização, quando comparado ao protocolo de enraizamento *in vitro* (ISUTSA *et al.*, 1994). Para plantas micropropagadas de videira, o enraizamento *ex vitro* assegura um padrão de uniformidade às plantas aclimatizadas (THOMAS & RAVINDRA, 1997).

**Tabela 7.** Comprimento radicular dos porta-enxertos de videira micropropagados em meio de cultura contendo ou não violeta de genciana.

Porta-enxerto	Violeta de genciana	raízes formadas	Raízes formadas	Comprimento total
		<i>in vitro</i>	<i>ex vitro</i>	
		----- cm -----		
Paulsen 1103	Sim	1,77	45,37	47,14
Paulsen 1103	Não	2,06	44,88	46,94
SO4	Sim	2,37	39,19	41,56
SO4	Não	1,87	37,52	39,39

A presença de 0,15 mg L<sup>-1</sup> de violeta de genciana não afetou o crescimento de raízes e de parte aérea depois de cinco semanas de aclimatização (Tabelas 7 e 8). A concentração adequada do corante, adicionado no meio de cultura para distinguir as raízes formadas *in vitro* das *ex vitro*, foi determinado por GRIBAUDO *et al.* (1995). Dentre as concentrações testadas, a de 0,15 mg L<sup>-1</sup> não afetou o crescimento de parte aérea e a quantidade de raízes, mas o comprimento radicular foi reduzido nas primeiras três semanas de aclimatização. Após esse período, a concentração de violeta de genciana não afetou o comprimento radicular dos porta-enxertos de videira.

**Tabela 8.** Matéria fresca de parte aérea (MFA), matéria seca de parte aérea (MSA) e peso fresco de raiz dos porta-enxertos Paulsen 1103 e SO4, micropropagados em meio de cultura com e sem violeta de genciana.

Porta-enxerto	Violeta de genciana	MFA	MAS	PFR
		----- g planta <sup>-1</sup> -----		
Paulsen 1103	Sim	0,322 a <sup>(1)</sup>	0,072 a	0,144 a
Paulsen 1103	Não	0,396 a	0,064 a	0,152 a
SO4	Sim	0,351 a	0,065 a	0,135 a
SO4	Não	0,357 a	0,058 a	0,140 a

<sup>(1)</sup>em cada coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Newman-Keuls.

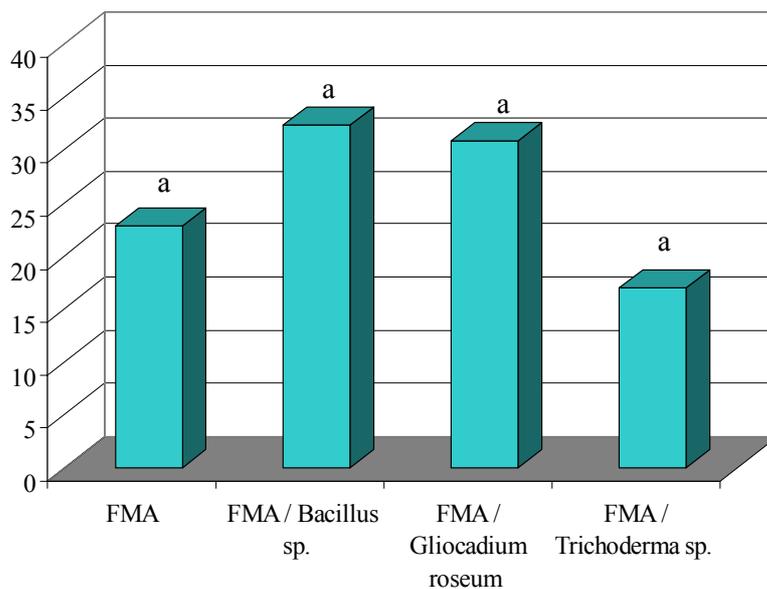
Não foi possível avaliar se a colonização por fungos micorrízicos arbusculares ocorre nas raízes formadas *in vitro* e *ex vitro*. A quantidade de raízes formadas *in vitro*, quando transferidas para aclimatização, era pequena, o que dificultou preparar as lâminas

para as avaliações. Para fazer essas avaliações seria necessário micropropagar os porta-enxertos de videira em um meio de cultura que permitisse duas etapas, uma etapa de micropropagação e uma etapa de enraizamento.

### 4.3 Controle biológico da fusariose por fungos micorrízicos arbusculares e antagonistas a patógenos.

#### 4.3.1 Avaliação da compatibilidade entre fungos micorrízicos arbusculares e antagonistas a patógenos.

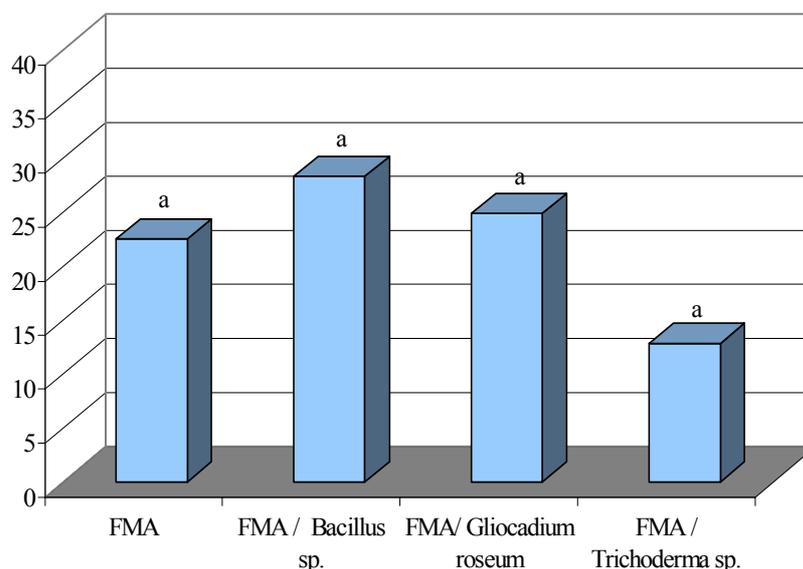
A colonização micorrízica, nos dois porta-enxertos, não foi afetada significativamente pela presença dos fungos antagonistas a patógenos *Trichoderma* sp. e *Gliocadium roseum*, ou por *Bacillus* sp. (Figuras 6 e 7). Isso demonstra a compatibilidade de uso conjunto dos FMAs e desses antagonistas.



**Figura 6.** Colonização micorrízica do porta-enxerto Paulsen 1103 inoculados ou não com os antagonistas a patógenos *Bacillus* sp., *Gliocadium roseum* ou *Trichoderma* sp. Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Newman - Keuls a 5% de probabilidade.

Microrganismos antagonistas, como o fungo *Trichoderma* sp., são comumente utilizados por apresentar potencial como agente de controle biológico (MELO *et al.*, 1992;

LARANJEIRAS, 2001). Entretanto, eles podem provocar efeitos adversos sobre microrganismos que promovem o crescimento das plantas, com os FMAs (LINDERMANN, 1988), o que não se confirma no presente estudo.



**Figura 7.** Colonização micorrízica (%) do porta-enxerto SO4 inoculado ou não com os antagonistas a patógenos *Bacillus* sp., *Gliocadium roseum* ou *Trichoderma* sp. Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Newman - Keuls a 5% de probabilidade.

O estabelecimento e o funcionamento da associação micorrízica são influenciados por vários microrganismos do solo, que vão atuar em detrimento ou benefício dos FMAs (LINDERMANN, 1988; BAREA *et al.*, 2002). Vários trabalhos desmonstram a natureza dos efeitos destes antagonistas a patógenos, tanto fungos quanto bactérias, sobre os FMAs (CALVET *et al.*, 1992; MCALLISTER *et al.*, 1994a; ROUSSEAU *et al.*, 1996; GREEN *et al.*, 1999). No entanto, ocorrem discrepâncias ou variações entre os resultados obtidos nesses trabalhos, que são devido às condições experimentais diferentes, como métodos de cultivo *in vitro* ou em solo, a planta hospedeira e a época de inoculação dos antagonistas a patógenos ou dos FMAs. Além disso, os parâmetros avaliados também são diferentes. Em alguns trabalhos foram observados a atividade e o comprimento das hifas dos FMAs, ou a quantidade de propágulos dos antagonistas ao redor das raízes micorrizadas; já em outros trabalhos avaliaram-se o nível de colonização micorrízica e a resposta da planta, em crescimento, à presença das combinações FMAs e antagonistas. Contudo, para um sistema

de produção de mudas de porta-enxertos micropropagados de videira - com inoculação dos FMAs durante a fase de aclimatização, e introdução de antagonistas a patógenos em uma etapa que simula a fase de viveiro - os antagonistas a patógenos não provocam prejuízos nos níveis de colonização micorrízica (Figuras 6 e 7).

A adição de composto termofílico na formulação dos substratos utilizados pode ter contribuído para a ausência de interação entre os FMAs e os antagonistas a patógenos, no que se refere à resposta em crescimento dos porta-enxertos de videira, pois não houve diferenças significativas na matéria seca de parte aérea e de raiz, nem no comprimento radicular, para os dois porta-enxertos (Tabelas 9 e 10). Para o porta-enxerto Paulsen 1103, a matéria seca de parte aérea variou de 5,53 a 3,38 g planta<sup>-1</sup>; a matéria seca de raiz, de 3,63 a 0,77 g planta<sup>-1</sup>; e o comprimento radicular ficou entre 412 e 152 cm (Tabela 9). A matéria seca de parte aérea do porta-enxerto SO4 variou de 8,64 a 11,43 g planta<sup>-1</sup>; a matéria seca de raiz, de 3,82 a 5,46 g planta<sup>-1</sup>; e o comprimento radicular de 430 a 197 cm (Tabela 10). O crescimento vegetal depende de interações entre os FMAs e fungos saprófitos e/ou rizobactérias. Tais interações, por sua vez, dependem do solo ou substrato e de sua população microbiana (CALVET *et al.*, 1993; GODEAS *et al.*, 1999).

Tabela 9. Matéria seca de parte aérea e de raiz e comprimento radicular (cm) do porta-enxerto Paulsen 1103 inoculados ou não com os antagonistas a patógenos *Bacillus* sp., *Gliocadium roseum* e *Trichoderma* sp.

TRATAMENTOS	FMA	MSA	MSR	Comprimento (cm)
		----- g planta <sup>-1</sup> -----		
CONTROLE	MIC	5,527 a <sup>(1)</sup>	0,767 a	164 a
CONTROLE	NM	3,383 a	1,334 a	184 a
<i>Bacillus</i> sp.	MIC	3,459 a	1,521 a	241 a
<i>Bacillus</i> sp.	NM	3,594 a	1,034 a	149 a
<i>Gliocadium roseum</i>	MIC	4,246 a	1,143 a	217 a
<i>Gliocadium roseum</i>	NM	3,988 a	1,128 a	152 a
<i>Trichoderma</i> sp.	MIC	4,477 a	1,711 a	250 a
<i>Trichoderma</i> sp.	NM	3,776 a	3.631 a	412 a

<sup>(1)</sup> em cada coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Newmann-Keuls.

Os substratos utilizados para a produção das mudas de porta-enxertos podem interferir na comunidade rizoférica que foi inoculada nas plantas. O teor de matéria orgânica presente na formulação dos substratos pode provocar competição por metabólitos entre os antagonistas a patógenos e os FMAs. No entanto, tal competição entre microrganismos pode não ocorrer quando o solo ou o substrato apresentar alto teor de matéria orgânica (GODEAS *et al.*, 1999).

Tabela 10. Matéria seca de parte aérea e de raiz e comprimento radicular (cm) do porta-enxerto SO4 inoculados ou não com os antagonistas a patógenos *Bacillus* sp., *Gliocadium roseum* e *Trichoderma* sp.

TRATAMENTOS	FMA	MSA	MSR	Comprimento (cm)
		----- g planta <sup>-1</sup> -----		
CONTROLE	MIC	9,782 a <sup>(1)</sup>	5,303 a	283 a
CONTROLE	NM	10,282 a	4,754 a	390 a
<i>Bacillus</i> sp.	MIC	10,610 a	7,441 a	430 a
<i>Bacillus</i> sp.	NM	8,637 a	3,819 a	197 a
<i>Gliocadium roseum</i>	MIC	11,432 a	5,459 a	324 a
<i>Gliocadium roseum</i>	NM	8,959 a	4,235 a	354 a
<i>Trichoderma</i> sp.	MIC	10,140 a	3,866 a	296 a
<i>Trichoderma</i> sp.	NM	10,121 a	4,265 a	378 a

<sup>(1)</sup> em cada coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Newmann-Keuls.

Além disso, houve variação estatística dentro dos tratamentos o que, conseqüentemente, interferiu nos resultados apresentados pelo teste de separação de médias. Essas variações podem ser devido ao composto termofílico que possui alta atividade microbiana (COTXARRERA *et al.*, 2002). Desta forma, o método de esterilização com microondas talvez não tenha sido eficiente para eliminar os efeitos da população de microrganismos presente no composto termofílico e também não garantiu a uniformidade dos substratos de cultivo dos porta-enxertos. As plantas podem, assim, apresentar respostas diferenciadas, dependendo das interações que ocorreram nos vasos durante o período do experimento.

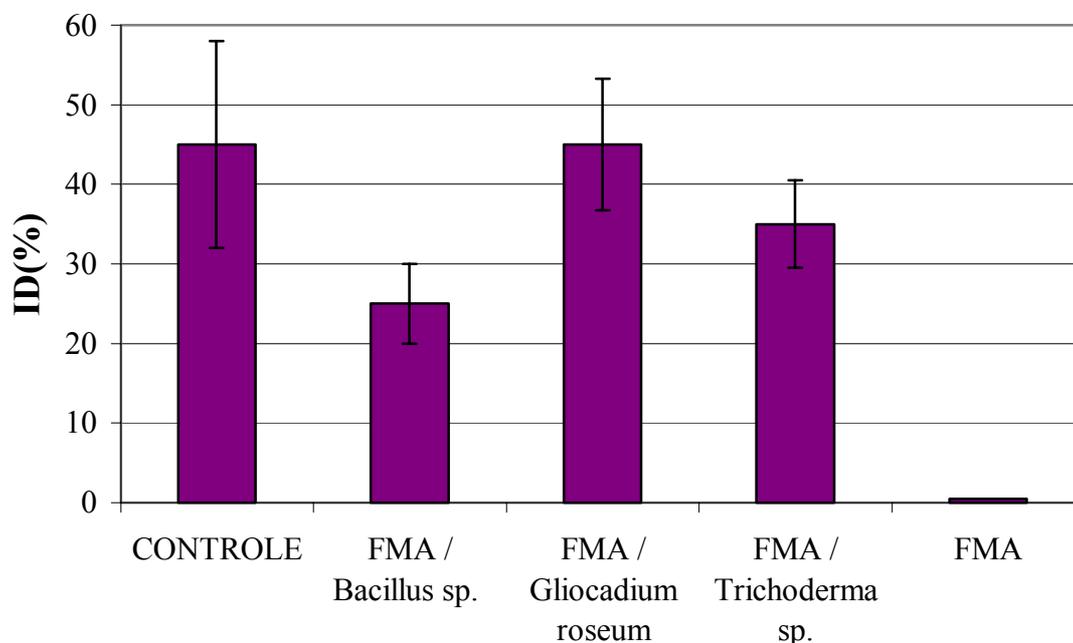
### 4.3.2 Fungos micorrízicos arbusculares e antagonistas a patógenos no controle de fusariose

O patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*, inoculado nos substratos de aclimatização dos porta-enxertos, não causou sintomas da doença nessa primeira etapa. A presença do composto termofílico na formulação dos substratos utilizados para o crescimento das plantas pode ter tornado os substratos supressivos ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*. O composto apresenta alto pH, alta condutividade elétrica, ampla população de bactérias e também alta atividade microbiana. A combinação desses fatores pode tornar o composto capaz de inibir o crescimento do patógeno (COTXARRERA *et al.*, 2002). Assim, após a transferência das plantas para o substrato de crescimento formado pela mistura de areia, vermiculita e substrato comercial - foi possível observar sintomas de fusariose no porta-enxerto SO4. O porta-enxerto Paulsen 1103 que é resistente à doença não apresentou sintomas, mesmo após a transferência para o outro substrato.

Os níveis de sintomas observados estão de acordo com os níveis de resistência assumidas anteriormente. O porta-enxerto susceptível apresentou sintomas de fusariose na ausência dos agentes de controle biológico utilizados. O porta-enxerto resistente, Paulsen 1103, não apresentou sintomas da doença, com e sem inoculação combinada dos FMAs e dos antagonistas a patógenos. A redução da necrose produzida pela presença dos FMAs é tanto maior quanto mais susceptível for a cultivar, e tanto menor quando menos susceptível for a cultivar. No caso de cultivares de morangueiros micorrizados, a cultivar susceptível apresentou 60% de redução dos sintomas, e para uma cultivar resistente, a colonização micorrízica não interferiu no nível de sintomas da doença (NORMAN *et al.*, 1996).

Para o porta-enxerto SO4, o tratamento controle apresentou um índice de cerca de 45% de infecção causado pelo patógeno. No entanto, as plantas inoculadas com os FMAs não apresentaram nenhuma infecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*. Dentre as misturas de agentes de controle biológico, a combinação de FMA e *Bacillus* sp. proporcionou uma redução de 20 % no índice da doença em relação ao tratamento controle. Nas combinações FMAs com os fungos saprofitos não houve diferenças no índice da doença. Com a inoculação do *Gliocadium roseum*, as plantas micorrizadas apresentaram 40% de infecção, índice semelhante ao tratamento controle. A presença do *Trichoderma* sp. nas plantas micorrizadas propiciou uma posição intermediária com uma redução de

apenas 10% no índice de infecção do patógeno, quando comparado ao tratamento controle (Figura 8).



**Figura 8.** Índice da doença (ID) na região do colo do porta-enxerto SO4, 30 após a inoculação do patógeno. As barras indicam o erro padrão da média.

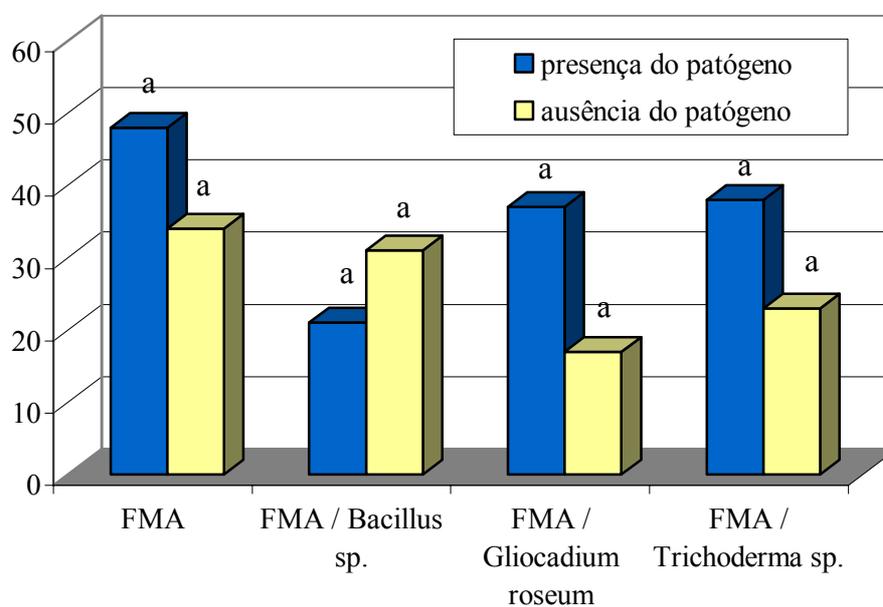
A associação micorrízica reduz os danos causados às plantas pelos patógenos que provocam podridões radiculares e, conseqüentemente, prejuízos ao sistema vascular, através de vários mecanismos (GUILLEMIN *et al.*, 1994; NORMAN *et al.*, 1996; TROTTA *et al.*, 1996; AZCON-AGUILAR & BAREA, 1996; DECLERCK *et al.*, 2002). Os microorganismos antagonistas, como *Trichoderma* sp. e o *Bacillus* sp., são reconhecidos como potenciais agentes de controle biológico de vários patógenos de solo, incluindo o fungo *Fusarium oxysporum* (LARANJEIRAS, 2001). Portanto, a combinação dos FMAs e de outros agentes de controle biológico poderia melhorar os níveis de controle da doença. Os efeitos desses microrganismos utilizados em conjunto seriam superiores ao uso isolado de cada agente de controle biológico (LINDERMANN, 1988; NEMEC *et al.*, 1996). Contudo, para o porta-enxerto SO4 a combinação entre os FMAs e os antagonistas a patógenos não foi positiva, principalmente a combinação com os fungos saprófitos.

Quando inoculados isoladamente, os FMAs e outros agentes de controle biológico induzem os mecanismos de defesa das plantas, que ocorrem através de várias respostas bioquímicas e moleculares. A presença do patógeno provoca a ativação de mecanismos moleculares nas plantas micorrizadas, através do acúmulo de moléculas liberadas pelas células das raízes. No entanto, nenhuma reação molecular ou acúmulo de substâncias foi observado em plantas não micorrizadas e infectadas com os patógenos no sistema radicular (CORDIER *et al.*, 1998). Desse modo, as plantas inoculadas com as combinações de FMAs com algum dos antagonistas a patógenos podem ativar mecanismos moleculares diferentes daqueles ativados quando são inoculados isoladamente os agentes de controle biológico. O acúmulo de compostos na planta depende dos organismos associados à planta ou presentes na rizosfera (POZO *et al.*, 2002a) e essas interações são mediadas pelas plantas (MCALLISTER *et al.*, 1994a).

O efeito protetor que os FMAs conferem contra os patógenos de solo é provavelmente uma consequência de vários mecanismos e de interações entre estes (AZCÓN-AGUILAR *et al.*, 2002), que podem ter sido modificados pela presença de um dos antagonistas a patógenos inoculados nas raízes dos porta-enxertos de videira micorrizados, quando submetidos ao ataque do *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*. As plantas possuem vários mecanismos latentes de defesa, que conferem proteção aos microrganismos patogênicos. Tais mecanismos podem ser ativados sistemicamente, pela exposição da planta a certos tipos de estresse, pela infecção por patógenos ou por outros microrganismos, incluindo os FMAs e antagonistas a patógenos (STURZ *et al.*, 2000). Os FMAs e outros agentes de controle biológico, como as rizobactérias e os fungos antagonistas a patógenos, induzem na planta a resistência sistêmica ou estimulam nas raízes a produção de proteínas que possuem atividades antifúngicas, quando são inoculadas nas plantas individualmente (LIU *et al.*, 1995; HOFFLAND *et al.*, 1996; CORDIER *et al.*, 1998; AHMED *et al.*, 2000; POZO *et al.*, 2002a). A combinação desses microrganismos - FMAs e antagonistas a patógenos - no sistema radicular do porta-enxerto de videira possivelmente alterou a via metabólica que induz a resistência sistêmica, ou que leva à síntese das proteínas relacionadas com atividade antifúngica, visto que há diferentes rotas da resistência sistêmica (HOFFLAND *et al.*, 1996). Além disso, as exudações radiculares das plantas podem ter sido alteradas pela inoculação dos antagonistas a patógenos nas plantas micorrizadas, permitindo assim, o surgimento de infecção pelo patógeno. O estabelecimento das micorrizas provoca modificações nos exudatos radiculares, com isso

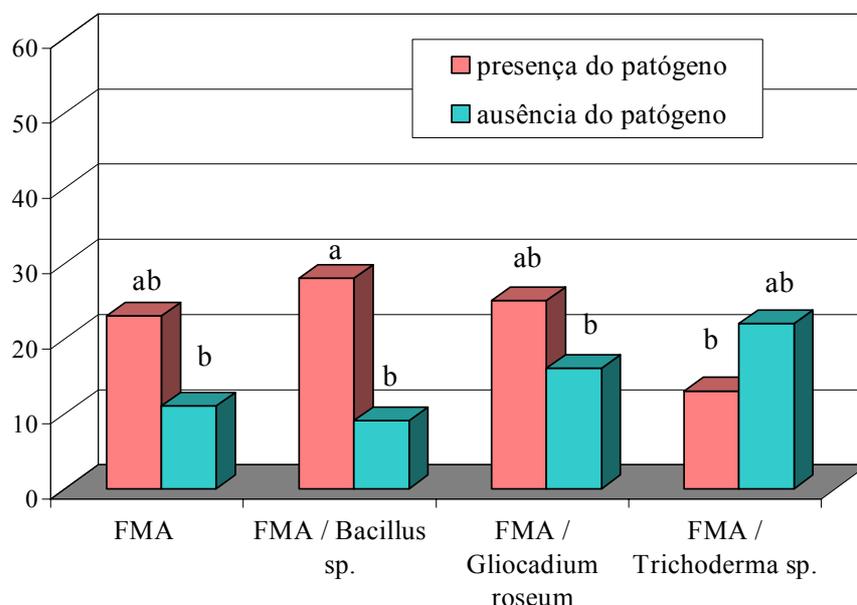
podendo especificamente estimular ou inibir o crescimento de microrganismos na rizosfera das plantas micorrizadas (AZCON-AGUILAR *et al.*, 2002). Os FMAs provocam efeitos diferentes no crescimento dos microrganismos. Através de experimentos *in vitro* um isolado de *Glomus intraradices* alterou o crescimento do *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* (ST-ARNAUD *et al.*, 1995), e estimulou o crescimento do *Trichoderma harzianum* (FILION *et al.*, 1999). Contudo, em experimentos com a presença das raízes, os esporos de *Phytophthora fragariae* foram menos afetados pelo exudatos radiculares de plantas não micorrizadas que pelos exudatos de plantas micorrizadas (NORMAN & HOOKER, 2000). Dessa maneira, os exudatos radiculares das plantas inoculadas com combinações de agentes de controle biológico podem apresentar outra composição química e, conseqüentemente, apresentar diferentes efeitos sobre os microrganismos patogênicos.

A indução de resistência às doenças de plantas pode ser feita através das manipulações da população microbiana naturalmente presente no ambiente. A imunização da planta por microrganismos pode ser um mecanismo de segurança natural, efetivo, persistente, constituindo-se em uma alternativa durável em comparação aos pesticidas, para o controle de doenças de plantas (POZO *et al.*, 2002a).



**Figura 9.** Percentagem de colonização micorrízica, do porta-enxerto Paulsen 1103, 30 dias após a inoculação do patógeno no substrato comercial. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade.

Os antagonistas a patógenos não interferem na colonização micorrízica dos porta-enxertos de videira, como já demonstrado no experimento anterior desta dissertação (Figuras 6 e 7), e por trabalhos de outros autores com várias espécies (CALVET *et al.*, 1992; FILION *et al.*, 1999; GRYNDLER *et al.*, 2002). Portanto, não foram as alterações nos níveis de colonização micorrízica que provocaram o surgimento dos sintomas de fusariose, pois não houve diferenças significativas na percentagem de colonização micorrízica para todos tratamentos micorrizados, na presença do patógeno (Figuras 9 e 10). Contudo, o uso dos antagonistas a patógenos pode não prejudicar a intensidade da associação micorrízica mas sim diminuir a tolerância das plantas ao ataque de patógenos de solo através de mecanismos a serem elucidados. Isso exige trabalhos nos níveis celular e molecular (POZO *et al.*, 2000b).



**Figura 10.** Percentagem de colonização micorrízica do porta-enxerto SO4, 30 dias após a inoculação do patógeno no substrato comercial. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade

Para o porta-enxerto Paulsen 1103, a colonização micorrízica não foi afetada significativamente pela presença do patógeno, em todas as combinações FMAs e antagonistas a patógenos (Figura 9). Os níveis de colonização micorrízica no porta-enxerto SO4 foram significativamente afetados pela presença de *Bacillus* sp. e de *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*. Para os demais tratamentos não houve diferenças

significativas na colonização micorrízica do porta-enxerto SO4 com a inoculação do patógeno, 30 dias após o cultivo no substrato comercial (Figura 10).

A presença do patógeno geralmente não interfere na colonização micorrízica (GUILLEMIN *et al.*, 1994; DECLECKR *et al.*, 2002). Entretanto, condições de estresse, no caso, a presença do patógeno, podem ter provocado o aumento nos níveis de colonização micorrízica (Figura 10), isso ocorreu apenas para combinação de FMA e *Bacillus* sp.. Esses efeitos na colonização micorrízica e no crescimento das plantas podem ter contribuído para a melhoria no estado nutricional das plantas e, conseqüentemente, para o menor índice da doença, dentre as combinações de agentes de controle biológico utilizadas (Figura 8). A combinação de *Bacillus* sp. e *Glomus intraradices* reduziu a podridão radicular em olerícolas, causado por *Fusarium* sp. e *Pythium* sp. (NEMEC *et al.*, 1996). Em outro estudo, o estresse provocado pelo patógeno em bananeiras teve um efeito positivo nos FMAs, com aumento no conteúdo de fósforo foliar e, conseqüentemente, no crescimento das plantas, havendo, ainda a redução nos sintomas da doença (DECLECKR *et al.*, 2002).

Para alguns autores, o controle biológico pode estar diretamente ligado à colonização micorrízica, mas somente altos níveis de colonização micorrízica contribuíram para redução nos sintomas de fusariose em olerícolas (MATSUBARA *et al.*, 2002). Para *Citrus* sp. os níveis baixos de colonização micorrízica corresponderam a redução nos sintomas da doença (NEMEC *et al.*, 1996). Entretanto, DUGASSA *et al.*, (1996) afirmam que a influência da simbiose micorrízica na sanidade das plantas depende mais da planta hospedeira e do genótipo do patógeno do que o nível de colonização micorrízica.

Para os porta-enxertos Paulsen 1103 e SO4, a inoculação dos FMAs e do *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* não afetou significativamente a matéria seca de parte aérea e de raiz. Dessa maneira, os FMAs não conferiram proteção as plantas através da compensação dos danos, em termos de crescimento vegetal (Tabelas 11 e 12). Em bananeiras, os baixos níveis de sintoma da doença estiveram relacionados ao estímulo do crescimento vegetal e ao aumento nos teores de fósforo (DECLERCK *et al.*, 2002). Contudo, existem evidências de que a tolerância das plantas aos patógenos de solo - através da melhoria no estado nutricional das plantas e conseqüentes aumentos na biomassa vegetal - não explica o controle biológico por FMAs. Mecanismos específicos ligados à associação micorrízica provavelmente são responsáveis pela proteção das plantas ao ataque de patógenos de solo (TROTTA *et al.*, 1996).

As combinações dos FMAs com qualquer um dos antagonistas a patógenos não proporcionou aumentos significativos na matéria seca de parte aérea e de raiz dos porta-enxertos, na presença ou na ausência do patógeno (Tabelas 11 e 12). Mesmo que não tenham ocorrido ganhos significativos em biomassa vegetal, a inoculação de *Bacillus* sp. no porta-enxerto SO4 micorrizado reduziu o índice da doença em comparação ao tratamento controle (Figura 8). Muitas rizobactérias não promovem o crescimento ou o desenvolvimento de órgãos das plantas quando em interações com os FMAs (AZCÓN, 1989), podendo mesmo provocar uma redução no crescimento das plantas (ANDRADE *et al.*, 1995). Para *Citrus* sp., a combinação *Glomus intraradices* com *Bacillus* sp. não resultou em ganhos na biomassa vegetal mas houve uma redução nos sintomas da doença (NEMEC *et al.*, 1996). Portanto, menores índices da doença não estão associados com o incremento em crescimento das plantas mas sim aos mecanismos de controle, que são induzidos pela presença dos FMAs ou por determinadas combinações de agentes de controle biológico nas plantas.

**Tabela 11.** Matéria seca de parte aérea (MSA) e de raiz (MSR) do porta-enxerto Paulsen 1103 micorrizado (MIC) e não micorrizado (NM), inoculados com um dos antagonistas *Bacillus* sp., *Gliocadium roseum* ou *Trichoderma* sp., e com *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis* presente ou ausente.

ANTAGONISTAS	FMA	MSA (g planta <sup>-1</sup> )		MSR (g planta <sup>-1</sup> )	
		<i>F. oxysporum</i>		<i>F. oxysporum</i>	
		PRESENTE	AUSENTE	PRESENTE	AUSENTE
CONTROLE	MIC	8,52 a <sup>(1)</sup>	8,74 a	2,40 a	3,47 a
CONTROLE	NM	7,95 ab	8,54 a	2,81 a	2,90 a
<i>Bacillus</i> sp.	MIC	8,60 a	7,95 ab	4,01 a	3,96 a
<i>Bacillus</i> sp.	NM	5,08 c	7,78 ab	1,91 a	2,72 a
<i>Gliocadium roseum</i>	MIC	7,55 ab	6,99 ab	2,79 a	2,68 a
<i>Gliocadium roseum</i>	NM	7,12 ab	7,31 ab	2,42 a	2,83 a
<i>Trichoderma</i> sp.	MIC	8,70 a	8,46 a	3,57 a	3,32 a
<i>Trichoderma</i> sp.	NM	5,88 bc	7,26 ab	2,49 a	2,83 a

<sup>(1)</sup> Valores seguidos da mesma letra em cada coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Newman-Keuls.

A matéria seca de parte aérea do porta-enxerto Paulsen 1103 inoculado com os FMAs e com o *Trichoderma* sp. foi significativamente maior que as das plantas inoculadas apenas com o *Trichoderma* sp., na presença do *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* (Tabela 11). A combinação FMA e *Trichoderma harzianum* tem apresentado efeitos positivos no crescimento das plantas (CALVET *et al.*, 1993).

**Tabela 12.** Matéria seca de parte aérea (MSA) e de raiz (MSR) do porta-enxerto SO4 micorrizado (MIC) e não micorrizado (NM), inoculados com um dos antagonistas *Bacillus* sp., *Gliocadium roseum* ou *Trichoderma* sp., e com *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis* presente ou ausente.

ANTAGONISTAS	FMA	MSA (g planta <sup>-1</sup> )		MSR (g planta <sup>-1</sup> )	
		<i>F. oxysporum</i>		<i>F. oxysporum</i>	
		PRESENTE	AUSENTE	PRESENTE	AUSENTE
CONTROLE	MIC	9,31 ab <sup>(1)</sup>	11,20 a	3,81 a	3,71 a
CONTROLE	NM	10,62 ab	10,28 ab	3,98 a	3,82 a
<i>Bacillus</i> sp.	MIC	11,02 a	10,21 ab	4,27 a	4,08 a
<i>Bacillus</i> sp.	NM	10,61 ab	9,61 ab	5,98 a	4,23 a
<i>Gliocadium roseum</i>	MIC	9,98 ab	9,83 ab	4,15 a	5,26 a
<i>Gliocadium roseum</i>	NM	11,43 a	8,27 b	5,46 a	4,26 a
<i>Trichoderma</i> sp.	MIC	10,01 ab	10,89 a	4,99 a	4,55 a
<i>Trichoderma</i> sp.	NM	10,14 ab	9,31 ab	3,87 a	4,75 a

<sup>(1)</sup> Valores seguidos da mesma letra em cada coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Newman-Keuls.

O porta-enxerto Paulsen 1103 não apresentou, em nenhum tratamento, sintomas de fusariose. No entanto, as plantas inoculadas com o *Trichoderma* sp. e com o *Bacillus* sp. tiveram o peso da matéria seca de parte aérea reduzido na presença do patógeno (Tabela 11). Dessa forma, esses antagonistas a patógenos prejudicaram o crescimento das plantas quando submetidas ao ataque do patógeno. A presença do patógeno no substrato do porta-enxerto Paulsen 1103, inoculado com o *Bacillus* sp., prejudicou significativamente o peso da matéria seca de parte aérea e reduziu em torno de 50% a matéria seca de raiz, embora sem significância estatística. O porta-enxerto Paulsen 1103, resistente à fusariose (SCHUCK *et al.*, 2002) possui, dentre seus mecanismos de resistência, a capacidade de eliminar partes da planta que são infectados com o patógeno. Portanto, partes das raízes com prodriddões causadas pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* podem ter sido

eliminados pelo porta-enxerto, o que provocou a menor massa desse órgão. A visualização desse mecanismo não foi possível, pois no momento da retirada das plantas dos vasos, as raízes danificadas pelo patógeno e/ou eliminadas pela planta possivelmente ficaram retidas no substrato. Além disso, os agentes de controle biológico e os patógenos de solo provocam alterações na fisiologia das plantas (BENHAMOU *et al.*, 1998), embora, para o porta-enxerto resistente à fusariose (Paulsen 1103) tais respostas essas repostas fisiológicas não estejam esclarecidas. Mais uma vez evidenciada a necessidade de estudos celulares e moleculares da resistência

Para o porta-enxerto SO4, as combinações de agentes de controle biológico não afetaram significativamente a matéria seca de parte aérea e de raiz quando inoculados com o patógeno. A inoculação do *Gliocadium roseum* ou do *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* proporcionou peso de matéria seca de parte aérea significativamente maior que somente a inoculação do *Gliocadium roseum* (Tabela 12). Assim como outros patógenos, o *Fusarium oxysporum* pode estimular a produção de determinados hormônios de crescimento nas plantas durante sua infecção e provocar um desbalanço hormonal que, dependendo da cultivar, pode contribuir com a patogenicidade (ARSHAD & FRANKENBERGER Jr., 1998). Portanto, essas plantas podem apresentar maior crescimento em determinado período do experimento, o que explicaria a maior biomassa vegetal nesse tratamento.

Os mecanismos envolvidos no controle biológico por FMAs para explicar a ausência de sintomas de fusariose no porta-enxerto de videira susceptível a doença têm sido estudados por vários trabalhos recentes. No entanto, nos estudos para o uso em conjunto dos antagonistas a patógenos com os FMAs, visando obter maiores níveis de controle da doença, tem-se preocupado apenas com os efeitos dos antagonistas sobre a associação micorrízica. Os efeitos dessas combinações, na maioria dos trabalhos, são neutras ou positivas, contudo podem não ser benéficas quando as plantas são submetidas ao ataque do patógeno, como foi verificado para os porta-enxertos de videira através dos estudos preliminares desta dissertação. Desta forma, são necessárias pesquisas nas áreas moleculares, celulares e de fisiologia vegetal que envolvem a produção de hormônios, o acúmulo de substâncias na parede das células e/ou expressão de genes que regulam a produção de proteínas com atividade antifúngica, além dos mecanismos de resistência sistêmica que podem ser ativados pela presença das combinações de agentes de controle biológico.

## 5 CONCLUSÕES

*Com relação aos substratos para micorrização e sobrevivência dos porta-enxertos:*

- A melhor combinação para produção de biomassa vegetal e taxa de colonização micorrízica para porta-enxerto Paulsen 1103 é o substrato à base de solo, composto termofílico e areia.
- A melhor combinação para produção de biomassa vegetal e taxa de colonização micorrízica para porta-enxerto SO4 é o substrato à base de solo, composto termofílico e vermiculita.
- O substrato comercial usado proporciona aumento na produção de biomassa vegetal, mas está associado a baixa colonização micorrízica nos porta-enxertos testados.
- Os teores altos de matéria orgânica na formulação dos substratos garante maiores índices de sobrevivência dos porta-enxertos na fase de aclimatização.

*Com relação ao acúmulo de fósforo e substância de reserva nos porta-enxertos:*

- Os fungos micorrízicos arbusculares promovem aumento nos teores de fósforo foliar para porta-enxerto Paulsen 1103 cultivado nos substratos à base de solo, composto termofílico e vermiculita, solo e composto termofílico, e no substrato comercial.
- Os fungos micorrízicos arbusculares promovem aumento nos teores de fósforo foliar para porta-enxerto SO4 cultivado nos substratos à base de solo, composto termofílico e areia, solo e composto termofílico, e no substrato solo e vermiculita.
- Os fungos micorrízicos arbusculares não promovem aumentos nas substâncias de reserva para os dois porta-enxertos de videira.

*Para o enraizamento in vitro ou ex vitro na aclimatização:*

- As raízes dos porta-enxertos de videira formadas *in vitro* sobrevivem durante a fase de aclimatização.

- As raízes formadas *in vitro* são necessárias para a sobrevivência dos porta-enxertos micropropagados na fase de aclimatização.

*Para avaliação da compatibilidade entre fungos micorrízicos arbusculares e antagonistas a patógenos:*

- Os antagonistas a patógenos não influenciam nos níveis de colonização micorrízica para os dois porta-enxertos de videira testados.
- A combinação de antagonistas a patógenos e fungos micorrízicos arbusculares não afeta a biomassa vegetal dos porta-enxertos de videira.

*Fungos micorrízicos arbusculares e antagonistas a patógenos no controle de fusariose:*

- Os fungos micorrízicos arbusculares garantiram a ausência dos sintomas de fusariose no porta-enxerto SO4 susceptível a doença, quando inoculados sozinhos.
- A combinação de FMAs / *Bacillus* sp. é mais promissora que de FMAs / *Trichoderma* sp. para o controle biológico de fusariose no porta-enxerto SO4.
- A combinação FMA / *Gliocadium roseum* não apresenta eficiência para o controle de fusariose.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, S. **Fungos micorrízicos arbusculares e o desenvolvimento vegetativo de porta-enxertos de videira**. 2002. 57f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- AHMED, A.S.; SANCHEZ, C.P.; CANDELA, M.E. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using trichoderma harzianum and its relation with capsidiol accumulation. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, 106 (9) : 817 – 824, 2000.
- AMÂNCIO, S.; REBORDÃO, J.P.; CHAVES, M.M. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: Photosynthetic competence and carbon allocation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 58:31-37, 1999.
- ANDRADE, G.; AZCÓM, R.; BETHLENFALVAY, G.J. A rhizobacterium modifies plant and soil responses to the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Applied soil ecology**, Amsterdam, 2 : 195 – 202, 1995.
- ANDRADE, R.E.; SCHUCK, E.; DAL BÓ, M.A. Avaliação da resistência de *Vitis spp* a *Fusarium oxysporum* f. sp *Herbemontis* em condições controladas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 28 (11) : 1287-1290, 1993.
- APTER, R.C.; DAVIES, F.T.; MCWILLIAMS, E.L. *In vitro* and *ex vitro* adventitious root formation in Asian Jasmine (*Trachelospermum asiaticum*) II. Physiological comparisons. **Journal American Society Science**, Alexandria, 118 (6) : 906 – 909, 1993.
- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER Jr, W. T. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Advances In Agronomy**, San Diego, 62 : 45 – 151, 1998.
- AUGÉ, R.M. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, New York, 11 (1) : 3-42 , 2001.

- AZCÓN-AGUILAR, C.; BARCELÓ, A.; VIDAL, M.T.; de la VINÃ, G. Further studies on influence of mycorrhizae on growth and development of micropropagated avocado plants. **Agronomie**, Paris, 12 : 837-840, 1992.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. Applying mycorrhizal biotechnology to horticulture: significance and potentials. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, 68: 1-24, 1997.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. Arbuscular mycorrhizal and biological control of soil-borne plant pathogens - an overview of the mechanisms involved. **Mycorrhiza**, New York, 6 : 457 - 464, 1996.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; SANTOS, M.; TROCOSO, A.; BAREA, J.M. Beneficial effect of arbuscular mycorrhizal on acclimatization of micropropagated cassava plantlets. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, 72 : 63 - 71, 1997.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; JAIZME – VEGA, M.C.; CALVET, C. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil – borne plant pathogens. In: Ed. GIANINAZZI, S.; SCHÜEPP, H.; BAREA, J.M.; HASELWANDTER, K. **Mycorrhizal technology in agriculture**. Birkäuser Verlag, Swizerland, pg. 187-197, 2002.
- AZCÓN, R. Selective interaction between free-living rhizosphere bacteris and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, 21 (5) : 639 – 644, 1989.
- BAREA, J.M.; SLEZACK-DESCHAUMES, S.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S.; AZCÓN-AGUILAR, C. The rhizosphera of mycorrhizal plants mycorrhizal In: Ed. GIANINAZZI, S.; SCHÜEPP, H.; BAREA, J.M.; HASELWANDTER, K. **Mycorrhizal technology in agriculture**. Birkäuser Verlag, Swizerland, pg. 103-112, 2002.
- BAVARESCO, L.; FOGHER, C. Effect of root infection with *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus mosseae* on severity of lime-induced chlorosis in *Vitis vinifera* L. cv. 'Pinot Blanc'. **Journal of Plant Nutrition**, New York, 19 (8-9) : 1319 - 1329, 1996a.
- BAVARESCO, L.; FOGHER, C. Lime-induced chlorosis of grapevine as affected by rootstock and root infection with arbuscular mycorrhizal and *Pseudomonas fluorescens*. **Vitis**, Siebeldingen, 35 (5) : 119 - 123, 1996b.

- BENCHIMOL, R.; YING CHU, E.; YUITO MUTO, R.; DIAS-FILHO, M.B. Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas: sobrevivência e repostas morfofisiológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 35 (7) : 1343 - 1348, 2000.
- BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta**, New York, 204 : 153 – 168, 1998.
- BIASI, L.A. Multiplicação rápida de videiras. **Agropecuária catarinense**, Florianópolis, 13 (2) : 5 - 7, 2000.
- BIRICOLTI, S.; FERRINI, F.; RINALDELLI, E.; TAMANTINI, I.; VIGNOZZI, N. VAM fungi and soil lime content influence rootstock growth and nutrient content **American Journal Of Enology And Viticulture**, Davies, 48 (1): 93 - 99, 1997.
- CALDAS, L.S. **Cultura de tecidos e biotecnologia**. I Simpósio Nacional de Cultura de tecidos. Brasília : EMBRAPA, p190, 1985.
- CALVET, C.; BAREA, J.M.; PÊRA, J. *In vitro* interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and some saprophytic fungi isolated from organic substrates. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, 24 (8) : 775 - 780, 1992.
- CALVET, C.; PERA, J.; BAREA, J.M. Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. **Plant and Soil**, Dordrecht, 148 : 1 – 6, 1993.
- CASSOL, S. **Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares em porta-enxerto de macieira micropropagadas adaptados às condições do Sul do Brasil**. Relatório ao Programa BIP/UFSC, Florianópolis, 1996.
- CLAP, J.P.; RODRIGUES, A.; DODD, C.; Inter- and intra-isolate rRNA large subunit variation in *Glomus coronatum* spores. **New Phytologist**, New York, 149 : 539 – 554, 2001.
- CLARK, R.B.; ZOBEL, R.W.; ZETO, S.K. Effects of mycorrhizal fungus isolates on mineral acquisition by *Panicum virgatum* in acidic soil. **Mycorrhiza**, New York, 9 (3): 167-176, 1999.

- COLOZZI-FILHO, A.; SIQUEIRA, J.O.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; GUIMARÃES, P.T.G.; OLIVEIRA, E. Efetividade de diferentes fungos micorrízicos arbusculares na formação de mudas, crescimento pós-tranplante e produção do cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 29 (9) : 1397 - 1406, 1994.
- CORDIER, C.; POZO, J.M.; BAREA, J.M.; GIANINAZZI S.; GININAZZI-PEARSON, V. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by arbuscular mycorrhizal fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, 11 (10) : 1017 - 1028, 1998.
- COTXARRERA, L.; TRILLAS-GAY, M.I.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress Fusarium wilt of tomato. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, 34 : 467 – 476, 2002.
- DECLERCK, S.; RISEDE, J.M.; RUFYIKIRI, G.; DEVAUX, B. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on several of root rot of bananas caused by *Cylindrocladium spathiphylli*. **Plant Pathology**, Oxford, 51 : 109 – 115, 2002.
- DEHNE, H.W. Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. **Phytopathology**, St Paul, 72 (8) : 1115 – 1119, 1982.
- DODD, J.C. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in agro – and natural ecosystems. **Outlook on Agriculture**, London, 29 (1) : 55 – 62, 2000.
- DUGASSA, G. D.; VONALTEN, H.; SCHONBECK, F. Effects of arbuscular mycorrhiza (AM) on health of *Linum usitatissimum* L infected by fungal pathogen. **Plant and Soil**, Dordrecht, 185 (2) : 173 - 182, 1996.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. **Relatório Técnico anual do centro nacional de pesquisa de uva e vinho de Bento Gonçalves**, Bento Gonçalves, 1986.
- Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A.- EPAGRI. **Informativo – Situação da safra 1999/2000 e Previsão da safra 2000/2001.**, Estação Experimental de Videira, Santa Catarina, 2000.
- ESTAÚN, V.; CALVET, C.; CAMPRUÍ, A.; PINOCHET, J. Long-term effects of nursery start substrate and AAM inoculation of micropropagated peach x almond hybrid rootstock GF 677. **Agronomie**, Paris, 19 : 483 - 489, 1999.

- FILION, M.; St-ARNAUD, M.; FORTIN, J.A. Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. **New phytologist**, New York, 141: 525 - 533, 1999.
- GALLOTTI, G.J. Avaliação da resistência de *Vitis spp* a *Fusarium oxysporum f. sp herbemontis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 16 (1) : 74 - 77, 1991.
- GALLOTTI, G.J.; SCHUCK, E. Ocorrência da Fusariose em porta-enxertos de videira. **Agropecuária catarinense**, Florianópolis, 4 (1) : 47 - 49, 1991.
- GAUR A.; ADHOLEYA, A. Effects of the particle size of soil-less substrates upon AM fungus inoculum production. **Mycorrhiza**, New York, 10 (1) : 43-48, 2000.
- GODEAS, A.; FRACCHIA, S.; MUJICA, M.T.; OCAMPO, J.A. Influence of soil impoverishment on the interaction between *Glomus mosseae* and saprobe fungi **Mycorrhiza**, New York, 9 (4): 185-89, 1999.
- GRAHAM, J.H. What do root pathogens see in mycorrhizas? **New Phytologist**, New York, 149 : 357 - 359, 2001.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. ; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. V. 1. Brasília, EMPRAPA, 183-261p, 1998.
- GREEN, H.; LARSEN,J.; OLSSON, P.A.; JESEN, D.F.; JAKOBSEN, I.; Suppression of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* by mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in root-free soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 1428 – 1434, 1999.
- GRIBAUDO, I.; ZANETTI, R.; MORTE, M.A.; PREVIATI, A.; SCHUBERT, A. Development of mycorrhizal infection *in vitro* and *in vivo*-formed roots of woody fruit plants. **Agronomie**, Paris, 16 : 321-324, 1996.
- GRIBAUDO, I.; MORTE, M.A.; SCHUBERT, A. Use of gentian violet to differentiate *in vitro* and *ex vitro* – formed roots during acclimatization of grapevine. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 41 : 187 - 188, 1995.
- GRICOLETTI Jr., A. **Fusariose da Videira Resistência de Cultivares, sintomas e controle**. EMBRAPA, Circular Técnica nº 18, Bento Gonçalves, 19p, 1993.

GRYNDLER, M.; VOSÁTKA, M.; HRSELOVÁ, H.; CATSKÁ, V.; CHVÁTALOVÁ, I.; JANSA, J. Effects of dual inoculation with arbuscular fungi and bacteria on growth and mineral nutrition of strawberry. **Journal of Plant Nutrition**, New York, 25 (6) : 1341 – 1358, 2002.

GUILLEMIN, J.P.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; MARCHAL, J. Contribution of arbuscular mycorrhizas to biological protection of micropropagated pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) against *Phytophthora cinnamomi* Rands. **Agricultural Science in Finland**, Jokioinen, 3 : 241 - 251, 1994.

HAYMAN, D.S. The physiology of VA endomycorrhizal symbiosis. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, 61 : 944-963, 1983.

HOFFLAND, E.; HAKULINEN, J.; VAN PELT, J.A. Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. **Phytopathology**, St Paul, 86 (7) : 757 – 762, 1996.

HOOKER, J.E.; GIANINAZZI, S.; VESTBERG, M.; BAREA, J.M.; ATKINSON, D. Te applications of arbuscular mycorrhizal fungi to micropropagated systems: an opportunity to reduce inputs. **Agriculture Science Finland**, Jokioinen, 3 : 227-232, 1994.

ICEPA. **Síntese anual de agricultura de Santa Catarina.**, p74-75, Florianópolis, 2000.

ICEPA. **Síntese anual de agricultura de Santa Catarina.**, p87-89, Florianópolis, 2002.

ISUTSA, D.K.; PRITTS, M.P.; MUDGE, K.W. Rapid propagation of blueberry plants using *ex vitro* rooting and controlled acclimatization of micropropagules. **HortScience**, Alexandria, 29 (10) : 1124 - 1126, 1994.

KARAGIANNIDIS N.; NIKOLAOU, N.; MATTHEOU, A Influence Of 3 Va-Mycorrhiza Species On The Growth And Nutrient-Uptake Of 3 Grapevine Rootstocks And One Table Grape Cultivar. **Vitis**, Siebeldingen, 34 (2): 85-89, 1995.

KERBAUY, Gilberto B. Clonagem de Plantas *in vitro* uma realidade. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.1, ano 1, 1997.

KHUN, G. B.; LOVATEL, J.L.; PREZOTTO, O.P.; RIVALDO, O.F. **O cultivo da Videira, informações básicas**, (Circular Técnico nº10). Bento Gonçalves, EMBRAPA/UEPAE, 44p, 1984.

- KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, New York, 92 : 39 - 48, 1989.
- KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B.R. Enviromental control for the large-scale production of plants thourgh *in vitro* tecnhiques. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 51 : 49 - 56, 1997.
- LARANJEIRAS, D. Situação atual do controle biológico de *Fusarium* spp. In: **VII Reunião de controle biológico de fitopatógenos**. Anais. EMBRAPA, Bento Gonçalves, p. 37 – 43, 2001.
- LIMA-DA-SILVA, A.; DOAZAN, J.P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des porte-greffes de vigne *in vitro*. **Journal Inteational des Sciences de la Vigne et du Vin**, Bordeaux, 29 : 1-9, 1995.
- LINDERMANN, R. G. Mycorrhizal interactions with rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. **Phytopathology**, St Paul, 78 (3) : 366 – 371, 1988.
- LINDERMANN, R.G.; DAVIES, A. Comparative response of selected grapevine rootstocks and cultivars to inoculation with different mycorrhizal fungi. **American Journal Enology Viticulture**, DAVIES, 52 : 1, 2001.
- LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S.; Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth- promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, St Paul, 85 (8) : 843 – 846, 1995.
- LOSSO, M.A. **A viticultura catarinense: diagnostico, conclusões e sugestões**, Florianópolis, EPAGRI, 1994.
- LOVATO, P.E.; TROUVELOT, A.; GIANINAZZI-PEARSON,V.; GIANINAZZI, S. Micorrização de Plantas Micropropagadas. In: Siqueira, J.O., **Avanços em Fundamentos e aplicações de micorriza**, Lavras: UFLA/DSC e DCF, 1996.
- MATSUBARA, Y.; HASEGAWA, N.; FUKUI, H. Incidence of *Fusarium* root rot in asparagus seedlings infected with arbusuclar mycorrhizal fungus as affected by several soil amendments. **Journal Japan Society Horticulture Science**, Kyoto, 71 (3) : 370 – 374, 2002.

- MCALLISTER, C.B.; GARCÍA-ROMERA, I.; GODEAS, A.; OCAMPO, J.A. Interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: effects on plant growth, arbuscular mycorrhizas and the saprophyte inoculants. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, 26 (10) : 1363 – 1367, 1994 a.
- MCALLISTER, C.B.; GARCÍA-ROMERA, I.; GODEAS, A.; OCAMPO, J.A. *In vitro* interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, 26 (10) : 1369 – 1374, 1994 b.
- MCCLELLAND, M.T.; SMITH, M.A.L.; CAROTHERS, Z.B. The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. **Plant, Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 23 : 115 – 123, 1990.
- MELO, I.S. Potencialidade de utilização de *Trichoderma* spp. No controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA: CNPDA, 135 – 153, 1991.
- MELO, L.M.R. **Mercado Brasileiro de uvas e vinhos**. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPUV, Instrução Técnica nº 001, p.1- 3, 2000
- MOTOSUGI, H.; YAMAMOTO, Y.; NARUO, T.; KITABAYASHI, H.; ISHII, T. Comparison of the growth and leaf mineral concentrations between three grapevine rootstocks and their corresponding tetraploids inoculated with an arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **Vitis**, Siebeldingen, 41 (1): 21-25, 2002.
- NEMEC, S.; DATNOFF, L.E.; STRANDBERG, J. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. **Crop Protection**, Oxford, 15 (8) : 735 – 742, 1996.
- NORMAN, J.R.; ATKINSON, D.; HOOKER, J.E. Arbuscular mycorrhizal fungal – induced alteration to architecture in strawberry and induced resistance to the root pathogen *Phytophthora fragariae*. **Plant and Soil**, Dordrecht, 185 : 192 – 198, 1996.
- NORMAN, J.R.; HOOKER, J.E. Sporulation of *Phytophthora fragariae* shows greater stimulation by exudates of non-mycorrhizal than by mycorrhizal strawberry roots. **Mycological Research**, New York, 104 : 1069 - 1073, 2000.
- PINOCHET, J.; CAMPRUBÍ, A.; CALVET, C.; FERNÁNDEZ, C.; KÁBANA, R.R. Inducing tolerance to the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* by early

- mycorrhizal inoculation of micropropagated myrobalan 29 C Plum rootstock. **Journal American Society Horticulture Science**, Alexandria, 123 (3) : 342 - 347, 1998.
- POUYÚ-ROJAS, E.; SIQUEIRA, J.O. Micorriza arbuscular e fertilização do solo no desenvolvimento pós-transplante de mudas de sete espécies de florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 35 (1) : 103 - 114, 2000.
- POZO, M.J.; CORDIER, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S.; BAREA, J. M.; AZCÓN-AGUILAR, C. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses to *Phyththofora* infection in tomato plants. **Journal Experimental Botany**, Oxford, 53(368) : 525-534, 2002a.
- POZO, M.J.; SLEZACK-DESCHAUMES, S.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S.; AZCÓN-AGUILAR, C. Plant defense responses induced by arbuscular mycorrhizal fungi. In: Ed. GIANINAZZI, S.; SCHÜEPP, H.; BAREA, J.M.; HASELWANDTER, K. **Mycorrhizal technology in agriculture**. Birkäuser Verlag, Swizerland, pg. 103-112, 2002b.
- RAVOLANIRINA, F.; GIANINAZZI, S.; TROUVELOT, A.; CARRE, M. Production of endomycorrhizal explants of micropropagated grapevine rootstocks. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, 29 : 323 - 327, 1989.
- RESH, H.M. **Cultivos hidropônicos: nuevas técnicas de producción**. 4. Ed. Madrid: Mundi/Prensa Libros, 509p, 1997.
- ROSIER, J.C.; LOSSO, M.A. **Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: Viticultura**. EPAGRI, Boletim Técnico nº83, Florianópolis, 41p, 1997.
- ROUSSEAU, A.; BENHAMOU, N.; CHET, I.; PICHÉ, Y. Mycoparasitism of the extrametrical phase of *Glomus intraradices* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, St Paul, 86 (5) : 434 - 443, 1996.
- SAIF, S.R. The influence of soil aeration on the efficiency of vesicular-arbuscular mycorrhizas. Effect of soil oxygen on the growth and mineral uptake of *Eupatorium odoratum* L. inoculated with *Glomus macrocarpus*. **New Phytologist**, New York, 88 : 649 - 659, 1981.
- SAGGIN JÚNIOR, O.J.; LOVATO, P.E. Aplicação de micorrizas arbusculares na produção de mudas e plantas micropropagadas. In: SIQUEIRA, J.O., MOREIRA,

F.M.S., LOPES, A.S. GUILHERME, L.R.L., FAQUIM, V. **Inter-relação fertilidade, Biologia do Solo e nutrição de Plantas**, Viçosa: SBSC UFLA/DCS, 1999.

SAINT-ARNAUD, M.; HAMEL, C.; VIMARD, B.; CARON, M.; FORTIN, J.A. Altered growth of *Fusarium oxysporum f. sp. chrysanthmi* in an *in vitro* dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing on *Daucus carota* transformed roots. **Mycorrhiza**, New York, 5 : 431 - 438, 1995.

SCHELLENBAUM, L.; BERTA, G.; RAVOLANIRINA, F.; TISSERANT, B.; GIANINAZZI, S. ; FITTER, A. H. Influence of endomycorrhizal infection on root morphology in a micropropagated woody plant species (*Vitis vinifera* L.). **Annals of Botany**, London, 68 : 135 - 141, 1991.

SCHUCK, E.; DAL BÓ, M.A.; ANDRADE, E.R. **Avaliação de cultivares para o Estado de Santa Catarina 2002/2003**. EPAGRI. Boletim Técnico nº 119 Florianópolis, 147-149p, 2002.

SCHUCK, E.; ROSIER, J.P.; DOAZAN, J.P.; DUCROQUET, J.H.J. Cultivar de videira EPAGRI 401- Villenave. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, 12 (1) : 17 - 21, 1999.

SCHUBERT, A.; LUBRACO, G. Mycorrhizal inoculation enhances growth and nutrient uptake of micropropagated apple rootstocks during weaning in commercial substrates of high nutrient availability. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, 15 (2) : 113 - 118, 2000.

SCHUBERT, A; CAMMARATA, S.; EYNARD, I. Growth And Root Colonization Of Grapevines Inoculated With Different Mycorrhizal Endophytes. **Hortscience**, Alexandria, 23 (2): 302-303, 1988.

SCHUBERT, A; MAZZITELI, M.; ARIUSSO, O.; EYNARD, I. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on micropropagated grapevine: Influence of endophyte strain, P fertilization and growth medium. **Vitis**, Siebeldingen, 29 : 5-13, 1990.

SILVEIRA, A.P.D. Ecologia de Fungos Micorrízicos Arbusculares. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. ed. **Ecologia Microbiana**. EMBRAPA:CNPMA, Jaguariuna, 61-86p, 1998.

SILVEIRA, S.V.; SOUZA, P.V.D.; KOLLER, O.C. Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o desenvolvimento vegetativo de porta-enxerto de abacateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 37 (3): 303 – 309, 2002.

SIQUEIRA, J.O.; SAGGIN JUNIOR, J.O. The importance of mycorrhizae association in natural low-fertility soils. In: MACHADO, A.T.; MAGNAVACA, R.; PANDEY, S.; SILVA, A.F. eds. **Proceedings of Internatioanl Sympossim on Environmental Stree: Maize in perspective**, Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS; México: CIMMY/UNDP, p 239-280, 1995.

SIMON, L.; BOUSQUET, J.; LÉVESQUE, R.C.; LALONDE, M. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. **Nature**, London, 363 : 67 - 69, 1993.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal Symbiosis**, Academic Press: Cambrige, 2 ed. 589p, 1997.

SOUSA, S.I.J. **Uvas para o Brasil.**, Piracicaba : FEALQ, 791p, 1996.

SONEGO, O.R. **Avaliação de porta-enxertos de videira frente à fusariose, em condições de campo.** EMBRAPA. Comunicado Técnico.nº28, Bento Gonçalves, 4p., 1998.

STADNIK, M.J.; DHINGRA, O.D. Root infection by *Fusarium oxysporum* f sp *cepae* at different growth stages and its relation to the development of onion basal rot. **Phytopathologia mediterranea**, Bologna, 36 : 8 –11, 1997.

STEEL, R.G.; TORRIE, J.H. **Principles and Procedures of Statistics.** New York, McGraw-Hill, 663p., 1980.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews In Plant Sciences**, Boca Raton, 19 (1) : 1-30, 2000.

SUBHAN, S.; SHARMILA, P.; SARADHI, P.P. *Glomus fasciculatum* alleviates transplantation shock of micropropagated *Sesbania sesban*. **Plant Cell Reports**, New York, 17 : (4) 268 - 272, 1998.

- SYLVIA, D. M.; CHELLEMI, D.O. Interactions among root-inhabiting fungi and their implications for biological control of root pathogens. **Advances in Agronomy**, San Diego, 73 : 1 - 33, 2002.
- TENNANT, D. A test of a modified line intersect method of estimating root length. **Journal of Ecology**, Oxford, 63 : 995 - 1004, 1975.
- THOMAS, P.; RAVINDRA, M.B. Effects of pruning or removal of *in vitro* formed roots on *ex vitro* root regeneration and growth in micropropagated grapes. **Plant cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 51 : 177 - 180, 1997.
- TOMAZI, A.; COSTA, M.D.; LOVATO, P.E.; DALSOGLIA, F.K. Fungos e bactérias com efeito antagônico *in vitro* a *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröot. E *Fusarium oxysporum* Schf. Sp *hebermontis* In: **VII REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS**, Caxambu FertBio 98, Resumos, Caxambu, MG Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 115-115, 1998.
- TROTTA, A.; VARESE, G.C.; GNAVI, E.; FUSCONI, A.; SAMPÓ, S.; BERTA, G. Interactions between the soilborne root pathogen *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus moseae* in tomato plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, 185 : 199 – 209, 1996.
- TROUVELOT, A.; KOUGH, J.L.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire, Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: **Mycorrhizes: physiologie et génétique**. 1<sup>st</sup> ESM/ 1<sup>er</sup> SEM, Dijon, 1-5 July 1985 – INRA, Paris, p217-220, 1986.
- UOSUKAINEN, M.; VESTBERG, M. Effect Of Inoculation With Arbuscular Mycorrhizas On Rooting, Weaning And Subsequent Growth Of Micropropagated Malus (L) Moench. **Agricultural Science In Finland**, Joikoinen, 3 (3): 269-279, 1994.
- UTKHEDE, R.S. Biological control of soilborne pathogens of fruit trees and grapevines. **Canadian journal of Plant Pathology**, Guelph, 14 : 100 - 105, 1992.
- VARNA, A.; SCHÜEPP, H. Infectivity and effectiveness of *Glomus intraradices* on micropropagated plants. **Mycorrhiza**, New York, 5 : 29 - 37, 1994.
- VARNA, A.; SCHÜEPP, H. Mycorrhization of the commercially important micropropagated plants. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton 15 (3-4): 313 - 328, 1995.

- VESTBERG, M. The effect of growth substrate and fertilizer on the growth and vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of three hosts. **Agricultural Science in Finland**, Jokioinen, 1 : 95-105, 1992.
- VESTBERG, M.; ESTAÚN V. Micropropagated plants, an opportunity to positively manage mycorrhizal activities. In: GIANINAZZI, S.; SHÜEPP, H. **Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems**, Boston, Berlin. p.217 - 226, 1997.
- VIDAL, M. T.; AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M.; PLIEGO-ALFARO, F. Mycorrhizal inoculation enhances growth and development of micropropagated plants of avocado. **HortScience**, Amsterdam, 27(7) : 785-787, 1992.
- VOSÁTKA, M.; DODD, J.C. Ecological considerations for successful application of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum. In: Ed. GIANINAZZI, S.; SCHÜEPP, H.; BAREA, J.M.; HASELWANDTER, K. **Mycorrhizal technology in agriculture**. Birkhäuser Verlag, Switzerland, pg. 103-112, 2002.
- YAO, M.K.; TWEDDELL, R.J.; DÉSILETS, H.; Effects of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of micropropagated potato plantlets and on the extent of disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Mycorrhiza**, New York, 12 (5) : 235 – 242, 2002.
- ZAMBOLIN, L.; SCHENCK, N.C. Reduction of the effects of pathogenic, root-infecting fungi on soybean by the mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*. **Phytopathology**, St Paul, 73(10) : 1402 - 1405, 1983.
- WANG, H; PARENT,S; GOSSELIN, A.; DESJARDINS, Y.; Vesicular-arbuscular mycorrhizal peat-based substrates enhance symbiosis establishment and growth of three micropropagated species. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, 118 (6) : 896 - 901, 1993.
- WASCHKIES, C.; SCHROPP, A.; MARSCHNER, H. Relations between grapevine replant disease and root colonization of grapevine (*Vitis* sp) by fluorescent pseudomonads and endomycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, 162 : 219-227, 1994.
- WYSS, P.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Testing the effect of biological control agents on the formation of vesicular arbuscular mycorrhiza. **Plant and Soil**, Dordrecht, 147 : 159 – 162, 1992.