

Daniel José Rosa

**EFICIÊNCIA E ESTABILIZAÇÃO DE FUNGOS  
MICORRÍZICOS PRÉ-INOCULADOS EM PORTA-ENXERTOS  
DE VIDEIRA NO CULTIVO EM CASA DE VEGETAÇÃO E A  
CAMPO, COM E SEM TOXICIDADE POR COBRE**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof. Dra. Rosete Pescador.

Co orientador: Prof. Dr. Cláudio R.F.S. Soares.

Florianópolis  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rosa, Daniel

Eficiência e estabilização de fungos micorrízicos pré-inoculados em porta-enxertos de videira no cultivo em casa de vegetação e a campo, com e sem toxicidade por cobre / Daniel Rosa ; orientadora, Rosete Pescador, coorientador, Cláudio Soares, 2019. 102 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Calagem e inoculação de *Rhizophagus clarus* em porta-enxertos de videira "Paulsen 1103" para amenização da toxicidade por cobre. 3. Desempenho e estabilização de inoculante micorrízico comercial na viticultura. I. Pescador, Rosete. II. Soares, Cláudio. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

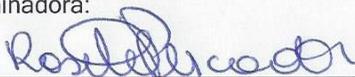
# Eficiência e estabilização de fungos micorrízicos pré-inoculados em porta-enxertos de videira no cultivo em casa de vegetação e a campo, com e sem toxicidade por cobre

por

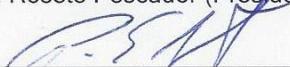
**Daniel José Rosa**

Tese julgada e aprovada em 29/03/2019, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

Banca Examinadora:



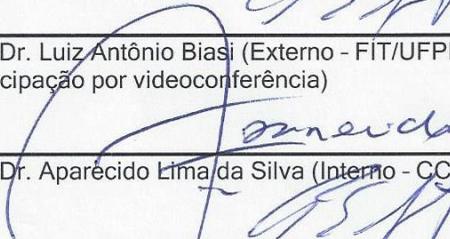
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosete Pescador (Presidente - CCA/UFSC)



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hilda Soriani (Externo - UFSM/RS)  
(Participação por videoconferência)



Prof. Dr. Luiz Antônio Biasi (Externo - FIT/UFPR)  
(Participação por videoconferência)



Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva (Interno - CCA/UFSC)

Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, março de 2019



Este trabalho é dedicado aos meus pais,  
Walmor José Rosa e Marlene Rosa, e  
ao meu irmão Solismar José Rosa.



## **AGRADECIMENTOS**

A construção desta tese não seria possível sem a contribuição de inúmeras pessoas e instituições.

Agradeço aos meus pais, Walmor e Marlene, e ao meu irmão Solismar pelo apoio incondicional durante toda esta trajetória.

À Andréia Diesel, pelo companheirismo, pela compreensão da ausência, da distância e pelo apoio durante estes anos.

À minha orientadora Rosete Pescador, pela oportunidade de orientação, receptividade, atenção e compreensão durante todo este trabalho.

À chefe de expediente da secretaria do RGV, Bernadete Ribas, pela competência, prontidão e dedicação em auxiliar nos processos burocráticos.

Ao professor Gustavo Brunetto pela contribuição intelectual e financeira no desenvolvimento dos estudos.

Ao meu co orientador, Cláudio Soares, pela contribuição intelectual no planejamento do estudo 1, disponibilização de infraestrutura e competência em seu trabalho.

À minha supervisora durante o intercâmbio, Miranda Hart, pela oportunidade, receptividade, ensinamentos e motivação.

Ao centro de pesquisa Agriculture and Agri-food Canada's Summerland Research and Development Centre, pelo uso da infraestrutura, e à pesquisadora Pat Bowen pela receptividade, ensinamentos e motivação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) pela oportunidade de ingressar no curso e por participar de minha formação acadêmica.

À The University of British Columbia-UBC, pelas oportunidades e pelo uso da infraestrutura.

À Global Affairs Canada pelo financiamento do estudo 2 e pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado, fundamental para minha manutenção financeira e realização deste trabalho.

Agradeço a todos os colegas de laboratório e amigos que foram fundamentais para o desenvolvimento das atividades e apoio emocional.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho.

## RESUMO

Nesta tese são apresentados dois experimentos desenvolvidos na cultura da videira, sendo o experimento 1 desenvolvido na Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, em Florianópolis; e o experimento 2, desenvolvido na The University of British Columbia – UBC, em Kelowna-BC no Canadá. No experimento 1 o problema de pesquisa estudado foi o elevado conteúdo de Cu. Os solos de vinhedos antigos, na região sul do Brasil, possuem altos conteúdos de cobre (Cu) derivados de aplicações de fungicidas cúpricos foliares que causam toxicidade às videiras jovens, dificultando o estabelecimento do vinhedo. A aplicação de calagem e a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são estratégias potenciais para diminuir a toxicidade de Cu às videiras jovens. O experimento 1 objetivou avaliar os efeitos da interação entre a calagem e a inoculação de FMA (*Rhizophagus clarus*) no crescimento, colonização das raízes, parâmetros fotossintéticos e atividade de enzimas antioxidantes em videiras jovens cultivadas em substrato com elevado conteúdo de Cu. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, utilizando-se substrato coletado em campo natural, com e sem adição de 3 Mg ha<sup>-1</sup> de calcário e artificialmente contaminado pela adição de 0, 50, 100 e 150 mg kg<sup>-1</sup> de Cu. No momento do transplante das videiras foi aplicado o tratamento de FMA, sendo com e sem inoculação de *Rhizophagus clarus*. As videiras foram avaliadas quanto aos parâmetros fotossintéticos, parâmetros morfológicos, atividade de eximas antioxidantes e colonização micorrízica. A calagem e a inoculação de FMA apresentaram grande potencial na diminuição dos efeitos tóxicos do elevado teor de Cu no substrato, contribuindo na melhoria do crescimento, produção de biomassa, diminuição da atividade das enzimas antioxidantes e aumento da colonização micorrízica das raízes. Por outro lado, o aumento das concentrações de Cu teve grande potencial tóxico e reduziu em 70% a colonização das raízes pelos FMAs, em 43% a altura de planta e 17% na produção de matéria seca. A inoculação de FMA resultou em um acréscimo 30% na produção de matéria seca de parte aérea, e um decréscimo de 51% na atividade da enzima ascorbato peroxidase e 26% na atividade da enzima guaiacol peroxidase. A combinação de calagem com a inoculação de FMA são estratégias eficazes na amenização da toxicidade por Cu para o porta-enxerto Paulsem 1103. No experimento 2, foi estudada a eficiência da aplicação de inoculante comercial contendo FMA em videiras, para a melhoria da eficiência no uso da nutrição. O fósforo é um nutriente crítico e insubstituível na

nutrição das plantas, portanto, a disponibilidade deste nutriente pode limitar o crescimento e a produção das plantas em algumas circunstâncias. Uma estratégia potencial para aumentar a eficiência no uso do fósforo é a inoculação das raízes das videiras com FMA, assim, essa simbiose pode fornecer uma porcentagem significativa dos requisitos de fósforo de uma planta, bem como potencialmente acessar o fósforo que o hospedeiro não pode alcançar. Para isso são amplamente utilizados inoculantes contendo FMA. No entanto, o benefício dos inoculantes no campo é muitas vezes variável e, em alguns casos, o seu uso pode introduzir estirpes que não são benéficas para o sistema, resultando potencialmente em uma invasão por fungos micorrízicos exóticos. Ainda há muitas dúvidas sobre sua eficácia, estabilização da comunidade fúngica e espalhamento para outras áreas e culturas. O experimento objetivou avaliar o desempenho, estabilização e espalhamento do inoculante comercial de fungos micorrízicos MYKE® PRO GR que contém *Rhizoglonus irregulare* (DAOM 197198) na cultura da videira, desde a produção das mudas em casa de vegetação até o cultivo à campo. A inoculação de FMA aumentou a produção de matéria seca em 24% e área foliar em 13%, dos porta-enxertos em casa de vegetação, mas não teve efeito a campo. A comunidade de FMA inoculada se estabilizou no campo e houve espalhamento para plantas não inoculadas. A pré-inoculação das videiras com FMA não se mostrou vantajosa em condições reais de vinhedos.

**Palavras-chave:** Metal pesado; colonização micorrízica; DAOM 197198; ddPCR; *Vitis*; inoculante; *Rhizoglonus irregulare*; *Rhizophagus clarus*.

## ABSTRACT

In this thesis are presented two experiments developed in the grape crop, being the experiment 1 developed at the Federal University of Santa Catarina - UFSC, Florianópolis; and experiment 2, developed at The University of British Columbia - UBC, in Kelowna-BC, Canada. In experiment 1, the studied research problem was the high content of Cu in the soil. The soils of ancient vineyards in southern Brazil have high copper contents (Cu) derived from foliar fungicide applications that cause toxicity to young vines, making it difficult to establish the vineyard. The application of liming and the inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are potential strategies to reduce the toxicity of Cu to young vines. This study aimed to evaluate the effects of the interaction between liming and AMF inoculation (*Rhizophagus clarus*) on growth, root colonization, photosynthetic parameters and antioxidant enzyme activity in young vines cultivated in the substrate with high Cu content. The experiment was conducted in a greenhouse, using substrate collected in the natural field, with and without the addition of 3 Mg ha<sup>-1</sup> of limestone and artificially contaminated by the addition of 0, 50, 100 and 150 mg kg<sup>-1</sup> of Cu. At the moment of transplanting of the vines, the treatment of FMA was applied, being with and without inoculation of *Rhizophagus clarus*. Vines were evaluated for photosynthetic parameters, morphological parameters, antioxidant activity and mycorrhizal colonization. The liming and inoculation of AMF showed great potential in reducing the toxic effects of the high Cu content in the substrate, contributing to the improvement of growth, biomass production, reduction of antioxidant enzymes activity and increased mycorrhizal colonization of the roots. On the other hand, the increase in concentrations of Cu had high toxic potential and reduced root colonization by AMF by 70%, plant height by 43% and dry matter by 17%. The inoculation of AMF resulted in a 30% increase in shoot dry matter production, and a decrease of 51% in the activity of the enzyme ascorbate peroxidase (APX) and 26% in the activity of the enzyme guaiacol peroxidase (POD). The combination of liming and FMA inoculation are effective strategies for the mitigation of Cu toxicity to the 'Paulsen 1103' rootstock. In experiment 2, the efficiency of the application of commercial AMF-containing inoculant in vines was studied to improve efficiency in the use of nutrition. Phosphorus is a critical and irreplaceable nutrient in plant nutrition, so the availability of this nutrient may limit plant growth and production in some circumstances. A potential strategy to increase phosphorus efficiency is the inoculation of vines roots with AMF, thus this symbiosis can provide

a significant percentage of the phosphorus requirements of a plant as well as potentially access phosphorus that the host cannot reach. AMF-containing inoculants are widely used for this purpose. However, the benefit of inoculants in the field is often variable, and in some cases their use may introduce strains that are not beneficial to the system, potentially resulting in an invasion by exotic mycorrhizal fungi. There are still many doubts about its effectiveness, stabilization of the fungal community and spreading to other areas and cultures. The objective of this experiment was to evaluate the performance, stabilization and scattering of the commercial inoculant of MYKE ® PRO GR containing *Rhizoglonus irregulare* (DAOM 197198) on grapevine production, from greenhouse seedlings production to field cultivation. AMF inoculation increased dry matter yield by 24% and leaf area by 13%, from rootstocks in the greenhouse, but had no field effect. The inoculated AMF community stabilized in the field and spread to uninoculated plants. Pre-inoculation of vines with AMF did not prove to be advantageous under real vineyard conditions.

**Keywords:** Heavy metal; mycorrhizal colonization; DAOM 197198; ddPCR; *Vitis*; inoculant; *Rhizoglonus irregulare*; *Rhizophagus clarus*.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1.

- Figura 1.** Colonização micorrízica das raízes (%) - interação dos conteúdos de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) com a inoculação de *Rhizophagus clarus*, em raízes do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu. .... 46
- Figura 2.** Altura de plantas (cm) - interação dos conteúdos de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) com a calagem, em porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu..... 47
- Figura 3.** Matéria seca de parte aérea (g) – interação entre inoculação de FMA e calagem (a), interação entre os conteúdos de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) e calagem (b), em porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu..... 49
- Figura 4.** Número de folhas (n) – efeito da calagem (a), efeito do conteúdo de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) (b), em porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu. .... 50
- Figura 5.** Número de nós (n) – efeito da calagem (a), efeito do conteúdo de cobre ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) (b), em porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu. .... 51
- Figura 6.** Conteúdo de clorofila total ( $\text{mg g MF}^{-1}$ ) – interação entre inoculação de FMA e calagem (a), interação entre o conteúdo de Cu e calagem (b), em folhas do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu. .... 53
- Figura 7.** Conteúdo de carotenoides totais ( $\text{mg g MF}^{-1}$ ) - interação entre o conteúdo de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) e a inoculação de FMA (a), interação entre o conteúdo de Cu e a calagem (b), em folhas do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu. .... 55

<b>Figura 8.</b> Assimilação de CO <sub>2</sub> (μmol m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ) - interação entre o conteúdo de Cu (mg kg <sup>-1</sup> ) e calagem, em folhas do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu. ....	57
<b>Figura 9.</b> Condutância estomática (mmol m <sup>2</sup> s <sup>-2</sup> ) - interação entre o conteúdo de Cu (mg kg <sup>-1</sup> ) e inoculação de FMA, em folhas do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu. ....	58
<b>Figura 10.</b> Transpiração (mmol m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ) - interação entre o conteúdo de Cu (mg kg <sup>-1</sup> ) e inoculação de FMA (a), interação entre o conteúdo de Cu e calagem (b), em folhas do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu. ....	59
<b>Figura 11.</b> Potencial quântico máximo - interação entre inoculação de FMA e calagem, em folhas do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu. ....	61
<b>Figura 12.</b> Atividade de APX (U mg de proteína <sup>-1</sup> ) - interação entre inoculação de FMA e calagem (a), interação entre o conteúdo de Cu e inoculação de FMA (b), interação entre o conteúdo de Cu e calagem (c), em raízes do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu. ....	62
<b>Figura 13.</b> Atividade de POD (DO de proteína <sup>-1</sup> ) – efeito da inoculação de FMA, em raízes do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu. ....	63
<b>Figura 14.</b> Atividade de SOD (U ml mg de proteína <sup>-1</sup> ) – interação entre o conteúdo de Cu e calagem, em raízes do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu. ....	64

## Capítulo 2.

<b>Figura 1.</b> Matéria seca de parte aérea (g), em porta-enxertos de videira pré-inoculados com FMA no cultivo em casa de vegetação e posterior cultivo a campo por dois anos. ....	83
<b>Figura 2.</b> Matéria seca de parte aérea (g), em porta-enxertos de videira pré-inoculados com FMA e cultivados em casa de vegetação. ....	84
<b>Figura 3.</b> Área foliar (mm <sup>2</sup> ) em porta-enxertos de videira pré-inoculados com FMA e cultivados em casa de vegetação.....	85
<b>Figura 4.</b> Cópias de DNA (log(x)) do <i>Rhizoglyphus irregularis</i> (DAOM 197198), FMA pré-inoculado em porta-enxertos de videira encontrados nas raízes no segundo ano de cultivo a campo. ....	86
<b>Figura 5.</b> Cópias de DNA (log(x)) do FMA pré-inoculado em porta-enxertos de videira encontrados em cada uma das dez amostras extraídas de cada sistema radicular (uma planta) no terceiro ano de cultivo a campo. Cada ponto representa a quantidade de cópias de DNA encontradas em cada extração. ....	87
<b>Figura 6.</b> Resposta de FMA para: matéria seca de parte aérea em casa de vegetação (a); matéria seca de parte aérea no primeiro ano de cultivo a campo (b); matéria seca de parte aérea no segundo ano de cultivo a campo (c); matéria seca de raízes no segundo ano de cultivo a campo (d).....	89
<b>Suplementar 1.</b> Número de folhas (n) em porta-enxertos de videira pré-inoculados com FMA e cultivados em casa de vegetação.....	96
<b>Suplementar 2.</b> Matéria seca de parte aérea (g) em porta-enxertos de videira pré-inoculados com FMA e cultivados por um ano a campo. ....	97
<b>Suplementar 3.</b> Matéria seca de parte aérea (g) em porta-enxertos de videira pré-inoculados com FMA e cultivados por dois anos a campo. ....	98
<b>Suplementar 4.</b> Matéria seca de raízes (g) em porta-enxertos de videira pré-inoculados com FMA e cultivados por dois anos a campo. ....	99



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Caracterização química e física do substrato antes da implantação do experimento (Ferreira et al., 2015). .....	41
<b>Tabela 2.</b> Conteúdo de fósforo (P), potássio (K), cobre (Cu) e zinco (Zn), no substrato ao final do experimento. ....	41



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$  – Micrograma  
ATP – Adenosina trifosfato  
APX – Ascorbato peroxidase  
Ca – Cálcio  
CAT - Catalase  
cm – Centímetro  
 $\text{cm}^2$  - Centímetro quadrado  
 $\text{CO}_2$  – Gás carbônico  
CTC – Capacidade de troca de cátions  
Cu – Cobre  
ddPRC – Análise de PCR digital por gotas (Droplet digital polymerase chain reaction)  
DMSO – ácido etilenodiamino tetra-acético  
ERO – Espécie reativa a oxigênio  
FMA – Fungo Micorrízico Arbuscular  
g – grama  
ha – Hectare  
IRGA – Infrared Gaz Analyzer (analisador de gases por infravermelho)  
K – Potássio  
kg – Quilograma  
MF – Massa fresca  
Mg – Megagrama  
mg – Miligrama  
mL – Mililitro  
mm – Milímetro  
MS – Matéria seca  
N – Nitrogênio  
 $\text{O}_2$  – Oxigênio  
 $\text{OH}^-$  - Hidroxila  
P – Fósforo  
ppm – Parte por milhão  
PRNT – Poder reativo de neutralização total  
POD – Peroxidase  
S – Enxofre  
s – Segundo  
SOD – Superóxido dismutase  
Zn – Zinco



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	23
REFERÊNCIAS .....	27
OBJETIVOS .....	31
<b>Objetivo geral</b> .....	31
<b>Objetivos específicos</b> .....	31
CAPÍTULO 1 .....	33
CALAGEM E INOCULAÇÃO DE <i>RHIZOPHAGUS CLARUS</i> EM VIDEIRAS PARA AMENIZAÇÃO DA TOXICIDADE POR COBRE. .....	35
RESUMO .....	35
ABSTRACT .....	36
INTRODUÇÃO .....	37
MATERIAL E MÉTODOS .....	38
<b>Material vegetal e condução experimental</b> .....	38
<b>Coleta e preparo do substrato</b> .....	39
<b>Coleta do material vegetal</b> .....	43
<b>Colonização micorrízica total</b> .....	43
<b>Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a</b> .....	43
<b>Quantificação de pigmentos fotossintéticos</b> .....	44
<b>Extração de enzimas e determinação da atividade enzimática de APX (E.C. 1.11.1.11), CAT (E.C. 1.11.1.6), POD (E.C. 1.11.1.7), SOD (E.C. 1.15.1.1)</b> .....	44
<b>Análises estatísticas</b> .....	45
RESULTADOS .....	46
<b>Colonização micorrízica das raízes</b> .....	46
<b>Parâmetros morfológicos</b> .....	47
<b>Pigmentos fotossintéticos</b> .....	52
<b>Parâmetros de trocas gasosas</b> .....	56
<b>Parâmetros fotoquímicos</b> .....	60
<b>Atividade das enzimas antioxidantes: APX (E.C. 1.11.1.11), CAT (E.C. 1.11.1.6), POD (E.C. 1.11.1.7), SOD (E.C. 1.15.1.1)</b> .....	61

DISCUSSÃO .....	64
CONCLUSÃO .....	67
REFERÊNCIAS.....	68
CAPÍTULO 2.....	75
DESEMPENHO E ESTABILIZAÇÃO DE INOCULANTE MICORRÍZICO COMERCIAL NA VITICULTURA .....	77
RESUMO.....	77
ABSTRACT.....	77
INTRODUÇÃO .....	78
MATERIAL E MÉTODOS .....	80
<b>Biomassa, número de folhas e área foliar</b> .....	81
<b>Extração de DNA</b> .....	81
<b>Análise de PCR digital de gotas (ddPCR)</b> .....	82
<b>Métodos estatísticos</b> .....	82
RESULTADOS.....	82
<b>Produção de biomassa e área foliar</b> .....	82
<b>Estabilização da comunidade de FMA pré-inoculada</b> .....	86
<b>Variabilidade amostral na extração de DNA</b> .....	87
<b>Resposta de FMA no crescimento das videiras</b> .....	88
DISCUSSÃO .....	90
CONCLUSÃO .....	92
REFERÊNCIAS.....	92
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	96
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	101

## INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A viticultura possui grande importância socioeconômica em âmbito mundial sendo cultivada nos cinco continentes com aproximadamente 7,7 milhões de hectares. Segundo dados da FAO (2017), a produção mundial de uvas atingiu 87,4 milhões de toneladas no ano de 2017.

No Brasil, a viticultura atingiu 75,5 mil hectares cultivados que compreendem uma produção anual aproximada de 1,91 milhão de toneladas da fruta em 2017 (FAO, 2017), sendo que o Rio Grande do Sul é o maior produtor, seguido do Vale do São Francisco (Bahia e Pernambuco), São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Minas Gerais, que também se destacam no cultivo. Trata-se de uma atividade importante para a sustentabilidade das pequenas propriedades no país e tem se tornado relevante na geração de empregos, principalmente na parte de processamento da fruta. Na região sul do Brasil, essa atividade ainda está fortemente ligada ao turismo (Melo, 2016).

A produção de vinhos, sucos e derivados no Rio Grande do Sul atingiu 583 milhões de litros em 2015, sendo destes, 36% destinado a produção de vinhos de mesa, 6,4% para a produção de vinhos finos, 39,6% para sucos e 18% destinados a outros derivados (Melo, 2016).

Embora com alta produtividade, a alta umidade nas regiões vitivinícolas do Sul do Brasil torna as videiras suscetíveis a patógenos causadores de doenças fúngicas foliares, como o míldio, que tem como agente causal *Plasmopara viticola*, o qual pode causar grandes perdas de produção (Sônego et al., 2005). Com o intuito de controlar essas doenças, as videiras são submetidas a aplicações sucessivas de fungicidas, sendo muitos cúpricos, podendo adicionar até 30 kg de Cu ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> ao sistema de produção de uvas (Giroto et al., 2013). O elemento químico chega ao solo pela aplicação direta, precipitação ou senescência das folhas da videira, causando acúmulo no solo (Brunetto et al., 2014).

Depois que os vinhedos antigos são erradicados, o solo é revolvido e o transplântio das videiras jovens é realizado. Porém, com o revolvimento do solo é estimulada a mineralização da matéria orgânica, aumentando a disponibilidade de Cu às plantas, uma vez que grande parte desse elemento está complexado por compostos orgânicos (Brunetto et al., 2014; Couto et al., 2015).

Com o aumento dos teores de Cu disponível no solo, aumentará o potencial de toxidez às plantas, que pode ser manifestado pelas modificações na morfologia e anatomia de raízes, com consequente

redução na absorção e no acúmulo de nutrientes nas plantas – que pode ser diagnosticado pela análise de tecidos foliares, afetando negativamente parâmetros relacionados ao crescimento, como o diâmetro do caule, altura das plantas, área foliar, entre outros (Cambrollé et al., 2015; Ambrosini et al., 2015). Ainda, pode ocorrer aumento na síntese de proteínas e enzimas envolvidas na defesa aos danos oxidativos ocasionados pelo estresse (Yang et al., 2011), alteração no transporte de elétrons da fotossíntese e fotoinibição (Cambrollé et al., 2015) e na distribuição dos carboidratos no interior da planta, podendo causar acúmulo de amido nas folhas das plantas mais prejudicadas em função do baixo crescimento (Alaoui-Sossé et al., 2004; Kabata-Pendias, 2011). Em função de tudo isso, ocorre menor crescimento das videiras jovens, retardando o início da produção de uva (Cambrollé et al., 2015).

É necessário evitar o transporte de Cu em excesso às folhas, pois, em nível celular, pode inativar ou danificar as estruturas proteicas resultadas de ligações com grupos sulfidrilas de proteínas e, assim, inibir a atividade de enzimas, ou induzir deficiência de outros íons essenciais, o que causa deficiência nos processos de transporte da célula e dano oxidativo (Yruela, 2009).

Em elevadas concentrações, o Cu ainda pode afetar nutricionalmente as plantas de videira, ocorrendo diminuição do metabolismo do nitrogênio (N) ocasionado pela redução das atividades enzimáticas responsáveis, tendo por consequência baixos teores desse nutriente nas folhas e demais partes da planta (Llorens et al., 2000). O potássio (K) também tem sua translocação afetada, apresentando consequência direta no transporte de água e crescimento das plantas, podendo ser considerado um mecanismo de defesa da planta, em que a redução do metabolismo é menos prejudicial, do que, em relação à entrada de Cu pelas vias simplásticas e apoplásticas (Romeu-Moreno e Mas, 1999), além da diminuição da absorção de água e nutrientes causadas pela deformação anatômica nos canais de influxo das raízes (Lequeux et al., 2010; Ambrosini et al., 2015).

Quando em concentrações tóxicas, os elementos-traço podem causar danos às membranas celulares, ácidos nucleicos e cloroplastos, gerando aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), que precisam ser catalisadas e eliminadas para proteger a planta do estresse oxidativo (Tewari et al., 2002; Yruela, 2009). Como consequência da perturbação do equilíbrio entre a produção e a atividade do sistema antioxidante, pode ocorrer um aumento da atividade das enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT), ascorbato peroxidase

(APX) e superóxido dismutase (SOD) na tentativa de manter baixos os níveis de oxigênio ativo (Zang et al., 2007).

Para diminuir o potencial de toxicidade do Cu, uma das formas que têm apresentado importante função na proteção das plantas à toxicidade a elementos-traço é a inoculação das raízes com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (Soares e Siqueira, 2008; Ambrosini et al., 2015; Cabral et al., 2015). Como estratégia de sobrevivência, os FMA possuem mecanismos para evitar a toxidez por elementos-traço, como a produção de glomalina, uma glicoproteína que é secretada e liberada no solo proporcionando a complexação dos elementos-traço (Folli-Pereira et al., 2012). Além disso, os FMA podem compartimentalizar o Cu nos esporos sem que existam danos no seu metabolismo e, por consequência, também promove a redução da disponibilidade de Cu às raízes (Cornejo et al., 2013; Cabral, et al., 2015).

Os FMA também podem amenizar os efeitos da toxidez de elementos-traço por meio de outros mecanismos, como a retenção dos elementos-traço no micélio fúngico ou pela melhoria do estado nutricional de fósforo (P) das plantas simbióticas (Soares e Siqueira, 2008; Ambrosini et al., 2015b; Cabral et al., 2015). A melhoria da nutrição de P às plantas pode proporcionar a formação de compostos de ligação metal-fosfato, complexando os elementos-traço nas raízes e evitando o seu transporte para a parte aérea (Soares e Siqueira, 2008). O efeito protetor dos FMA é dependente da espécie fúngica e da sua compatibilidade com a espécie vegetal (Meyer et al., 2016) e também da concentração e formas químicas dos contaminantes no solo (Kabata-Pendias, 2011).

Para a cultura da videira, a estirpe fúngica que tem mostrado melhores resultados na colonização de videiras cultivadas em solo com acúmulo de Cu é *Rhizophagus clarus*. Em estudo com videiras cultivadas em solo arenoso com 32,9 mg kg<sup>-1</sup> de Cu, Rosa et al. (2016), inocularam as videiras com três estirpes de FMA, sendo: *Dentiscutata heterogama*, *Acaulospora morrowiae*, e *Rhizophagus clarus*, seguido de um tratamento sem inoculação. Neste estudo, destacou-se *R. clarus*, o qual promoveu maior produção de biomassa de folha e caule, maior absorção de P com consequente redução no teor de Cu nos tecidos das videiras jovens.

Os benefícios proporcionados por *R. clarus* em termos de respostas fisiológicas foram anteriormente observados para outras espécies vegetais, como *Crotalaria juncea* (Ferreira, et al., 2015). Entretanto, as respostas fisiológicas de mudas de videiras micorrizadas em solos

contendo excesso de elementos-traço são escassas e precisam ser investigadas.

Enquanto, no Sul do Brasil, um dos desafios na produção vitícola é o excesso de umidade, no hemisfério norte, nas regiões vitícolas do Canadá, o clima é sempre seco e de baixa precipitação anual, facilitando a manutenção da sanidade das plantas no campo. Em virtude da baixa necessidade de aplicações de fungicidas, e também pelo pH do solo ser próximo a neutro, não há problemas com excesso de Cu nos vinhedos.

Mesmo sem ter problemas com toxicidade por metais pesados, os FMAs são amplamente usados e comercializados como biofertilizantes no Canadá com a proposta de aumento na eficiência do uso dos fertilizantes, principalmente do fósforo.

Esse nutriente é considerado crítico e insubstituível na nutrição das plantas. No entanto, a disponibilidade de fósforo pode limitar o crescimento das plantas em algumas circunstâncias (Vitousek et al., 2010). Isso faz com que, na agricultura moderna, o fósforo suplementar seja necessário, pois os rendimentos das colheitas obtidos superam a quantidade que pode ser obtida apenas com o fósforo de solo.

Em consequência do grande uso de adubação fosfatada, as reservas extraíveis de fosfato de rocha que não são renováveis podem se esgotar em décadas (Abelson, 1999, Cordell et al., 2009). Com isso, faz-se necessário que o aumento da eficiência do uso de nutrientes na agricultura desempenhe um papel importante na abordagem da lacuna entre a oferta e a demanda futuras (Cordell e White 2013).

Uma estratégia proposta para aumentar a eficiência é otimizar o ciclo de nutrientes mediado por micro-organismos para promover a absorção máxima da cultura (Thirkell et al., 2017), o que inclui os FMAs.

Os FMAs simbiotes obrigatórios de raízes se associam à grande maioria das plantas e transferem nutrientes, principalmente fósforo, para a planta hospedeira em troca de carbono (Smith e Read, 2008). As plantas micorrizadas dependem desses nutrientes pelos parceiros fúngicos, e podem fornecer uma porcentagem significativa dos requisitos de fósforo de uma planta, bem como potencialmente acessar o fósforo que o hospedeiro não pode acessar (Smith e Read, 2008).

Pensando nisso, o Canadá conta com inúmeros inoculantes contendo FMA disponíveis e comercializados livremente no mercado e amplamente utilizados. Porém, ainda há muitas perguntas não respondidas sobre sua eficácia, estabilização das comunidades fúngicas, da contaminação para outras áreas e dos danos que podem ocorrer nas comunidades fúngicas nativas pela introdução de um fungo exótico.

## REFERÊNCIAS

- ABELSON, P. H. A Potential Phosphate Crisis. **Science**, v 283, p 2015, 1999.
- ALAOUI-SOSSÉ, B.; GENET, P.; VINIT-DUNAND, F.; TOUSSAINT, M. L.; EPRON, D.; BADOT, P. M. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. **Plant Science**, v. 166, n. 5, p. 1213–1218, 2004.
- AMBROSINI, V. G.; ROSA, D. J.; PRADO, J. P. C.; BORGHEZAN, M.; MELO, G. W. B.; SOARES, C. R. F. S.; COMIN, J. J.; SIMÃO, D. G.; BRUNETTO, G. Reduction of copper phytotoxicity by liming: a study of the root anatomy of young vines (*Vitis labrusca L.*). **Plant Physiology and Biochemistry (Paris)**, v. 96, p. 270-280, 2015.
- BRUNETTO, G.; MIOTTO, A.; CERETTA, C. A.; SCHMITT, D. E.; HEINZEN, J.; MORAES, M. P. de; CANTON, L.; TIECHER, T. L.; COMIN, J. J.; GIROTTO, E. Mobility of copper and zinc fractions in fungicide-amended vineyard sandy soils. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 60, n. 5, p. 609–624, 2014.
- CABRAL, L.; SOARES, C. R. F. S.; GIACHINI, A. J.; SIQUEIRA, J. A. Arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated areas by trace elements: mechanisms and major benefits of their applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 31, p. 1655-1664, 2015.
- CAMBROLLÉ, J.; GARCÍA, J.L.; FIGUEROA, M. E.; CANTOS, M. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. **Chemosphere**, v. 120C, p. 171–178, 2015.
- COUTO, R. R. C.; BENEDET, L.; COMIN, J. J.; BELLI FILHO, P.; MARTINS, S. R.; GATIBONI, L. C.; RADETSKI, M.; VALOIS, C. M.; AMBROSINI, V. G.; BRUNETTO, G. Accumulation of copper and zinc fractions in vineyard soil in the mid-western region of Santa Catarina, Brazil. **Environmental Earth Sciences**, 2015.

CORDELL, D.; DRANGERT, J. O.; WHITE, S. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. **Global Environmental Change**. v 19, p 292–305, 2009.

CORDELL, D. & WHITE, S. Sustainable phosphorus measures: strategies and technologies for achieving phosphorus security. **Agronomy**, v 3, p 86–116, 2013.

CORNEJO, P.; PÉREZ-TIENDA, J.; MEIER, S.; VALDERAS, A.; BORIE, F.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 57, p. 925-928, 2013.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: fev. 2019.

FERREIRA, A. A; CERETTA, P.; ALBERTO, C.; SORIANI, H. H; TIECHER, T. L.; SOARES, C. R. F. S.; ROSSATO, L. V.; NICOLOSO, F. T.; BRUNETTO, G.; PARANHOS, J. T.; CORNEJO, P. *Rhizophagus clarus* and phosphate alter the physiological responses of *Crotalaria juncea* cultivated in soil with a high Cu level. **Applied Soil Ecology (Print)**, v. 91, p. 37-47, 2015.

FOLLI-PEREIRA, M. S.; MEIRA-HADDAD, L. S.; BAZZOLLI, D. M. S.; KASUYA, M. C. M. Micorriza Arbuscular e a Tolerância das Plantas ao Estresse. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 1663-1679, 2012.

GIROTTO, E.; CERETTA, C.A.; LOURENZI, C.R.; LORENSINI, F.; TIECHER, T.L.; VIEIRA, R.C.B.; TRENTIN, G.; BASSO, C.J.; MIOTTO, A.; BRUNETTO, G. Nutrient transfers by leaching in a no-tillage system through soil treated with repeated pig slurry applications. **Nutr. Cycl. Agroecosyst**, v. 95, p.115-131, 2013.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**, ed. 4, p. 548, 2011.

LEQUEUX, H.; HERMANS, C.; LUTTS, S.; VERBRUGGEN, N. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root

system architecture, hormone distribution, lignina accumulation and mineral profile. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 673-682, 2010.

LLORENS, N.; AROLA, L.; BLADÉ, C.; MAS, A. Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue cultured *Vitis vinifera*. **Plant Science**, v.160, p.159-163, 2000.

MELLO, L.M.R. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2015**. Versão eletrônica 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1060511/vitivinicultura-brasileira-panorama-2015>> Acesso em: agosto, 2018.

MEYER, E.; LONDOÑO, D. M.; ARMAS, R.D.; GIACHINI, A.J.; ROSSI, M.J.; Stoffel, S.C.G.; SOARES, CLÁUDIO R. F. S. Arbuscular mycorrhizal fungi in the growth and extraction of trace elements by *Chrysopogon zizanioides* (vetiver) in a substrate containing coalmine wastes. **International Journal of Phytoremediation**, v. 19, p. 113-120, 2016.

ROMEU-MORENO, A.; MAS, A. Effects of copper exposure in tissue cultured *Vitis vinifera*. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 47, p.2519-2522, 1999.

ROSA, D. J.; AMBROSINI, V. G.; BRUNETTO, G.; SOARES, C. R. F. S.; BORGHEZAN, M.; PESCADOR, R. Parâmetros fisiológicos em videiras “Paulsen 1103” (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares em solo contaminado com cobre. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v.31, p.14 - 23, 2016.

SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O. Mycorrhiza and phosphate protection of tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, n. 6, p. 833–841, 2008.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R.; JUNIOR A. G. **Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil**. Circular Técnica 56. Embrapa uva e Vinho. Bento Gonçalves.p: 32. 2005.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis. 3rd edition.** Academic Press, Inc, New York, 2008.

TEWARI, R. K.; KUMAR, P.; SHARMA, P.; BISHT, S. S. Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. **Plant Science**, v. 162, p. 381-388, 2002.

THIRKELL, T. J.; CHARTERS, M. D.; ELLIOTT, A. J.; SAIT, S. M. AND FIELD, K. J. Are mycorrhizal fungi our sustainable saviours? Considerations for achieving food security. **Journal of Ecology**, v. 105, p. 921–929, 2017.

VITOUSEK, P. M., PORDER, S.; HOULTON, B. Z.; OLIVER, A.; VITOUSEK, P. M.; PORDER, S.; HOULTON, B.Z.; CHADWICK, O. A. Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications, and nitrogen - phosphorus interactions. **Ecological Applications**, v. 20, p. 5–15, 2010.

YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v. 36, p. 409–430, 2009.

ZHANG, F.; WANG, Y.; LOU, Z.; DONG, J. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). **Chemosphere**, v. 67, p. 44-50, 2007.

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

1. Avaliar os efeitos da interação entre a calagem e a inoculação de FMA (*Rhizophagus clarus*) no crescimento, parâmetros fotossintéticos e atividade de enzimas indicadoras de estresse oxidativo em porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivada em substrato com elevado conteúdo de Cu.

2. Avaliar o desempenho, estabilização e espalhamento do inoculante comercial de fungos micorrízicos MYKE® PRO GR, que contém *Rhizogloium irregulare* (DAOM 197198), nos porta enxertos de videira: Riparia Gloire (*Vitis riparia*), 3309 Coudrec (*Vitis riparia x Vitis rupestris*), 101-14 Millardet e Grasset (*Vitis riparia x Vitis rupestris*), Schwarzmann (*Vitis riparia x Vitis rupestris*), Salt Creek (*Vitis champinii*) e 5C Teleki (*Vitis berlandieri x Vitis riparia*), desde a produção das mudas em casa de vegetação até o cultivo a campo.

### Objetivos específicos

1. a) Avaliar a interação dos fatores: calcário, FMA e Cu no porta enxerto “Paulsen 1103”.

b) Avaliar o desempenho do porta-enxerto de videira P1103 por meio de parâmetros de crescimento;

c) Mensurar as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila *a*;

d) Quantificar os pigmentos fotossintéticos: clorofilas e carotenoides;

e) Quantificar a atividade das enzimas: APX (E.C. 1.11.1.11), CAT (E.C. 1.11.1.6), POD (E.C. 1.11.1.7) e SOD (E.C. 1.15.1.1);

f) Avaliar a porcentagem de colonização micorrízica nas raízes das videiras;

2. a) Avaliar o desempenho da inoculação de FMA em videiras cultivadas em casa de vegetação.

b) Avaliar o desempenho da pré-inoculação de FMA em videiras cultivadas a campo.

c) Avaliar a estabilização da comunidade fúngica inoculada nas videiras.

d) Avaliar se a comunidade fúngica se espalhou e colonizou plantas não pré-inoculadas.



**CAPÍTULO 1.****CALAGEM E INOCULAÇÃO DE *RHIZOPHAGUS CLARUS* EM  
PORTA-ENXERTOS DE VIDEIRA “PAULSEN 1103” PARA  
AMENIZAÇÃO DA TOXICIDADE POR COBRE**



## CALAGEM E INOCULAÇÃO DE *RHIZOPHAGUS CLARUS* EM VIDEIRAS PARA AMENIZAÇÃO DA TOXICIDADE POR COBRE.

### RESUMO

Solos de vinhedos antigos possuem altos conteúdos de cobre (Cu), provenientes de aplicações de fungicidas cúpricos foliares, que causam toxicidade às videiras jovens, dificultando o estabelecimento do vinhedo. A calagem e a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são estratégias potenciais para diminuir a toxicidade de Cu ao porta-enxerto Paulsen 1103 no replantio. O estudo objetivou avaliar os efeitos da interação entre a calagem e a inoculação de FMA (*Rhizophagus clarus*) no crescimento, colonização das raízes, parâmetros fotossintéticos e atividade de enzimas antioxidantes em porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com elevado conteúdo de Cu. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, utilizando-se substrato coletado em campo natural, com e sem adição de 3 Mg ha<sup>-1</sup> de calcário e artificialmente contaminado pela adição de 0, 50, 100 e 150 mg kg<sup>-1</sup> de Cu. No momento do transplante das videiras, foi aplicado o tratamento de FMA, sendo com e sem inoculação de *Rhizophagus clarus*. As videiras foram cultivadas por 3 meses, podadas, e cultivadas por mais 3 meses, quando foram analisados: fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas, parâmetros de crescimento, concentrações dos pigmentos fotossintetizantes, atividade das enzimas ascorbato peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase, superóxido dismutase, e a porcentagem de colonização micorrízica nas raízes. A calagem e a inoculação de FMA apresentaram grande potencial na diminuição dos efeitos tóxicos do elevado teor de Cu no substrato, contribuindo para maior crescimento, menor atividade de enzimas antioxidantes, menor dano fotossintético e maior colonização das raízes. Por outro lado, o aumento das concentrações de Cu mostrou grande potencial tóxico e reduziu em 70% a colonização das raízes pelos FMAs, em 43% a altura de planta e 17% a produção de matéria seca. A inoculação de FMA resultou em um acréscimo 30% na produção de matéria seca de parte aérea, e um decréscimo de 51% na atividade da enzima ascorbato peroxidase e 26% na atividade da enzima guaiacol peroxidase. A combinação de calagem com a inoculação de FMA são estratégias eficazes na amenização da toxicidade por Cu para videiras jovens.

**Palavras-chave:** Colonização micorrízica; fungos micorrízicos arbusculares; fotossíntese; fluorescência da clorofila *a*; metal pesado.

## ABSTRACT

Old vineyard soils have high copper (Cu) contents, originating from foliar fungicide applications that cause toxicity to young vines, making it difficult to establish a vineyard. Liming and inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are potential strategies to reduce Cu toxicity to the 'Paulsen 1103' rootstock at replanting. This study aimed to evaluate the effects of the interaction between liming and inoculation of AMF (*Rhizophagus clarus*) on root growth, root colonization, photosynthetic parameters and antioxidant enzyme activity on the 'Paulsen 1103' grapevine rootstock grown on a substrate with a high content of Cu. The experiment was conducted in a greenhouse, using substrate collected in the natural field, with and without the addition of 3 Mg ha<sup>-1</sup> of limestone and artificially contaminated by the addition of 0, 50, 100 and 150 mg kg<sup>-1</sup> of Cu. At the moment of transplanting of the vines, the treatment of AMF was applied, being with and without inoculation of *Rhizophagus clarus*. The vines were cultivated for 3 months, pruned, and cultivated for another 3 months, when analyzed: chlorophyll *a* fluorescence, gas exchange rate, growth parameters, concentrations of photosynthetic pigments, activity of the enzymes ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD), and the percentage of mycorrhizal colonization in the roots. The liming and inoculation of AMF showed great potential in reducing the toxic effects of high Cu content in the substrate, contributing to higher growth, lower activity of antioxidant enzymes, lower photosynthetic damage and higher root colonization. On the other hand, the increase in Cu concentrations showed a big toxic potential and reduced root colonization by AMF by 70%, plant height by 43% and dry matter production by 17%. The inoculation of AMF resulted in a 30% increase in shoot dry matter production, and a decrease of 51% in the activity of the enzyme ascorbate peroxidase and 26% in the activity of the enzyme guaiacol peroxidase. The combination of liming with AMF inoculation are effective strategies in mitigating Cu toxicity for young vines.

**Keywords:** Mycorrhizal colonization; arbuscular mycorrhizal fungi; photosynthesis; chlorophyll *a* fluorescence; heavy metal.

## INTRODUÇÃO

A aplicação de fungicidas cúpricos, como a calda bordalesa [(CuSO<sub>4</sub> + Ca(OH)<sub>2</sub>], é uma prática de manejo comum no cultivo de frutíferas e visa controlar preventivamente doenças fúngicas foliares. Na produção de videiras, por exemplo, são realizadas aplicações sucessivas de calda bordalesa ao longo do ciclo produtivo da cultura, possibilitando, assim, a obtenção da sua produtividade máxima e uvas com composição adequada de açúcares e fenóis para elaboração de vinhos, sucos e espumantes. Contudo, durante o processo de aplicação do fungicida, parte deste é depositado sobre o solo e ao longo dos anos de cultivo observa-se aumento considerável do conteúdo de Cu em solos de vinhedos antigos (Brunetto et al., 2016; Tiecher et al., 2017; 2018). Quando ocorre a erradicação dos vinhedos antigos, o solo é revolvido e videiras jovens são transplantadas. Porém, o excesso de Cu no solo pode causar toxidez às videiras, dificultando o estabelecimento do vinhedo.

O Cu é essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, porque atua como cofator em enzimas como a Cu/Zn superóxido dismutase (SOD), citocromo oxidase, amino oxidase, plastocianinas e polifenol oxidase (Yruela, 2005). Mas em elevadas concentrações no tecido da planta, o Cu pode causar toxidez, por afetar a função de transportadores de membrana e canais iônicos (Janicka-Russak et al., 2008), podendo ocorrer o aumento da permeabilidade não-específica da membrana, o que resulta em desequilíbrios nutricionais (Ferreira et al., 2015). Além disso, o Cu pode causar danos ao aparato fotossintético das plantas (Cambrollé et al., 2015; Tiecher et al., 2018) e ocasionar estresse oxidativo por causa do desequilíbrio entre as respostas antioxidantes e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), por meio da reação de Fenton (Giroto et al., 2013).

Assim, torna-se necessário o estabelecimento de estratégias de manejo em solos contaminados com Cu para diminuir a disponibilidade de Cu no solo e, por consequência, sua toxidez às videiras. Dentre estas estratégias, está o uso da calagem, que, em solos ácidos com elevado teor de Cu, como é o caso dos vinhedos do sul do Brasil, pode reduzir a toxicidade do Cu em plantas como a videira (Ambrosini et al., 2015). A calagem faz com que o aumento do hidróxido de cobre na solução do solo pelo aumento do pH, provoque a complexação e precipitação de Cu, e aumente a capacidade de troca catiônica (CTC), aumentando a adsorção de metais pesados (Joris et al., 2012). Além disso, a calagem aumenta o

conteúdo de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) no solo, que competem com Cu pelas vias de absorção (Kopittke et al., 2011), reduzindo o acúmulo de Cu nas raízes e o transporte do elemento aos brotos (Juang et al., 2014).

Outra estratégia para diminuir a toxidez de Cu às videiras é a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que podem estabelecer simbiose radicular com plantas, inclusive com as videiras (Ambrosini et al., 2015; Rosa et al., 2016). Com isso, os FMA podem exercer efeito fitoprotetor em solos com alto teor de Cu, envolvendo mecanismos como o efeito de diluição dos elementos tóxicos no tecido, em função do favorecimento do crescimento das plantas, exclusão da absorção por meio da precipitação ou quelação dos elementos na rizosfera (Cabral et al., 2015). Além disso, a colonização radicular pelos FMA pode diminuir a absorção de Cu devido à retenção e imobilização de metais pesados nas estruturas fúngicas (Cornejo et al., 2013; Cabral et al., 2015), com consequente redução da transferência dos elementos das raízes para a parte aérea (Ambrosini et al., 2015; Rosa et al., 2016). Porém, estes efeitos positivos dos FMA na fitoproteção são diferenciados entre os isolados fúngicos, o metal pesado e a espécie vegetal (Meyer et al., 2016).

Embora a aplicação de calagem no solo e a inoculação de FMA apresentem um grande potencial na remediação da toxidez de Cu em plantas cultivadas em solos contaminados, poucos são os estudos que utilizaram a combinação destas estratégias para a fitoproteção da toxicidade de metais pesados, especialmente em videiras jovens cultivadas em solos de vinhedos contaminados com Cu. O estudo objetivou avaliar os efeitos da interação entre a calagem e a inoculação de FMA (*Rhizophagus clarus*) no crescimento, parâmetros fotossintéticos e atividade de enzimas indicadoras de estresse oxidativo em videiras jovens cultivadas em substrato com elevado conteúdo de Cu.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material vegetal e condução experimental*

As videiras utilizadas no experimento são do porta-enxerto 'Paulsen 1103' (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) obtidas através da micropropagação, utilizando o meio de cultura DSD1 com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6,0 g L<sup>-1</sup> de ágar (Silva & Doazan, 1995) e, posteriormente, as

plantas foram aclimatizadas com substrato, composto orgânico e solo, estéril em casa de vegetação por aproximadamente 60 dias.

No momento do transplante, em novembro de 2016, foi realizada a inoculação das mudas, por meio da adição de solo-inóculo, diretamente sob as raízes, de modo a fornecer 200 esporos de *Rhizophagus clarus* em vasos com capacidade de 3 dm<sup>3</sup> de substrato. O experimento foi conduzido por 6 meses em casa de vegetação com teto de manta plástica e ventilação negativa forçada, com irrigação manual, em delineamento experimental em blocos casualizados em esquema fatorial 2x2x4, com seis repetições, sendo: com e sem calagem; com e sem inoculação de FMA; e 4 concentrações de Cu (0, 50, 100 e 150 mg kg<sup>-1</sup>). As videiras foram cultivadas por três meses, podadas deixando-se três gemas a partir do solo e, então, cultivadas por mais três meses, quando foram realizadas, na fase final do experimento, as coletas de dados de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, altura de planta e número de folhas. O experimento foi encerrado com a coleta de amostras para determinação da colonização micorrízica das raízes, quantificação das clorofilas e dos carotenoides, determinação da atividade enzimática de APX (E.C. 1.11.1.11), CAT (E.C. 1.11.1.6), POD (E.C. 1.11.1.7), SOD (E.C. 1.15.1.1).

### ***Coleta e preparo do substrato***

O substrato utilizado foi um *Typic Hapludalf* (Soil Survey Staff, 2006), procedente de uma área de campo natural não antropizado (30°47'23,5''S e 55°22'7,0''W), com conteúdo naturalmente baixo de Cu e adjacente a um vinhedo da região da Campanha Gaúcha, município de Santana do Livramento (RS), região Sul do Brasil.

O substrato foi coletado na camada de 0,00-0,20 m, seco ao ar, passado em peneira com malha de 2 mm, homogeneizado e reservado.

Com relação ao substrato reservado, parte dele não recebeu adição de calcário, e na outra parte foi adicionado dose de calcário equivalente a 3,0 Mg ha<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> (PRNT 100%) para elevar o pH a 6,2; homogeneizado e, posteriormente, incubado por 60 dias. O calcário utilizado era composto por uma mistura de CaCO<sub>3</sub> e MgCO<sub>3</sub>, ambos da marca Synth (reagentes PA), com proporção para manter a relação Ca:Mg de 2:1. O substrato foi dividido em 4 porções: a primeira mantida sem

adição de Cu; a segunda recebeu a aplicação de 50 mg kg<sup>-1</sup> de Cu; a terceira 100 mg kg<sup>-1</sup> de Cu; a quarta 150 mg kg<sup>-1</sup> de Cu. O Cu foi adicionado na forma de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (reagente PA da marca Synth). O substrato ficou incubado novamente por 60 dias. Nas duas incubações, o substrato foi mantido com água a 70% da capacidade de campo.

Ao final do período de incubação, o substrato foi esterilizado em autoclave por um período de duas horas, por duas vezes, para eliminar os FMAs autóctones e garantir a ausência de microrganismos que poderiam interferir no estudo.

Uma amostra do substrato foi coletada para caracterização física e química antes de iniciar o plantio das videiras (tabela 1). Ao final do experimento, foi realizada a análise do conteúdo de fósforo (P), potássio (K), cobre (Cu) e zinco (Zn) no substrato (tabela 2).

**Tabela 1.** Caracterização química e física do substrato antes da implantação do experimento (Ferreira et al., 2015).

Características do solo	----- Sem calagem -----				----- Com calagem -----			
	----- (mg kg <sup>-1</sup> Cu) -----							
	0	50	100	150	0	50	100	150
pH (H <sub>2</sub> O)	4,9	5,3	5,2	5,2	6,4	6,7	6,6	6,6
TOC (g kg <sup>-1</sup> )	2,0	0,6	1,2	0,6	2,4	0,6	0,4	0,4
Cu EDTA (mg kg <sup>-1</sup> )	1,64	51,2	122,5	168,6	3,1	37,1	56,8	87,7
P disponível por Mehlich-1 (mg kg <sup>-1</sup> )	36	19,3	30,3	21,0	28,6	9,3	8,7	22,6
Ca trocável (mg kg <sup>-1</sup> )	0,8	0,5	0,8	0,6	0,8	1,1	0,6	0,6
Mg trocável (mg kg <sup>-1</sup> )	0,5	0,3	0,5	0,4	1,1	1,3	0,8	0,6
Argila (g kg <sup>-1</sup> )	8	8	8	9	7	7	6	6
Alumínio	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0

**Tabela 2.** Conteúdo de fósforo (P), potássio (K), cobre (Cu) e zinco (Zn), no substrato ao final do experimento.

Elemento\Cu	----- Sem calagem -----								----- Com calagem -----							
	----- Sem FMA -----				----- Com FMA -----				----- Sem FMA -----				----- Com FMA -----			
	0	50	100	150	0	50	100	150	0	50	100	150	0	50	100	150
<b>P (mg L<sup>-1</sup>)</b>	69,7	80,5	87,4	104,0	80,5	71,7	75,4	81,7	43,8	58,5	58,3	73,2	41,4	45,2	65	86,9
<b>K (mg L<sup>-1</sup>)</b>	39,7	56,3	74	94,7	59,7	56,3	71	81	37,7	56,3	47	66,3	42,3	48	59,3	70
<b>Cu (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0,9	54,8	92	122,2	0,9	41,1	92,1	130,5	1,01	34,2	46,5	39,3	0,56	33,70	51,24	57,7
<b>Zn (mg L<sup>-1</sup>)</b>	3,4	3,8	3,1	2,5	2,5	3,3	3,2	2,7	3,0	2,2	2,6	1,4	1,3	1,3	1,9	2,7



### ***Coleta do material vegetal***

Ao final do período de cultivo, foi determinada a altura das plantas usando-se régua graduada. Posteriormente, as plantas foram separadas em raízes, caules e folhas. Na sequência, a massa fresca (MF) de cada parte foi determinada em balança de precisão.

Uma porção da MF de cada órgão foi seca em estufa com ar forçado a 65 °C até atingir massa constante para a determinação da produção de matéria seca (MS) em balança de precisão. A outra porção da MF foi reservada para as análises de clorofilas *a*, *b* e total, carotenoides e atividade de enzimas antioxidantes.

### ***Colonização micorrízica total***

Aproximadamente 2,0 g de raízes foram armazenadas em FAA para serem submetidas à clarificação e coloração com azul de tripan (Koske & Gemma, 1989), para a avaliação da colonização micorrízica pelo método das intersecções em placas reticuladas (Giovannetti & Mosse, 1980).

### ***Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a***

As medições de trocas gasosas foram realizadas aos cinco meses de cultivo com um analisador portátil de CO<sub>2</sub> por infravermelho (IRGA), LI-6400 XT (LICOR, USA), sendo a área da câmara de 2 cm<sup>2</sup> e concentração de CO<sub>2</sub> do ar de 400 ppm. Foram avaliadas as taxas de assimilação de CO<sub>2</sub> (*A<sub>s</sub>*), condutância estomática (*g<sub>s</sub>*), transpiração (*T<sub>r</sub>*) e concentração interna de CO<sub>2</sub> na célula (*C<sub>i</sub>*). As avaliações foram realizadas entre 9 e 11 horas da manhã, com luminosidade controlada de 1000 μmol fóton m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Para essa avaliação, foi utilizada como padrão uma folha sadia e completa do terço médio da planta.

Ainda, foram realizadas medições de emissão da fluorescência da clorofila *a* com um fluorímetro de luz modulada MINI-PAM (Walz, Germany), para obter o potencial quântico efetivo do fotossistema II

(Y(II)), a taxa de transporte de elétrons (ETR) e o rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm). As mensurações foram realizadas com o auxílio de pinças de metal (DLC-8) acopladas ao sensor MINI-PAM, colocadas na região mediana das folhas, em um dos lados do limbo foliar, evitando a nervura central. Antes de cada determinação individual, uma porção da folha foi mantida no escuro, por pelo menos 30 minutos, para que todos os centros de reação naquela região da folha adquirissem a condição de “abertos”, conforme indicações que constam em Maxwell & Johnson (2000). As leituras foram realizadas no período das 9 às 11 horas nas folhas do terço médio de cada planta.

### ***Quantificação de pigmentos fotossintéticos***

A determinação do conteúdo de clorofilas e carotenoides nas folhas foi realizada pela extração com dimetilsulfóxido (DMSO) em banho-maria a 65 °C por duas horas, sem maceração e com determinação por meio de espectrofotometria (Hiscox & Israelstam, 1979). Os cálculos para a determinação da concentração das clorofilas *a*, *b* e total e de carotenoides foram realizados utilizando as fórmulas de Wellburn (1994).

### ***Extração de enzimas e determinação da atividade enzimática de APX (E.C. 1.11.1.11), CAT (E.C. 1.11.1.6), POD (E.C. 1.11.1.7), SOD (E.C. 1.15.1.1)***

Para extração enzimática e quantificação de proteínas, 0,5 g de amostra de raízes foram moídas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão fosfato 100 mM pH 7,0 suplementado com 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 1 mM de polivinilpirrolidona (PVP). Triton 0,1% (v/v) foi adicionado após a homogeneização. As amostras foram mantidas em geladeira por 15 minutos até a centrifugação (4 °C, 4000 rcf por 15 minutos). O teor total de proteína solúvel nos sobrenadantes foi determinado utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Bradford, 1976). Para quantificação de proteínas e a atividade enzimática utilizou-se o mesmo volume.

Para a atividade da superóxido dismutase (SOD), foi realizada a observação da diminuição na absorbância da formazona feita pela foto-

absorção via nitro-azul tetrazólio (NBT) e interação radical superóxido. O conteúdo em mistura reacional: tampão de fosfato a pH 7,8 a 50 mM, metionina a 13 mM, NBT a 75 $\mu$ M, EDTA a 100 mM, riboflavina a 2  $\mu$ M. A reação começou quando os tubos foram colocados em uma câmara com duas lâmpadas fluorescentes de 15 W por 10 min. Um tubo não irradiado contendo a mesma amostra serviu de branco para o cálculo. A absorbância foi medida a 560 nm. Uma unidade de SOD é a atividade enzimática necessária para 50% da inibição de fotoredução de NBT (Giannopolitis & Ries, 1977). A atividade da ascorbato peroxidase foi determinada medindo-se a diminuição da absorbância em 290 nm ( $E = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) por 10 minutos. A mistura reacional continha tampão de fosfato a pH 7,0 a 50 mM, EDTA a 5 mM, ácido ascórbico a 50 mM e peróxido de hidrogênio a 4,75 mM a 30% (Koshiba, 1993). A mistura reacional para medição de atividade da catalase continha tampão de fosfato a pH 7,0 a 50 mM suplementado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 12,5 mM a 30%. A diminuição da absorbância foi medida a 240 nm ( $E = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) por 10 min (Peixoto et al., 1999). A mistura reacional de guaiacol peroxidase (GPX) continha 5 mL de tampão fosfato pH 6,0 a 50 mM suplementado com 12,5  $\mu$ L de guaiacol (2-etoxifenol) e 16,3  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%. Esta atividade é medida pelo aumento da absorbância devido à oxidação do guaiacol a 470 nm por 20 minutos ( $E = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### *Análises estatísticas*

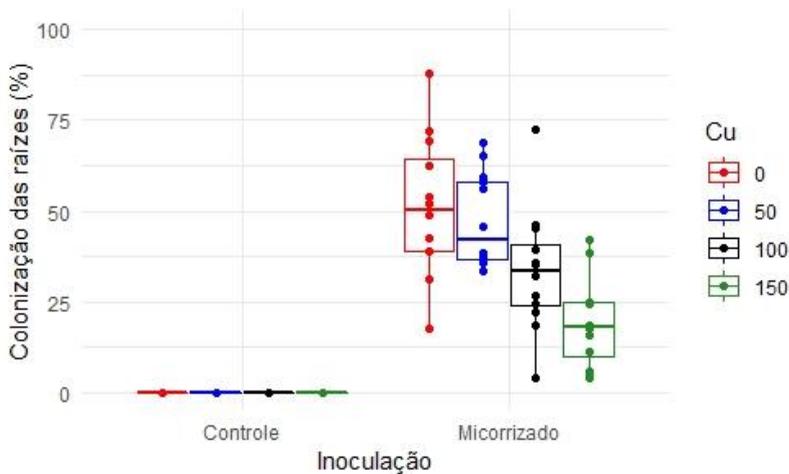
Para testar se a calagem, a pré-inoculação de FMA e os teores de cobre afetaram os resultados obtidos no experimento, utilizou-se o modelo linear de efeito misto (lme4 " versão 1.1–12, Modelos Lineares-Efeitos Mistos) (Bates et al., 2018). O tratamento de calagem, inoculação e adição de cobre foram fatores fixos e o bloqueamento experimental foi considerado como um fator aleatório. Os dados foram transformados logaritmicamente, quando necessário (Colonização micorrízica, Guaiacol peroxidase e Superóxido dismutase), para permitir a distribuição normal dos resíduos do modelo. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para testar a normalidade entre os resíduos.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no R studio (Versão 1.0.136 - © 2009–2016 RStudio, Inc.). Boxplots foram gerados usando o pacote ggplot (Wickham, 2010) em R studio (Versão 1.0.136 - © 2009–2016 RStudio, Inc.).

## RESULTADOS

*Colonização micorrízica das raízes*

A colonização micorrízica das raízes das videiras sofreu drástica diminuição com o aumento do conteúdo de Cu no substrato (Figura 1). Como era esperado, ocorreu interação entre a inoculação com FMA e a toxicidade por Cu. As videiras que não receberam inoculação também não apresentaram colonização micorrízica, o que mostra que não houve contaminação entre os tratamentos.



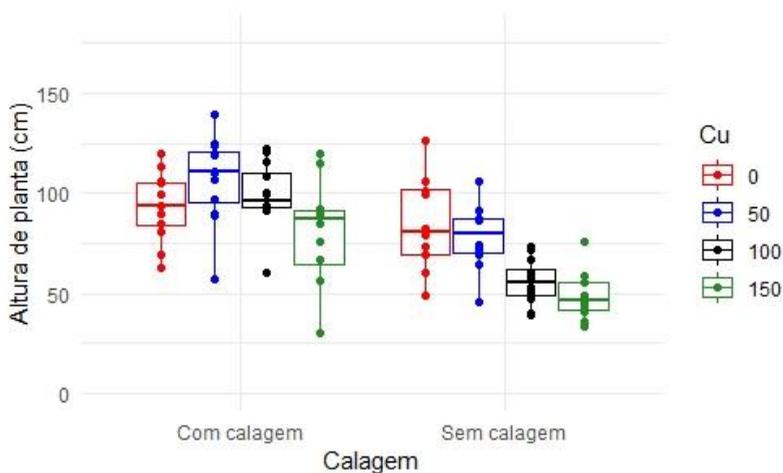
**Figura 1.** Colonização micorrízica das raízes (%) - interação dos conteúdos de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) com a inoculação de *Rhizophagus clarus*, em raízes do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu.

A maior colonização micorrízica foi encontrada nas raízes das videiras inoculadas que não receberam adição de Cu, sendo 60 % de colonização das raízes. A colonização foi decrescendo até atingir o menor valor, 18 % de colonização, que foi encontrado no mais alto conteúdo de Cu testado, ou seja,  $150 \text{ mg kg}^{-1}$ , isso representa uma queda de 70% na colonização das raízes pelos FMA com a adição de  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu. A

calagem não teve efeito sobre a colonização micorrízica das raízes das videiras.

### *Parâmetros morfológicos*

A altura de planta apresentou interação significativa para os fatores calagem e Cu (Figura 2). As videiras cultivadas em substrato sem adição de calagem tiveram a altura de planta diminuída gradativamente com o aumento do conteúdo de Cu. O maior crescimento de planta, quando sem calagem, foi de 85 cm, obtido nas videiras que não receberam adição de Cu e o menor crescimento foi de 48,6 cm, obtido nas videiras que receberam a adição de 150 mg kg<sup>-1</sup>, representando um crescimento de planta 43 % menor.

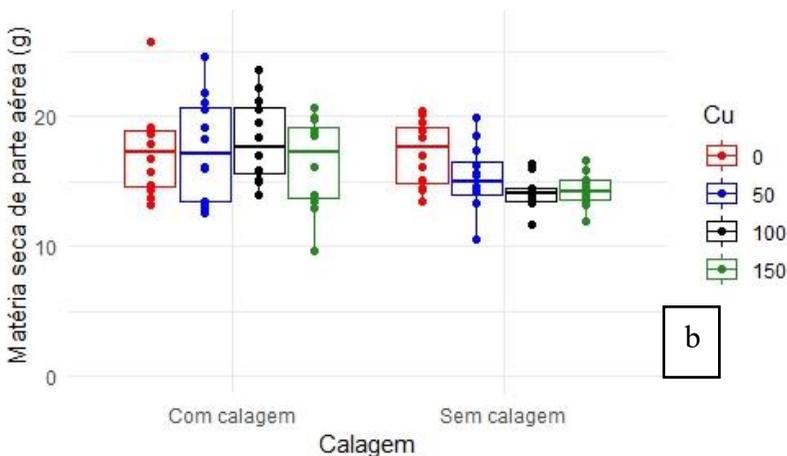
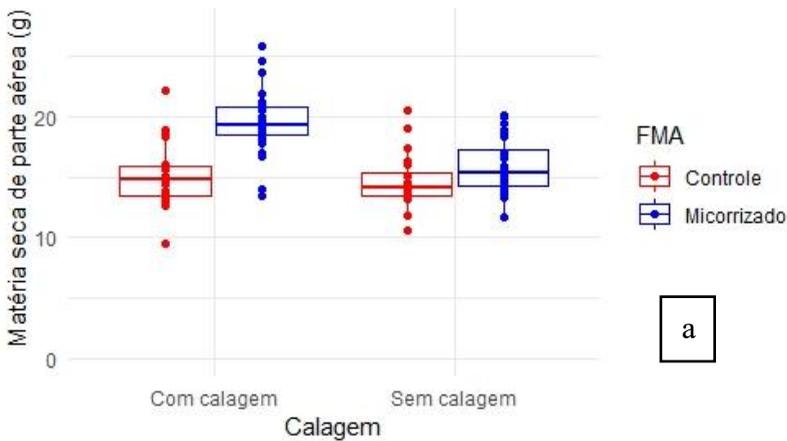


**Figura 2.** Altura de plantas (cm) - interação dos conteúdos de Cu (mg kg<sup>-1</sup>) com a calagem, em porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu.

As videiras cultivadas com adição de calcário mantiveram estatisticamente a mesma altura de planta para as videiras cultivadas sem adição de Cu e com adição de 50 e 100 mg kg<sup>-1</sup>. Mesmo assim, as videiras que receberam a adição de 150 mg kg<sup>-1</sup> de Cu tiveram diminuição da

altura de planta e vieram a apresentar a menor altura de planta dentre as videiras que receberam a adição de calcário no substrato.

A matéria seca de parte aérea foi significativa para os fatores calagem x FMA e também para Cu x calagem (Figura 3). A matéria seca de parte aérea foi maior nas videiras inoculadas com FMA em comparação com as videiras não inoculadas quando o substrato recebeu adição de calagem (Figura 3 (a)). As videiras inoculadas obtiveram 19,5 g de matéria seca de parte aérea, contra 15 g para as videiras não inoculadas, representando um acréscimo de 30 % com a inoculação. As videiras cultivadas em substrato sem adição de calagem, não obtiveram resultado significativo com a inoculação com FMA.

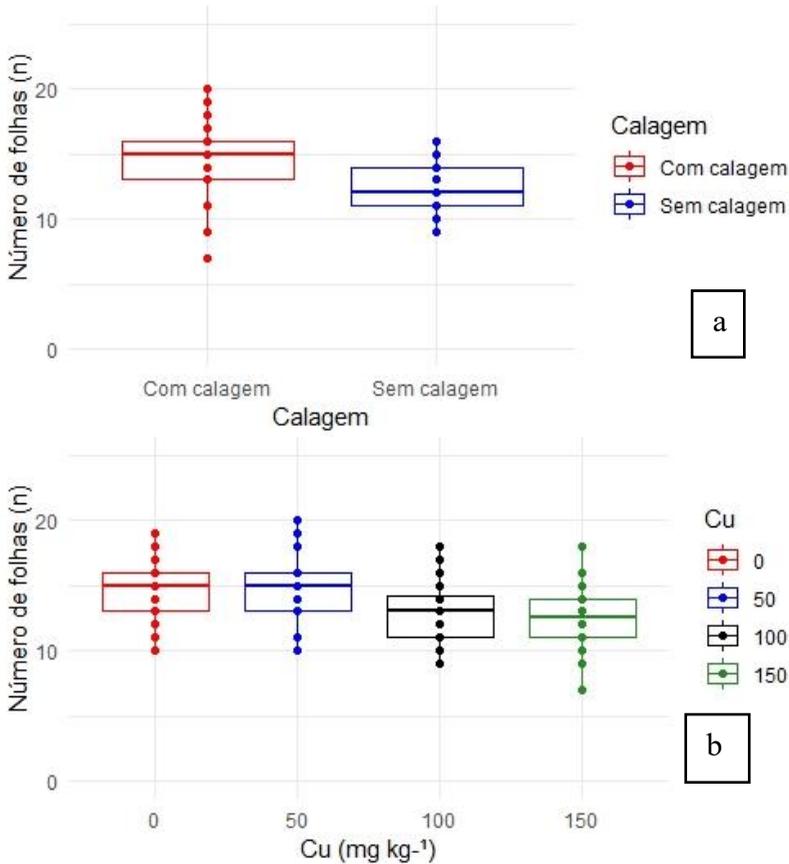


**Figura 3.** Matéria seca de parte aérea (g) – interação entre inoculação de FMA e calagem (a), interação entre os conteúdos de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) e calagem (b), em porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu.

Na figura de interação entre os fatores calagem x Cu (Figura 3 (b)), verificou-se que quando as videiras foram cultivadas em substrato com a adição de calagem, a adição de Cu não resultou em decréscimo da produção de matéria seca.

Por sua vez, as videiras cultivadas em substrato sem a adição de calagem, o aumento do conteúdo de Cu no substrato foi prejudicial e resultou em decréscimo de 16,9 % na produção de matéria seca de parte aérea quando houve adição de  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu em comparação a quando não ocorreu adição de Cu. Neste caso, a maior produção de matéria seca foi obtida nas videiras que não receberam aplicação de Cu, enquanto as duas menores produções de matéria seca, estatisticamente iguais, foram obtidas nas plantas cultivadas em substrato com adição de  $100$  e  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu. Não houve interação entre os fatores FMA e Cu.

O número de folhas das videiras não teve efeito de interação entre os fatores, mas teve efeito significativo para calagem e também para Cu (Figura 4). As videiras cultivadas em substrato com adição de calagem produziram maior número de folhas em comparação com as videiras cultivadas em substrato sem calagem, sendo estes, 17 e 12 folhas, respectivamente (Figura 4 (a)).

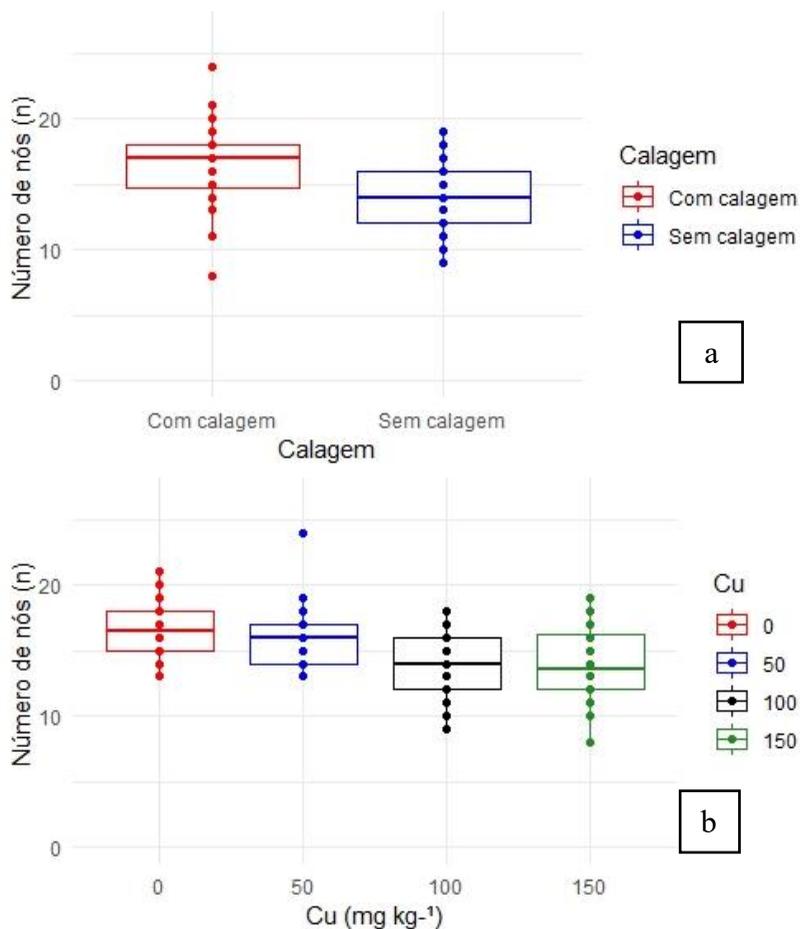


**Figura 4.** Número de folhas (n) – efeito da calagem (a), efeito do conteúdo de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) (b), em porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu.

O número de folhas das videiras cultivadas sem a adição de Cu ou com a adição de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ , estatisticamente iguais, foi maior em comparação com as videiras cultivadas em substrato com a adição de  $100$  e  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu, que também foram estatisticamente idênticas (Figura 4(b)). A inoculação das videiras com FMA não proporcionou diferença para o número de folhas.

A adição de calagem e de Cu no substrato afetaram o número de nós (Figura 5). O número de nós foi maior para as videiras cultivadas em

substrato com a adição de calagem quando em comparação com as videiras cultivadas sem a adição de calagem, sendo 17 e 14 nós, respectivamente (Figura 5 (a)).

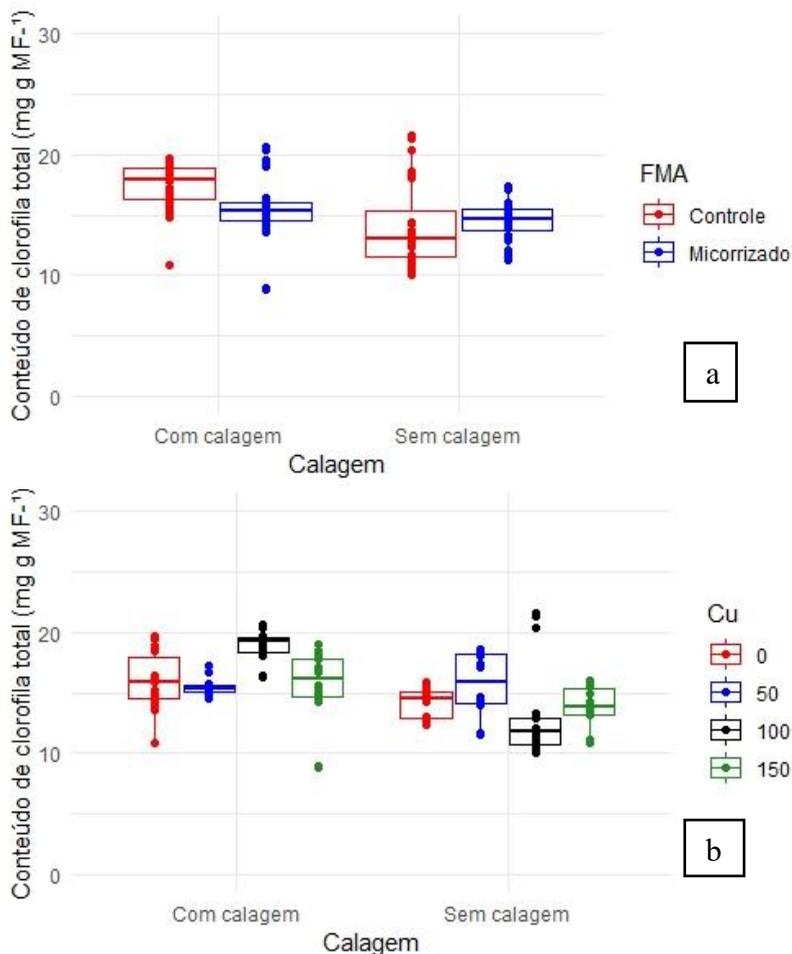


**Figura 5.** Número de nós (n) – efeito da calagem (a), efeito do conteúdo de cobre (mg kg<sup>-1</sup>) (b), em porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu.

As videiras cultivadas em substrato sem a adição de Cu ou com a adição de 50 mg kg<sup>-1</sup> apresentaram maior número de nós quando em comparação com as videiras cultivadas em substrato com a adição de 100 e 150 mg kg<sup>-1</sup> de Cu (Figura 5 (b)). O número de nós obtido foi de 16, 16, 14 e 14 nós para as videiras cultivadas com adição de Cu de 0, 50, 100 e 150 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Não houve efeito significativo para a inoculação de FMA e também não ocorreu efeito de interação entre os fatores avaliados.

### ***Pigmentos fotossintéticos***

O conteúdo de clorofila total apresentou efeito de interação entre inoculação de FMA x calagem e também entre adição de Cu x calagem (Figura 6). O conteúdo de clorofila total foi 13% maior nas videiras cultivadas em substrato com adição de calagem e sem inoculação de FMA em comparação com as videiras cultivadas em substrato com adição de calagem e inoculação de FMA. Para as videiras cultivadas em substrato sem a adição de calagem, a inoculação de FMA não interferiu no conteúdo de clorofila total (Figura 6 (a)).

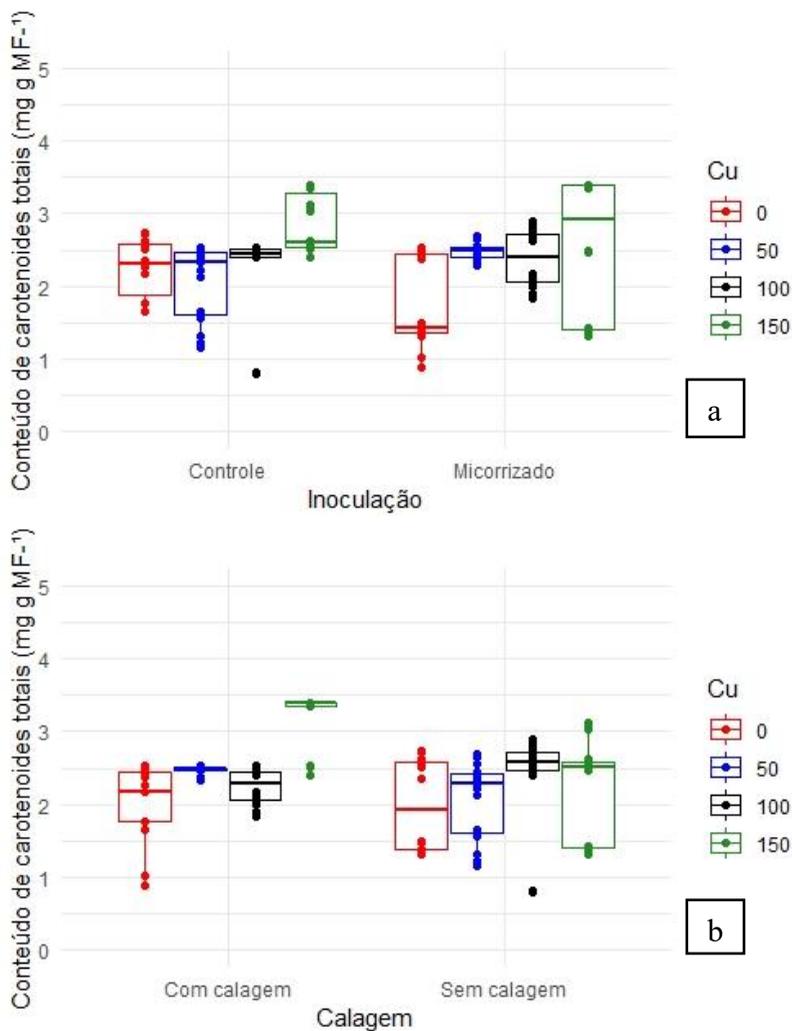


**Figura 6.** Conteúdo de clorofila total (mg g MF<sup>-1</sup>) – interação entre inoculação de FMA e calagem (a), interação entre o conteúdo de Cu e calagem (b), em folhas do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu.

As videiras cultivadas em substrato com a adição de calagem e adição de 100 mg kg<sup>-1</sup> de Cu apresentaram maior conteúdo de clorofila total em comparação com as videiras cultivadas em substrato com adição de calagem e adição de 0, 50 e 150 mg kg<sup>-1</sup> de Cu (Figura 6 (b)).

O conteúdo de clorofila total foi menor nas videiras cultivadas em substrato sem a adição de calagem e adição de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu quando em comparação com as videiras cultivadas em substrato sem a adição de calagem e adição de 0, 50 e  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu (Figura 6 (b)).

O conteúdo de carotenoides totais das folhas das videiras apresentou interação significativa para os fatores adição de Cu no substrato x inoculação de FMA e também para os fatores adição de calagem x adição de Cu no substrato (Figura 7). Não houve efeito de interação entre os fatores adição de calagem no substrato x inoculação das videiras com FMA.



**Figura 7.** Conteúdo de carotenoides totais ( $\text{mg g MF}^{-1}$ ) - interação entre o conteúdo de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) e a inoculação de FMA (a), interação entre o conteúdo de Cu e a calagem (b), em folhas do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu.

O conteúdo de carotenoides totais foi maior para as videiras cultivadas sem inoculação de FMA e com adição de  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu

no substrato em comparação com as videiras cultivadas sem a inoculação de FMA e a adição de 0, 50 e 100 mg kg<sup>-1</sup> de Cu no substrato (Figura 7 (a)).

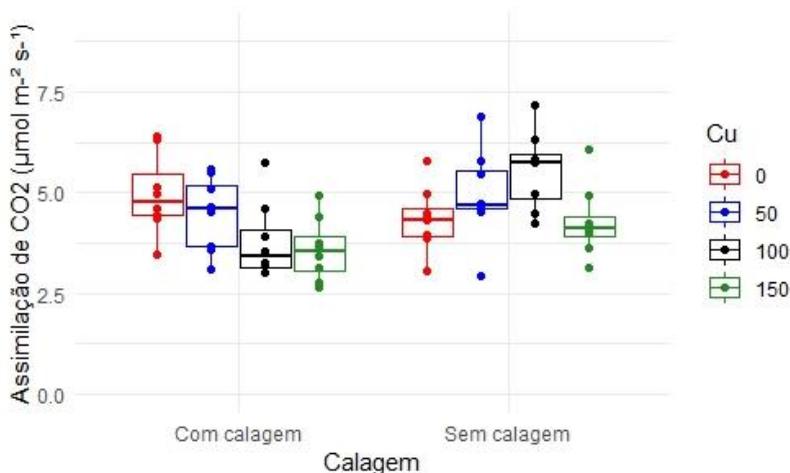
Para as videiras micorrizadas, o teor de carotenoides totais foi menor naquelas cultivadas em substrato sem adição de Cu em comparação com as videiras micorrizadas cultivadas em substrato com a adição de 50, 100 e 150 mg kg<sup>-1</sup> de Cu (Figura 7 (a)).

O conteúdo de carotenoides totais foi maior nas folhas das videiras cultivadas em substrato com a adição de calagem e adição de 150 mg kg<sup>-1</sup> de Cu em comparação com as videiras cultivadas em substrato com adição de calagem e adição de Cu de 0, 50 e 100 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 7 (b)).

Nas folhas das videiras cultivadas em substrato sem a adição de calagem, o conteúdo de carotenoides totais não variou significativamente com a adição de Cu no substrato (Figura 7 (b)).

### ***Parâmetros de trocas gasosas***

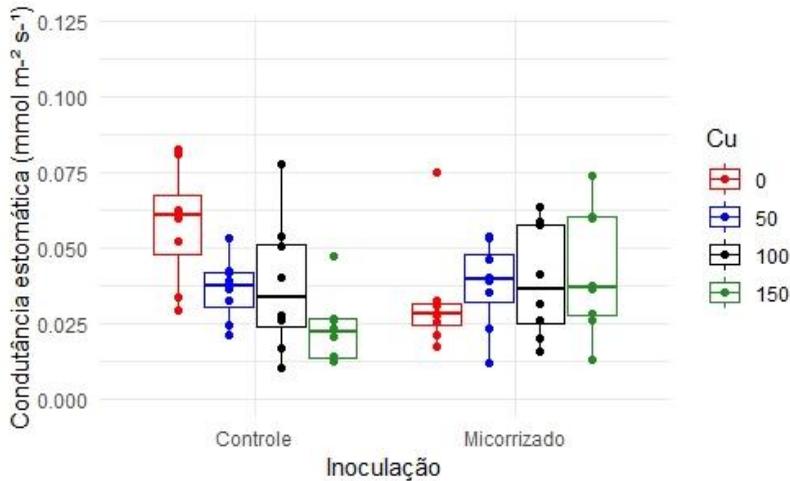
A assimilação de CO<sub>2</sub> (As) mensurada nas folhas das videiras apresentou interação significativa entre os fatores adição de calagem e adição de Cu no substrato (Figura 8). A assimilação de CO<sub>2</sub> foi maior nas videiras cultivadas em substrato com adição de calagem e sem adição de Cu ou com adição de 50 mg kg<sup>-1</sup>, sendo 4,96 e 4,47 μmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente, em comparação com as videiras cultivadas em substrato com adição de calagem e adição de 100 e 150 mg kg<sup>-1</sup> de Cu, sendo 3,78 e 3,58 μmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente, o que evidencia que o aumento do conteúdo de Cu no substrato prejudicou a assimilação de CO<sub>2</sub> nas videiras que receberam calagem.



**Figura 8.** Assimilação de CO<sub>2</sub> (µmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>) - interação entre o conteúdo de Cu (mg kg<sup>-1</sup>) e calagem, em folhas do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu.

A assimilação de CO<sub>2</sub> obtida nas folhas das videiras cultivadas sem a adição de calagem e sem a adição de Cu ou com a adição de 150 mg kg<sup>-1</sup> foi menor em comparação com as videiras cultivadas sem a adição de calagem e com a adição de 50 e 100 mg kg<sup>-1</sup> de Cu no substrato (Figura 8). É possível observar que a assimilação de CO<sub>2</sub> aumentou com a adição de Cu no substrato até 100 mg kg<sup>-1</sup>, mas teve um decréscimo quando o substrato recebeu a adição de 150 mg kg<sup>-1</sup> de Cu.

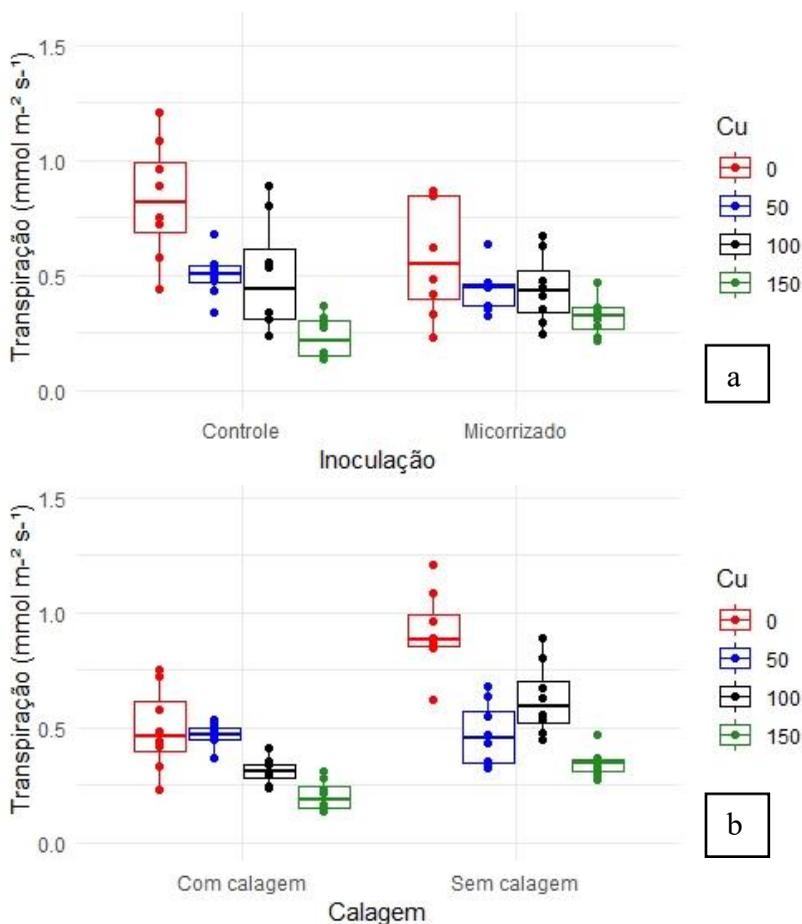
A condutância estomática (gs) apresentou efeito de interação entre os fatores inoculação de FMA e adição de Cu no substrato (Figura 9). A condutância estomática obtida nas videiras não inoculadas apresentou decréscimo de 60% com a adição de 150 mg kg<sup>-1</sup> de Cu no substrato comparativamente a quando não houve adição de Cu. Nas videiras não inoculadas, a maior condutância estomática foi obtida quando não houve adição de Cu no substrato e a menor condutância estomática foi obtida quando houve a adição de 150 mg kg<sup>-1</sup> de Cu.



**Figura 9.** Condutância estomática ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) - interação entre o conteúdo de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) e inoculação de FMA, em folhas do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu.

Nas videiras que receberam a inoculação de FMA, a condutância estomática encontrada foi ligeiramente menor naquelas cultivadas em substrato sem a adição de Cu (Figura 9). É possível observar que nas videiras que receberam inoculação de FMA, não houve decréscimo da condutância estomática com a adição de Cu no substrato como aconteceu naquelas que não foram inoculadas com FMA.

A transpiração ( $T_r$ ) mensuradas nas folhas das videiras apresentou interação significativa para os fatores inoculação de FMA e adição de Cu no substrato, e também entre os fatores adição de calagem e adição de Cu no substrato (Figura 10).



**Figura 10.** Transpiração ( $\text{mmol m}^2 \text{s}^{-1}$ ) - interação entre o conteúdo de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) e inoculação de FMA (a), interação entre o conteúdo de Cu e calagem (b), em folhas do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu.

Nas videiras cultivadas sem a inoculação de FMA, a adição de Cu no substrato provocou diminuição da transpiração, sendo a maior transpiração encontrada nas videiras cultivadas em substrato sem a adição de Cu e a menor transpiração encontrada nas videiras cultivadas em

substrato com adição de  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu, representando um decréscimo de 59% (Figura 10 (a)).

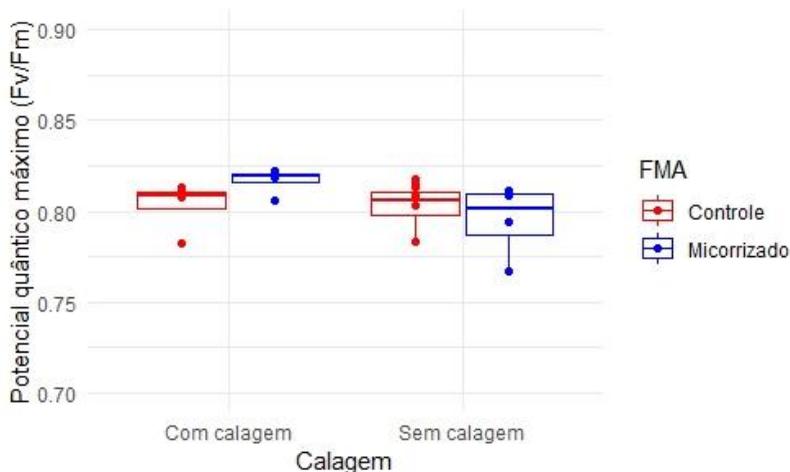
As videiras que receberam inoculação de FMA apresentaram menor transpiração quando foram cultivadas em substrato com adição de  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu em comparação com as videiras que foram cultivadas em substrato sem a adição de Cu ou com a adição de 50 e  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  (Figura 10 (a)).

A adição de Cu no substrato também diminuiu a transpiração para as videiras cultivadas em substrato com a adição de calagem (Figura 10 (b)). Para as videiras cultivadas em substrato com a adição de calagem, a maior transpiração foi encontrada nas videiras cultivadas em substrato sem adição de Cu ou com adição de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ , enquanto a menor transpiração foi encontrada nas videiras cultivadas em substrato com a adição de  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu.

Nas videiras cultivadas sem adição de calagem no substrato, a maior transpiração foi encontrada quando não houve adição de Cu e a menor quando houve a adição de  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  (Figura 10 (b)).

### ***Parâmetros fotoquímicos***

O potencial quântico máximo do PSII (Fv/Fm) apresentou interação significativa entre a inoculação das videiras com FMA e a adição de calagem no substrato (Figura 11). As videiras cultivadas em substrato com a adição calagem e inoculação de FMA apresentaram Fv/Fm 1,7% maior em comparação com as videiras cultivadas em substrato com adição de calagem e sem a inoculação de FMA.

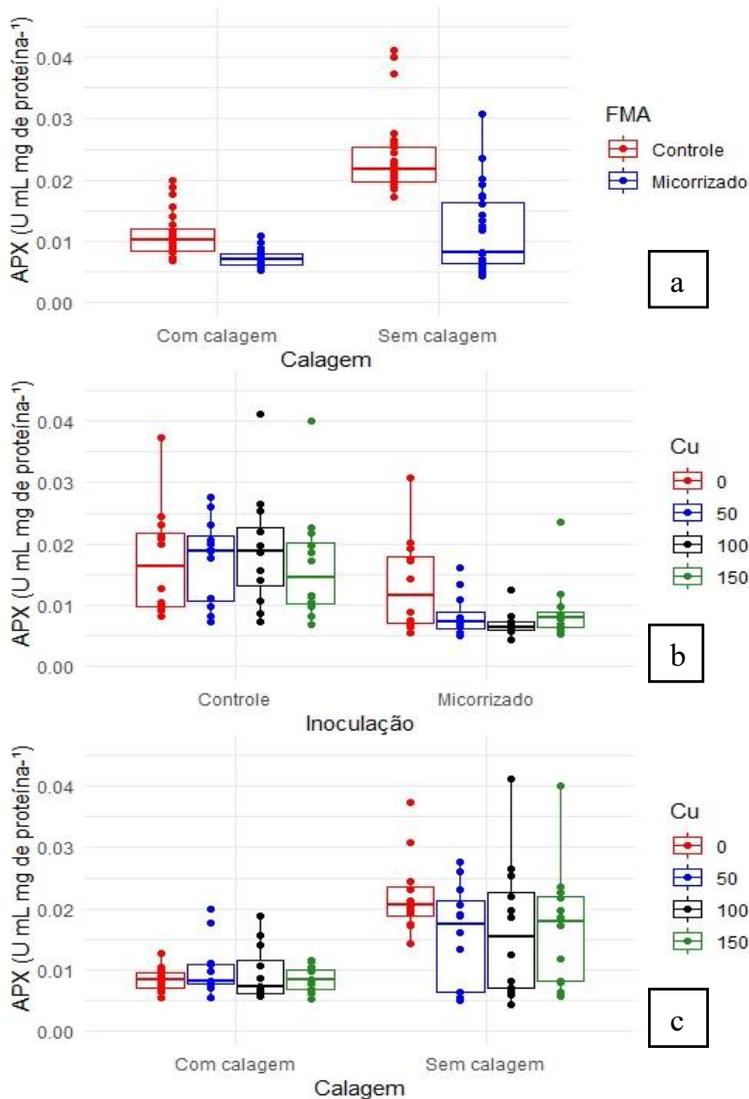


**Figura 11.** Potencial quântico máximo - interação entre inoculação de FMA e calagem, em folhas do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu.

Para as videiras cultivadas em substrato sem adição de calagem, a inoculação de FMA não foi significativa (Figura 11). O potencial quântico efetivo do PSII (Yield (II)) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) não apresentaram diferença significativa para os tratamentos.

***Atividade das enzimas antioxidantes: APX (E.C. 1.11.1.11), CAT (E.C. 1.11.1.6), POD (E.C. 1.11.1.7), SOD (E.C. 1.15.1.1)***

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) apresentou interação significativa para os fatores calagem x inoculação de FMA, adição de Cu x inoculação de FMA e adição de Cu x calagem (Figura 12). Tanto para as videiras cultivadas em substrato com adição de calagem, quanto para as videiras cultivadas em substrato sem a adição de calagem, a inoculação das videiras com FMA resultou em menor atividade de APX em comparação com as videiras não inoculadas, sendo esse decréscimo de 36 % e 51 %, com e sem calagem, respectivamente (Figura 12 (a)).

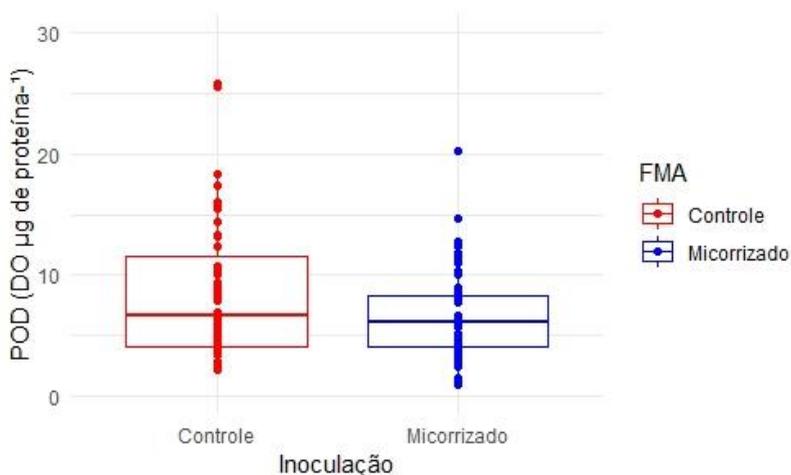


**Figura 12.** Atividade de APX (U mg de proteína<sup>-1</sup>) - interação entre inoculação de FMA e calagem (a), interação entre o conteúdo de Cu e inoculação de FMA (b), interação entre o conteúdo de Cu e calagem (c), em raízes do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu.

A inoculação das videiras com FMA resultou em menor atividade de APX sempre que houve adição de Cu no substrato, em comparação com as videiras não inoculadas com FMA (Figura 12 (b)).

Sempre que as videiras foram cultivadas em substrato com a adição de calagem, a atividade de APX foi menor em comparação às videiras cultivadas em substrato sem adição de calagem, mesmo com a adição ou não de Cu (Figura 12 (c)).

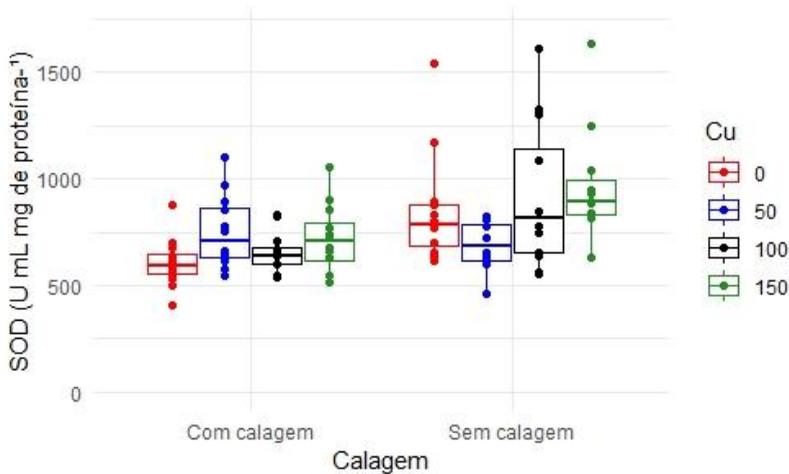
A atividade de guaiacol peroxidase (POD) foi significativa apenas para a inoculação de FMA (Figura 13). As videiras inoculadas com FMA apresentaram atividade de POD 26 % menor em comparação com as videiras que não receberam inoculação.



**Figura 13.** Atividade de POD (DO de proteína<sup>-1</sup>) – efeito da inoculação de FMA, em raízes do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) apresentou interação entre os fatores adição de calagem e adição de Cu no substrato (Figura 14). A atividade da SOD foi menor nas videiras cultivadas em substrato com adição de calagem quando em comparação com as videiras cultivadas em substrato sem a adição de calagem. Ainda, é possível observar que a maior atividade de SOD foi encontrada nas videiras

cultivadas em substrato sem adição de calagem e com adição de 150 mg kg<sup>-1</sup> de Cu.



**Figura 14.** Atividade de SOD (U ml mg de proteína<sup>-1</sup>) – interação entre o conteúdo de Cu e calagem, em raízes do porta-enxerto de videira “Paulsen 1103” cultivado em substrato com e sem calagem, com e sem inoculação de FMA e submetidas a contaminação por elevado teor de Cu.

## DISCUSSÃO

As videiras apresentaram redução de matéria seca, altura de planta, número de nós e de folhas, com o aumento da toxicidade de cobre e para a ausência de calagem. Essa diminuição era esperada em consequência da sensibilidade das videiras jovens ao elevado teor de Cu no substrato.

Altos teores de Cu causam diminuição do alongamento das raízes, provocam má formação e alterações na organização das células do córtex e da epiderme (Chen et al., 2013). Os danos ao sistema radicular afetam negativamente a absorção de água e nutrientes, o que justifica a redução nos parâmetros de crescimento das videiras cultivadas em substrato sem calagem e com elevados conteúdos de Cu (Lequeux et al., 2010; Kopittke, et al., 2011).

A adição de calagem no substrato foi capaz de reduzir o Cu disponível

A adição de calagem no substrato foi capaz de amenizar o efeito tóxico do excesso Cu e contribuiu com um melhor desempenho dos parâmetros de crescimento, parâmetros fotossintéticos, pigmentos fotossintetizantes e atividade de enzimas antioxidantes nas videiras. Com o aumento do valor de pH do substrato, obtido pela aplicação da calagem, aumenta a probabilidade de complexação do  $\text{OH}^-$  com o Cu, formando um precipitado na solução do substrato. Além disso, ocorre a desprotonação de grupos funcionais, aumentando a CTC e potencializando a adsorção de Cu (Agbenin & Olojo, 2004; Joris et al., 2012).

Neste estudo a adição de  $3 \text{ Mg kg}^{-1}$  de calcário diminuiu o teor de Cu disponível no solo em 27.6 %, 53 % e 47 % para a adição de 50, 100 e  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu, respectivamente (tabela 1).

Ainda, há mais cátions presentes no solo, entre eles o Ca e o Mg, que podem competir com o Cu na absorção pelas raízes. Com isso, pode haver a redução da absorção do Cu, ou da entrada dele no simplasto, em detrimento de outros cátions (Kopittke et al., 2011).

É sabido também que, a inoculação com FMA aumenta a disponibilidade de P para as plantas simbiotes (Cabral et al., 2015). Maior disponibilidade do nutriente às videiras, melhorou o estado nutricional das plantas, resultando em maior produção de biomassa das videiras, no presente estudo.

A aplicação da calagem e a simbiose das videiras, neste estudo com os FMA atuaram na melhoria da nutrição das videiras, principalmente por P, Ca e Mg. É importante lembrar que o P que é um constituinte essencial das células, participando ativamente na fotossíntese, na respiração, no armazenamento de energia e no alongamento e divisão celular (Gupta et al., 2014).

Além disso, o aumento da absorção de P pode promover a redução da translocação de Cu por provocar a retenção do Cu nas raízes através de ligações metal-fosfato (Cabral et al., 2015). Assim, a toxicidade ocasionada pelo excesso de Cu é amenizada, visto que as plantas mantêm uma menor concentração do metal nos órgãos fotossintéticos, como a parte aérea, a qual é mais sensível; e armazenam a maioria do excesso do metal em órgãos menos sensíveis, como as raízes (Yang et al., 2011;

Ambrosini et al., 2015), contribuindo para o maior produção de biomassa das plantas de videira nesse estudo.

A aplicação da calagem e a inoculação do fungo micorrízico *R. clarus* foram estratégias promissoras para a redução da toxicidade de Cu para as videiras. Ficou evidenciado que a calagem melhorou o estado nutricional das videiras estudadas e aumentou a tolerância ao alto conteúdo de Cu.

Embora o aumento do conteúdo de Cu no substrato tenha afetado drasticamente a colonização micorrízica das raízes, ainda assim, pode-se afirmar que a inoculação de *R. clarus* apresentou elevada colonização micorrízica nas videiras, possibilitando a formação de grande número de hifas que aumentam o volume de solo explorado (Cabral et al., 2015). Isto potencializa a quantidade de nutrientes absorvidos pelas plantas, principalmente o P (Ambrosini et al., 2015).

O aumento da concentração de P em folhas estimula a fotofosforilação e a atividade da ATPase, que inclusive podem ser inibidas em baixa concentração de P em folhas, provocando a diminuição da taxa fotossintética em plantas (Paul & Pellny, 2003). Possivelmente parte do P absorvido pelas videiras foi transportado para a parte aérea na forma de fosfato, sendo, no tecido, componente de compostos como açúcares fosfatados, incluindo glicose e frutose, fosfolipídios de membranas, adenosina trifosfato (ATP) e ácidos nucleicos (Marschner, 2012). Somado a isso, o fosfato é fundamental na regulação do processo fotossintético, onde a taxa de produção de sacarose, amido e aminoácidos podem determinar a taxa em que o P inorgânico é reciclado para ser novamente usado na fotossíntese (Paul & Pellny, 2003).

Plantas cultivadas em substratos com elevada concentração de metais pesados, geralmente apresentam redução do conteúdo de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides (Cambrollé et al., 2015; Tiecher et al., 2017; 2018). No presente estudo essa diminuição ficou mais evidente quando as videiras foram cultivadas em substrato sem adição de calagem. Esta redução pode estar relacionada à maior disponibilidade de Cu na solução e consequente translocação do Cu para a parte aérea, como as folhas, onde o Cu pode substituir o Mg na molécula de clorofila, prejudicando a fotossíntese (Yruela, 2009). Aliado a isto, o Cu em excesso pode provocar a degradação da estrutura e do conteúdo interno do cloroplasto (Ciscato et al., 1997), resultando em redução nos teores de pigmentos fotossintéticos e, conseqüentemente, da captação de energia pelas plantas.

As espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo o  $H_2O_2$  e os radicais  $HO^\cdot$  e  $O_2^\cdot$ , formam-se naturalmente no interior das células, principalmente nos cloroplastos e mitocôndrias (Ferreira et al., 2015), devido ao transporte de elétrons e a respiração celular (CTE), respectivamente. No entanto, a produção de EROs pode ser aumentada drasticamente em condições de altos teores de Cu no substrato, podendo causar toxicidade através da reação com outras moléculas, ocasionando a peroxidação lipídica, e na atividade de enzimas ligadas à membrana (Del Río et al., 2006). Quando ocorre aumento na formação de EROs, a estratégia utilizada pelas plantas é a ativação do sistema antioxidante enzimático (Gill & Tuteja, 2010), sendo que as enzimas APX, CAT, POD e SOD, fazem parte do sistema de defesa primário das plantas para a eliminação de radicais  $O_2^\cdot$  e  $H_2O_2$ . Nesse estudo ficou evidente a diminuição da atividade dessas enzimas a partir da adição de calagem no substrato e da inoculação das plantas com *R. clarus*.

## CONCLUSÃO

A prática da calagem e a inoculação das videiras com FMA são estratégias eficazes na proteção das videiras à toxicidade de Cu. Ambas as práticas contribuíram para melhor desempenho no crescimento, melhor funcionamento do aparato fotossintético e menor atividade das enzimas antioxidantes. O aumento do conteúdo de cobre no substrato foi prejudicial na maioria dos fatores analisados, mas em muitos casos, a calagem e a inoculação de FMA foram capazes de amenizar ou até mesmo neutralizar os efeitos maléficos da toxicidade de cobre no substrato, apesar do cobre ter afetado drasticamente a colonização micorrízica das raízes das videiras.

## REFERÊNCIAS

AGBENIN, J. O.; OLOJO, L. A. Competitive adsorption of copper and zinc by a Bt horizon of a savanna Alfisol as affected by pH and selective removal of hydrous oxides and organic matter. **Geoderma** v. 119, n. 1, p. 85–95, 2004.

AMBROSINI, V. G.; ROSA, D. J. ; PRADO, J. P. C. ; BORGHEZAN, M. ; MELO, G. W. B. ; SOARES, C. R. F. S. ; COMIN, J. J. ; SIMÃO, D. G. ; BRUNETTO, G. Reduction of copper phytotoxicity by liming: a study of the root anatomy of young vines (*Vitis labrusca L.*). **Plant Physiology and Biochemistry (Paris)**, v. 96, p. 270-280, 2015.

BATES, D.; KLIEGL, R.; VASISHTH, S.; BAAYEN, H. **Parsimonious Mixed Models**. Cornell University, v. 2, 2018.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of proteins utilizing the principle of protein dye binding. **Anal of Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

BRUNETTO, G., MELO, G.W.B., TERZANO, R., DEL BUONO, D., ASTOLFI, S., TOMASI, N., PII, Y., MIMMO, T., CESCO, S. Copper accumulation in vineyard soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity. **Chemosphere**, v. 162, p. 293–307, 2016.

CABRAL, L.; SOARES, C. R. F. S.; GIACHINI, A. J.; SIQUEIRA, J. A. Arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated areas by trace elements: mechanisms and major benefits of their applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 31, p. 1655-1664, 2015.

CAMBROLLÉ, J.; GARCÍA, J.L.; FIGUEROA, M. E.; CANTOS, M. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. **Chemosphere**, v. 120C, p. 171–178, 2015.

CHEN, P.; LEE, Y.; CHEN, B. C.; JUANG, K. W. Effects of calcium on rhizotoxicity and the accumulation and translocation of copper by grapevines. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 73, p. 375-382, 2013.

CISCATO, M., VALCKE, R., VAN LOVEN, K., CLIJSTERS, H., NAVARI-IZZO, F. Effects of in vivo copper treatment on the photosynthetic apparatus of two *Triticum durum* cultivars with different stress sensitivity. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 901–908, 1997.

CORNEJO, P.; PÉREZ-TIENDA, J.; MEIER, S.; VALDERAS, A.; BORIE, F.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 57, p. 925-928, 2013.

DEL RÍO, L.A., SANDALIO, L.M., CORPAS, F.J., PALMA, J.M., BARROSO, J.B. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes: production, scavenging, and role in cell signaling. **Physiologia Plantarum**, v. 141, p. 330–335, 2006.

DUBOIS, M; GILLEWS, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBER, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v.28, n.3, p. 350-6, 1956.

FERREIRA, P. A. A.; CERETTA, C. A.; SORIANI, H. H.; TIECHER, T. L.; SOARES, C. R. F. S.; ROSSATO, L. V.; NICOLOSO, F. T.; BRUNETTO, G.; PARANHOS, J. T.; CORNEJO, P. *Rhizophagus clarus* and phosphate alter the physiological responses of *Crotalaria juncea* cultivated in soil with a high Cu level. **Applied Soil Ecology**, v. 91, p. 37-47, 2015.

GILL, S.S., TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909–930, 2010.

GIOVANNETTI MOSSE, M.; B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v. 84, p. 489-500, 1980.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

GIROTTO, E.; CERETTA, C.A.; LOURENZI, C.R.; LORENSINI, F.; TIECHER, T.L.; VIEIRA, R.C.B.; TRENTIN, G.; BASSO, C.J.; MIOTTO, A.; BRUNETTO, G. Nutrient transfers by leaching in a no-tillage system through soil treated with repeated pig slurry applications. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 95, p.115-131, 2013.

GUPTA M, BISHT S, SINGH S, GULATI A, TEWARI R. Enhanced biomass and steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* treated with phosphate-solubilizing bacteria and rock phosphate. **Plant Growth Regulation**, v. 65, p. 447–449, 2014.

KOPITTKE, P. M.; KINRAIDE, T. B.; WANG, P.; BLAMEY, F. P. C.; REICHMAN, S. M.; MENZIES, N. W. Alleviation of Cu and Pb rhizotoxicities in cowpea (*Vigna unguiculata*) as related to ion activities at root-cell plasma membrane surface. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 11, p. 4966–4973, 2011.

LEQUEUX, H.; HERMANS, C.; LUTTS, S.; VERBRUGGEN, N. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 8, p. 673–682, 2010.

MARSCHNER, P. **Mineral Nutrition of Higher Plants**, p. 672, 2012.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 659-668, 2000.

MCCREADY, R.M., GUGGOLZ, J., SILVIERA, V. & OWENS, H.S. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. Application to peas. **Analytical Chemistry**, v.22, p.1156-1158, 1950.

MEYER, E.; MORALES-LONDOÑO, D. M.; ARMAS, R.D.; GIACHINI, A.J.; ROSSI, M.J.; Stoffel, S.C.G.; SOARES, CLÁUDIO R. F. S. Arbuscular mycorrhizal fungi in the growth and extraction of trace elements by *Chrysopogon zizanioides* (vetiver) in a substrate containing coalmine wastes. **International Journal of Phytoremediation**, v.19, p. 113-120, 2016.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E. M.; KUĆ, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, n. 1, p. 73-82, 1982.

HISCOX, J.D.; ISRAELSTAM, G.F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v.57, p. 1332–1334, 1979.

JANICKA-RUSSAK M, KABAŁA K, BURZYŃSKI M, KŁOBUS G. Response of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase to heavy metal stress in *Cucumis sativus* roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 3721–3728, 2008.

JORIS, H.; FONCECA, A. F. da; ASAMI, W. Y.; BRIEDIS, C.; BORSZOWSKI, P.R.; GERBUIO, F.J. Adsorção de metais pesados após calagem superficial em um Latossolo Vermelho sob sistema de plantio direto. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, p. 1–10, 2012.

JUANG, K. W.; LEE, Y. I.; LAI, H. Y.; CHEN, B. C. Influence of magnesium on copper phytotoxicity to and accumulation and translocation in grapevines. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 36–42, 2014.

KOPITTKE, P. M.; KINRAIDE, T. B.; WANG, P.; BLAMEY, F. P. C.; REICHMAN, S. M.; MENZIES, N. W. Alleviation of Cu and Pb rhizotoxicities in cowpea (*Vigna unguiculata*) as related to ion activities at root-cell plasma membrane surface. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 11, p. 4966–4973, 2011.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, v. 34, p. 713-721, 1993.

KOSKE, R. E.; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhiza. **Mycological Research**, v. 92, p. 486-505, 1989.

PAUL, M. J., PELLNY, T. K. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 5, p. 539–547, 2003.

PEIXOTO, P. H. P., CAMBRAIA, J., SANT'ANNA, R., MOSQUIM, P. R., & MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.

ROSA, D. J.; AMBROSINI, V. G.; BRUNETTO, G.; SOARES, C. R. F. S.; BORGHEZAN, M.; PESCADOR, R. Parâmetros fisiológicos em videiras 'Paulsen 1103' (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares em solo contaminado com cobre. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v.31, p.14 - 23, 2016.

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

SOIL SURVEY STAFF. **Soil Taxonomy: A Basic System of Soil Classification for Making and interpreting Soil Surveys**, 2nd ed. US Government Printing Office, Washington DC, 2006.

TIECHER, T.L., TIECHER, T., CERETTA, C.A., FERREIRA, P.A.A., NICOLOSO, F.T., SORIANI, H.H., DE CONTI, L., KULMANN, M.S.S., SCHNEIDER, R.O., BRUNETTO, G. Tolerance and translocation of heavy metals in young grapevine (*Vitis vinifera*) grown in sandy acidic soil with interaction of high doses of copper and zinc. **Scientia Horticulturae**, v. 222, p. 203–212, 2017.

TIECHER, T.L., SORIANI, H.H., TIECHER, T., CERETTA, C.A., NICOLOSO, F.T., TAROUCO, C.P., CLASEN, B.E., DE CONTI, L., TASSINARI, A., MELO, G.W.B., BRUNETTO, G. The interaction of high copper and zinc doses in acid soil changes the physiological state and development of the root system in young grapevines (*Vitis vinifera*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 985–994, 2018.

YANG, Y.; SUN, C.; YAO, Y.; ZHANG, Y.; ACHAL, V. Growth and physiological responses of grape (*Vitis vinifera* “Combier”) to excess zinc. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 4, p. 1483–1491, 2011.

YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 145-156, 2005.

YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v. 36, n. 5, p. 409–430, 2009.

WELLBURN, A.R. Determination of chlorophyll-a and chlorophyll-b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal Plant Physiology**, v.144, p.307–313, 1994.



**CAPÍTULO 2.****DESEMPENHO E ESTABILIZAÇÃO DE INOCULANTE  
MICORRÍZICO COMERCIAL NA VITICULTURA**



## DESEMPENHO E ESTABILIZAÇÃO DE INOCULANTE MICORRÍZICO COMERCIAL NA VITICULTURA

### RESUMO

O fósforo é um nutriente crítico e insubstituível na nutrição das plantas, portanto, a disponibilidade desse nutriente pode limitar o crescimento e a produção das plantas em algumas circunstâncias. Uma estratégia potencial para aumentar a eficiência no uso do fósforo é a inoculação das raízes das videiras com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Essa simbiose pode fornecer uma porcentagem significativa dos requisitos de fósforo de uma planta, bem como, potencialmente, acessar o fósforo que o hospedeiro não pode alcançar. Para isso, são amplamente utilizados inoculantes contendo FMA. No entanto, o benefício dos inoculantes no campo é muitas vezes variável e em alguns casos, o seu uso pode introduzir estirpes que não são benéficas para o sistema, resultando potencialmente em uma invasão por fungos micorrízicos exóticos. Ainda há muitas perguntas não respondidas sobre sua eficácia, estabilização da comunidade fúngica e espalhamento para outras áreas e culturas. O estudo objetivou avaliar o desempenho, estabilização e espalhamento do inoculante comercial de fungos micorrízicos MYKE® PRO GR que contém *Rhizoglossum irregulare* (DAOM 197198) na cultura da videira, desde a produção das mudas em casa de vegetação até o cultivo a campo. A inoculação de FMA contribuiu no aumento da produção de matéria seca em 24% e aumento da área foliar em 13%, quando em casa de vegetação, mas não teve efeito a campo. A comunidade de FMA inoculada se estabilizou no campo e houve espalhamento para plantas não inoculadas. A pré-inoculação das videiras com FMA não se mostrou vantajosa para as condições reais de vinhedos.

**Palavras-chave:** DAOM 197198; ddPCR; *Vitis*; inoculante; *Rhizoglossum irregulare*.

### ABSTRACT

Phosphorus is a critical and irreplaceable nutrient in plant nutrition, so the availability of this nutrient may limit the growth and production of plants in some circumstances. A potential strategy to increase efficiency in the use of phosphorus is the inoculation of vines roots with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). This symbiosis can provide a significant

percentage of a plant's phosphorus requirements, as well as potentially access phosphorus that the host cannot reach. For this, AMF-containing inoculants are widely used. However, the benefit of inoculants in the field is often variable, and in some cases, their use may introduce strains that are not beneficial to the system, potentially resulting in an invasion by exotic mycorrhizal fungi. There are still many unanswered questions about its effectiveness, stabilization of the fungal community and spreading to other areas and cultures. This study aimed to evaluate the performance, stabilization and spreading of the commercial inoculant of mycorrhizal fungi MYKE® PRO GR containing *Rhizoglosum irregulare* (DAOM 197198) on grapevine production, from the production of seedlings from the greenhouse to field cultivation. AMF inoculation contributed to increasing dry matter production by 24% and leaf area increase by 13% when in the greenhouse but had no field effect. The inoculated AMF community stabilized in the field and spread to uninoculated plants. Pre-inoculation of vines with FMA did not prove to be advantageous for the actual conditions of vineyards.

**Keywords:** DAOM 197198; ddPCR; *Vitis*; inoculant; *Rhizoglosum irregulare*.

## INTRODUÇÃO

O fósforo é um nutriente crítico e insubstituível na nutrição das plantas, portanto, a disponibilidade deste nutriente pode limitar o crescimento e a produção das plantas em algumas circunstâncias (Vitousek et al., 2010). Porém, estima-se que as plantas absorvem apenas 15 a 30% dos nutrientes aplicados atualmente no campo (Cordell & White, 2013). Pensando nisso, uma estratégia potencial para aumentar a eficiência no uso do fósforo é a inoculação das raízes das videiras com fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

Os FMA são simbioses obrigatórias de raízes que se associam à maioria das plantas, incluindo as videiras, e fornecem nutrientes, principalmente fósforo, para a planta hospedeira em troca de carbono (Smith & Read, 2008). Essa simbiose pode fornecer uma porcentagem significativa dos requisitos de fósforo de uma planta, bem como potencialmente acessar o fósforo que o hospedeiro não pode alcançar (Smith & Read, 2008).

Para otimizar a simbiose entre as videiras e os FMA, pode-se aumentar a abundância dos fungos ou adicionar mais estirpes benéficas por meio de inoculantes que contenham fungos micorrízicos. No entanto,

o benefício dos inoculantes no campo é muitas vezes variável e, em alguns casos, o seu uso pode introduzir estirpes que não são benéficas para o sistema, resultando potencialmente em uma invasão por fungos micorrízicos exóticos.

Apesar do uso de inoculantes ser uma prática comum e frequente na viticultura canadense, ainda há muitas perguntas não respondidas sobre sua eficácia, estabilização da comunidade fúngica e espalhamento para outras áreas e culturas.

Vários fatores podem interferir no sucesso da colonização micorrízica, como, por exemplo, as propriedades físicas e químicas do solo, que podem ser um dos principais determinantes da presença e abundância de estirpes de fungos nativos (Oehl et al., 2010, Hazard et al., 2013). Ainda, a disponibilidade elevada de fósforo e de nitrogênio no solo, típicos de muitos sistemas agrícolas convencionais, podem inibir a simbiose (Egerton-Warburton & Allen, 2000).

Para uma ampla recomendação de uso, os isolados comerciais são selecionados por sua natureza generalista, como é o caso de *R. irregulare* DAOM 197198, usado neste estudo, que foi capaz de se estabelecer com sucesso em solos com uma ampla gama de características químicas (Köhl et al., 2016).

Mesmo que o inoculante tenha capacidade de se estabelecer em várias culturas e condições de solo (Köhl et al., 2016), isso não assegura que o uso do inoculante trará vantagens no cultivo da videira, tampouco isenta a preocupação com possíveis problemas biológicos.

Uma das preocupações que devemos ter ao usar um inoculante é a possibilidade de dispersão para outros locais. Uma vez introduzido na área, os esporos de fungos podem ser dispersos por uma ampla gama de vetores, como, por exemplo: insetos, ratos e ventos (Camargo-Ricalde, 2002), com uma gama igualmente ampla de potenciais distâncias de dispersão que podem atingir até 2 quilômetros (Zaharick et al., 2015).

Outra forma de dispersão é a disseminação hifálica do fungo, que através do crescimento de corredores de hifas formam infecções secundárias em hospedeiros próximos (Friese & Allen, 1991). Nos fungos micorrízicos, a disseminação de hifas pode alcançar taxas de 3,2 metros por ano na presença de hospedeiros micorrízicos (Powell, 1979).

Em virtude disso, o estudo objetivou avaliar o desempenho, estabilização e espalhamento do inoculante comercial de fungos micorrízicos MYKE® PRO GR que contém *Rhizogloium irregulare* (DAOM 197198) na cultura da videira, desde a produção das mudas em casa de vegetação até o cultivo a campo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido em casa de vegetação e a campo, ambos no *Agriculture and Agri-food Canada's Summerland Research and Development Centre* (SuRDC) em Summerland, BC, Canadá, (coordenadas 49 ° 33'49.2 "N - 119 ° 38'19.0" W) iniciando em maio de 2015, com duração de três anos.

O experimento consistiu de uma combinação fatorial de dois tratamentos de FMA (com e sem) e seis porta-enxertos dispostos em delineamento inteiramente casualizado. As cultivares de porta-enxertos foram: Riparia Gloire (*Vitis riparia*), 3309 Coudrec (*Vitis riparia x Vitis rupestris*), 101-14 Millardet e Grasset (*Vitis riparia x Vitis rupestris*), Schwarzmann (*Vitis riparia x Vitis rupestris*), Salt Creek (*Vitis champinii*) e 5C Teleki (*Vitis berlandieri x Vitis riparia*). Cada combinação de tratamento teve oito repetições para um total de 96 plantas.

Os porta-enxertos utilizados neste experimento foram obtidos de estacas dormentes, em que cada cultivar porta-enxerto foi cortada em duas gemas, mergulhadas em solução de auxina (1500 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol-3-butírico) por 30 segundos e colocadas em planos úmidos preenchidos com perlita e mantida em câmara de crescimento a 28 °C até formação de calo. Em seguida, dezesseis estacas de cada porta-enxerto foram selecionadas com base no estágio de desenvolvimento do calo, mantido verticalmente em planos úmidos até a indução da raiz. A umidade do ar na sala de crescimento foi diminuindo gradualmente antes que as estacas enraizadas fossem plantadas em vasos.

Depois que as estacas enraizadas foram obtidas, o transplante foi realizado para os vasos de 7,6 litros. Neste momento, foi utilizado o inoculante comercial de fungos micorrízicos MYKE® PRO GR que contém *Rhizogloium irregulare* (DAOM 197198) Schenck & Smith (sinônimo *Rhizophagus irregularis*, *Glomus intraradices*) (Sieverding et al., 2015) para tratar as estacas por aplicação de 15 g (~ 55 esporos) por vaso, adicionado a 5 cm de profundidade. Para as plantas não tratadas com FMA, foi fornecida uma mistura livre de FMA, na mesma quantidade. O meio de crescimento utilizado foi argila expandida (Turface, Profile products LCC). Os vasos foram acomodados em uma casa de vegetação.

Foram fornecidas às plantas, aproximadamente 60 mL (3 x 20 mL) de água todos os dias, usando uma linha circular de 8 emissores dentro de cada vaso para fornecer água uniformemente da superfície ao meio. Uma baixa fertilização fosfatada foi inicialmente aplicada e aumentada junto

com a demanda de nutrientes pelas plantas. As plantas foram fertilizadas manualmente a cada 2 semanas com 60 mL de: (1) solução de 0,42 g L<sup>-1</sup> de 12-2-14 (50 ppm N) durante os primeiros dois meses e (2) 1,5 g L<sup>-1</sup> de 20 -20 -20 (300 ppm N) pelos próximos dois meses. As plantas foram pulverizadas uma vez com enxofre (S) (Kumuluf DF, BASF) para evitar o oídio depois que os vasos foram completamente cobertos com filme plástico.

As estacas enraizadas cresceram por uma estação na estufa e, em seguida, a matéria seca da parte aérea, a área foliar e o número de folhas foram mensurados.

Depois disso, em 2016, as mudas enraizadas foram transplantadas para o campo em 8 blocos, onde cresceram por um ano, e em seguida determinou-se a matéria seca da parte aérea da safra 2017. As videiras cresceram por mais um ano e, nesse momento, foram colhidas na safra de 2018 para a determinação da matéria seca da parte aérea e da raiz. Além disso, as raízes foram submetidas à análise de PCR digital por gota (ddPCR), no Departamento de Biologia da Faculdade de Artes e Ciências Irving K. Barber da *The University of British Columbia*, para avaliar a presença do inóculo comercial nas raízes.

### ***Biomassa, número de folhas e área foliar***

Para a determinação da matéria seca da parte aérea e da raiz, as amostras foram secas a 65 °C até atingir massa constante e, em seguida, a matéria seca foi determinada utilizando-se uma balança de precisão.

A área foliar foi determinada pelo Medidor de Área LI-3100C (Licor-USA), e para a determinação do número de folhas, foi contado manualmente em cada planta.

### ***Extração de DNA***

No momento da colheita, dez amostras de 0,25 g de raízes foram coletadas aleatoriamente em cada sistema radicular das plantas (cada planta) para os seguintes porta-enxertos: Riparia Gloire (*Vitis riparia*); Salt Creek (*Vitis champinii*) e Schwarzmann (*Vitis riparia* x *Vitis rupestris*) e armazenadas a -20 °C para posterior extração do DNA. Todo o DNA foi extraído usando o kit FastDNATM SPIN para solo (MP Biomedicals - USA) e armazenado a -80 °C.

### ***Análise de PCR digital de gotas (ddPCR)***

O DNA extraído das amostras de raízes foi testado para a presença de *R. irregularis* DAOM 197198 usando-se um ensaio ddPCR baseado em sonda no Sistema de PCR de Gotas Digitais Bio-Rad QX100 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Califórnia). Para isso seguiu-se toda a metodologia descrita por Kokkoris (2019).

### ***Métodos estatísticos***

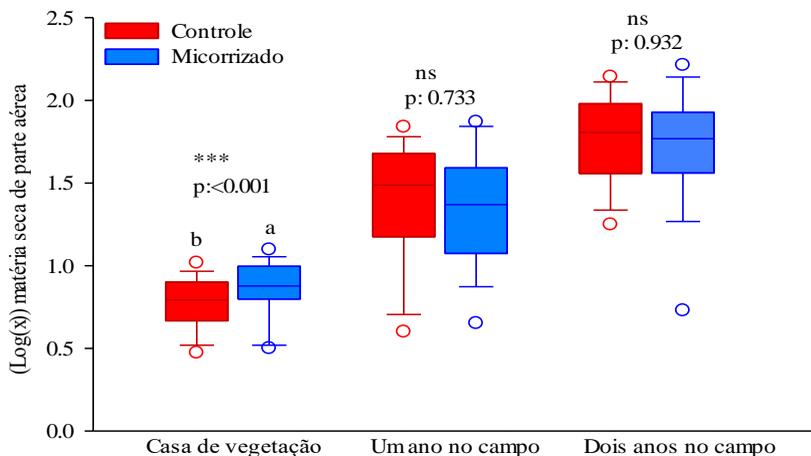
Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o RStudio versão 1.1.383 (R Core Team 2018). Foi utilizado  $\alpha = 0,05$  para todas as análises. Boxplots, bar plots e dot plots foram gerados usando o SigmaPlot Versão 12.3.

O resposta dos porta-enxertos para FMA foi calculada usando a equação  $MR = \ln(Xi/Xn)$  (Hoeksema et al. 2010), onde  $Xi$  é a matéria seca das plantas inoculadas e  $Xn$  é a matéria seca das plantas não inoculadas. Valores positivos indicam incremento no desempenho pela inoculação com FMA.

## **RESULTADOS**

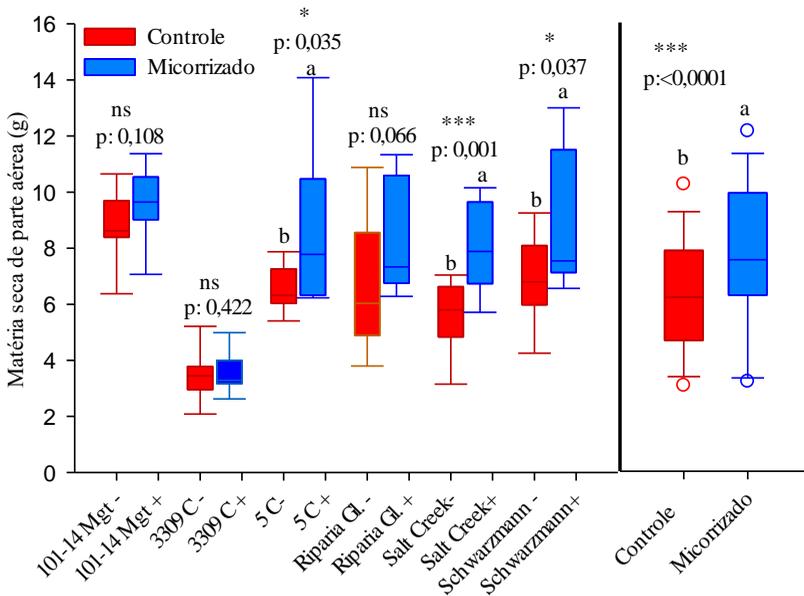
### ***Produção de biomassa e área foliar***

A média de produção de matéria seca de parte aérea foi maior nas videiras pré-inoculadas quando cultivadas em casa de vegetação, que teve o objetivo de produção das mudas (Figura 1). Após o transplante ao campo, tanto no primeiro quanto no segundo ano de cultivo, não houve diferença na produção de matéria seca entre as videiras pré-inoculadas ou não.



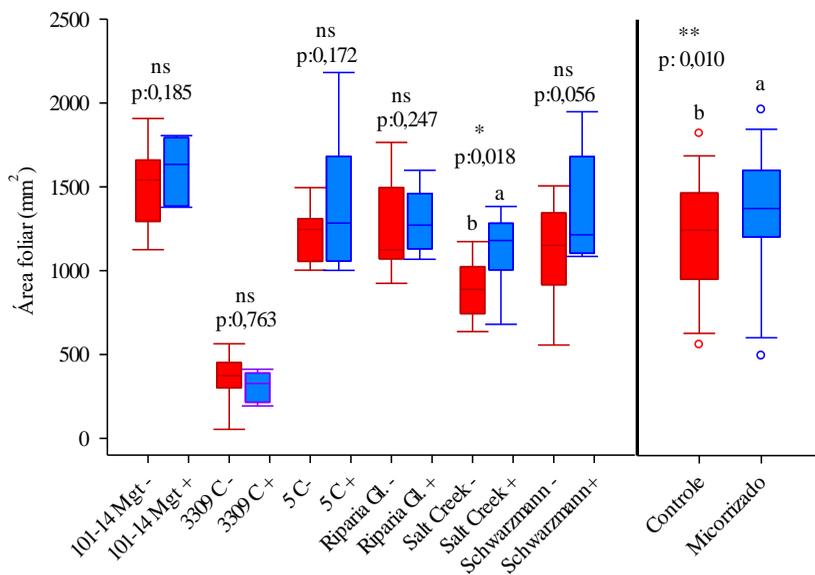
**Figura 1.** Matéria seca de parte aérea (g), em porta-enxertos de videira pré-inoculados com FMA no cultivo em casa de vegetação e posterior cultivo a campo por dois anos.

Ao analisar individualmente o desempenho da pré-inoculação de FMA nos diferentes porta-enxertos de videira na fase de cultivo em casa de vegetação, é possível identificar que os resultados variam para cada porta-enxerto e muitas vezes não possui efeito significativo (Figura 2). Dos seis porta-enxertos analisados, a pré-inoculação de FMA incrementou a produção de matéria seca em apenas três, sendo eles: 5C, Salt Creek e Schwarzmann.



**Figura 2.** Matéria seca de parte aérea (g), em porta-enxertos de videira pré-inoculados com FMA e cultivados em casa de vegetação.

A área foliar das videiras cultivadas em casa de vegetação foi maior nas plantas pré-inoculadas com FMA, quando comparadas as videiras não pré-inoculadas (Figura 3). Apesar disso, na análise individual de cada porta-enxerto, apenas o Salt Creek apresentou maior área foliar nas videiras pré-inoculadas. Os outros cinco porta-enxertos não apresentaram diferença significativa para a pré-inoculação de FMA.

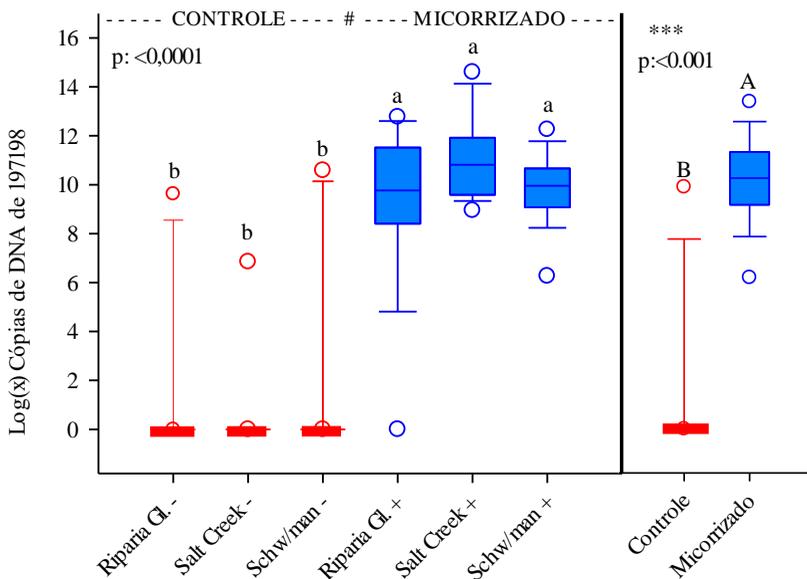


**Figura 3.** Área foliar (mm<sup>2</sup>) em porta-enxertos de videira pré-inoculados com FMA e cultivados em casa de vegetação.

O número de folhas das videiras cultivadas em casa de vegetação (Suplementar 1), a matéria seca de parte aérea das videiras cultivadas a campo por um ano (Suplementar 2), a matéria seca de parte aérea das videiras cultivadas a campo por dois anos (Suplementar 3), e a matéria seca de raízes das videiras cultivadas a campo por dois anos (Suplementar 3), não apresentaram diferença significativa para a pré-inoculação com FMA. Todas essas variáveis apresentaram diferença significativa entre os porta-enxertos, mas como esse não é o objetivo do estudo, os resultados foram apresentados na sessão de matéria suplementar e não serão discutidos no texto principal.

### Estabilização da comunidade de FMA pré-inoculada

A análise de DNA para a presença de *Rhizogloium irregulare* (DAOM 197198), realizada nas raízes das videiras cultivadas a campo por dois anos, mostrou que a comunidade de FMA pré-inoculada se estabeleceu e permaneceu colonizando as raízes das videiras nas condições de campo, que envolvem competição com a microbiota do solo e os FMA anteriormente existentes (Figura 4).



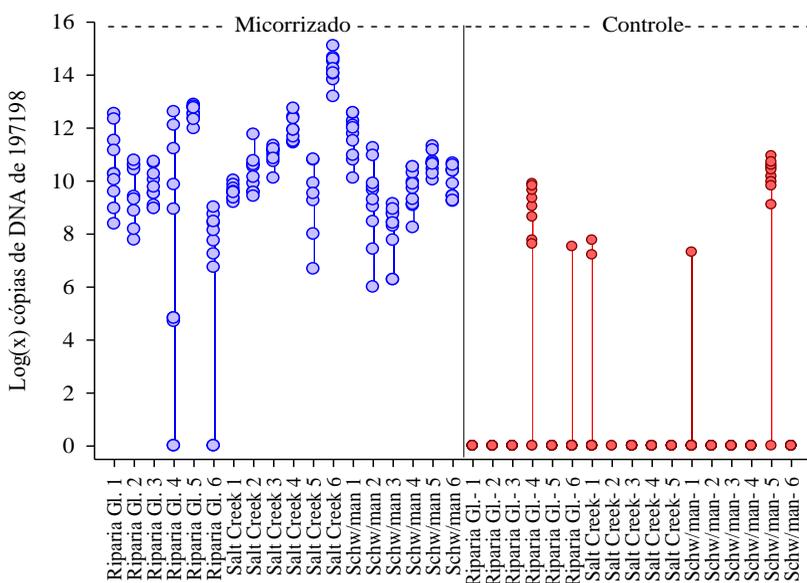
**Figura 4.** Cópias de DNA ( $\log(x)$ ) do *Rhizogloium irregulare* (DAOM 197198), FMA pré-inoculado em porta-enxertos de videira encontrados nas raízes no segundo ano de cultivo a campo.

Todos os três porta-enxertos analisados, Riparia GL., Salt Creek e Schwarzmann, apresentaram o número de cópias de DNA positivas para *Rhizogloium irregulare* (DAOM 197198) absolutamente superior quando pré-inoculados. As videiras que não foram pré-inoculadas apresentaram o número de cópias de DNA positivas para DAOM 197198 próximo a zero.

### Variabilidade amostral na extração de DNA

A variabilidade amostral para a extração de DNA chamou bastante atenção. Para cada planta foram coletadas aleatoriamente 10 amostras de raízes, que resultaram em grande variabilidade no número de cópias de DNA positivas para DAOM 197198.

Na figura 5, é possível observar a quantidade de cópias de DNA positivas para DAOM 197198 encontradas em cada uma das 10 amostras extraídas de cada videira. Cada ponto no gráfico representa uma amostra.

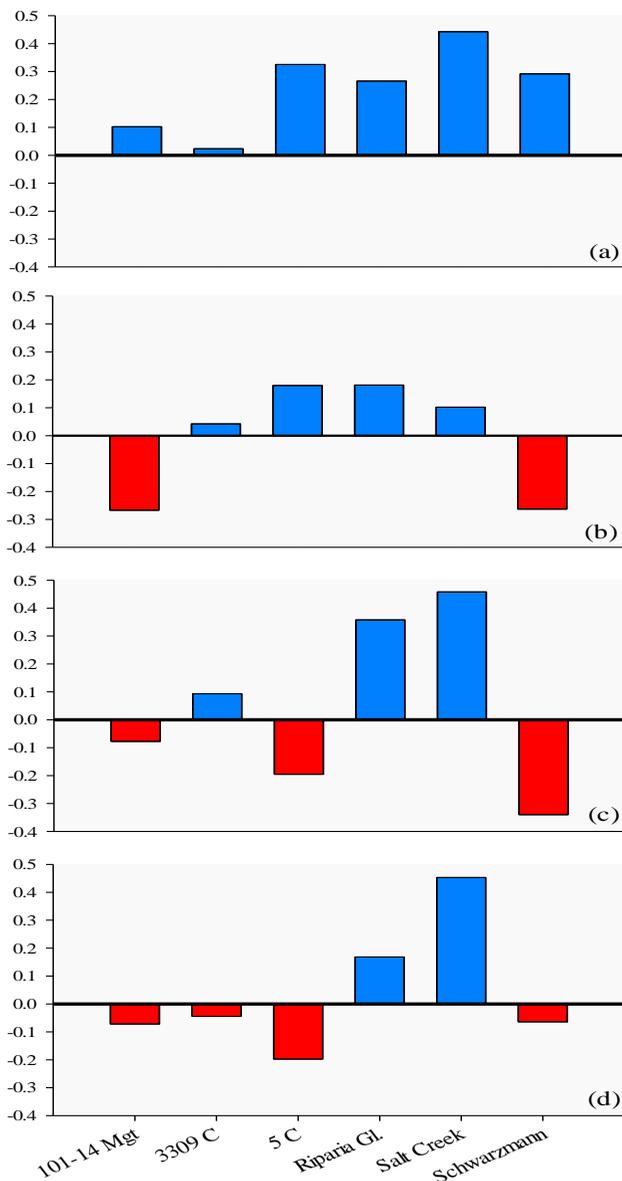


**Figura 5.** Cópias de DNA ( $\log(x)$ ) do FMA pré-inoculado em porta-enxertos de videira encontrados em cada uma das dez amostras extraídas de cada sistema radicular (uma planta) no terceiro ano de cultivo a campo. Cada ponto representa a quantidade de cópias de DNA encontradas em cada extração.

Ainda, obteve-se algumas amostras com grande número de cópias de DNA positivas para DAOM 197198 nas videiras que não foram pré-inoculadas. Verificadas no mapa experimental, essas plantas não estavam próximas às plantas pré-inoculadas e esta área nunca recebeu introdução deste FMA previamente.

***Resposta de FMA no crescimento das videiras***

A resposta de FMA para as videiras mostra que a pré-inoculação proporcionou melhores resultados no cultivo em casa de vegetação, momento em que essas videiras estão sendo cultivadas em substrato isento de FMA (Figura 6). Apesar disso, esse resultado não se mantém com o passar do tempo.



**Figura 6.** Resposta de FMA para: matéria seca de parte aérea em casa de vegetação (a); matéria seca de parte aérea no primeiro ano de cultivo a campo (b); matéria seca de parte aérea no segundo ano de cultivo a campo (c); matéria seca de raízes no segundo ano de cultivo a campo (d).

A matéria seca de parte aérea obtida no cultivo em casa de vegetação apresentou resposta positiva em todos os 6 porta-enxertos de videira analisados (Figura 6 (a)). Esse resultado também mostra que para nenhum dos porta-enxertos a pré-inoculação foi prejudicial.

Essa realidade foi mudando com o passar do tempo. No primeiro ano de cultivo a campo, para a matéria seca de parte aérea, apenas 4 porta-enxertos apresentaram resposta positiva à pré-inoculação de FMA. Mesmo positiva, essa vantagem foi menor do que a obtida em casa de vegetação (Figura 6 (b)). A resposta foi negativa para 101-14 MTG e Schwarzmann.

No segundo ano de cultivo, a matéria seca de parte aérea apresentou resposta negativa à pré-inoculação de FMA para 3 dos 6 porta-enxertos avaliados (Figura 6 (c)). Os porta-enxertos com resposta positiva foram: 3309 C, Riparia GL e Salt Creek, enquanto 101-14 MGT, 5C, Schwarzmann apresentaram resposta negativa ao FMA.

A resposta à pré-inoculação de FMA foi ainda pior para a matéria seca de raízes obtida ao segundo ano de cultivo a campo (Figura 6 (d)). Nesta variável, apenas Riparia GL e Salt Creek obtiveram resposta positiva à pré-inoculação de FMA.

## DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se haver pequena eficiência da inoculação de FMA no desempenho das videiras cultivadas em casa de vegetação, mas esse sucesso não se manteve quando as videiras foram transplantadas ao campo.

Vários estudos encontraram resultados positivos no desempenho das plantas com o uso de inoculantes que contêm FMA (Pellegrino et al., 2011, 2015, Hernádi et al., 2012). No entanto, em outros casos, a inoculação não foi eficaz (Ortas et al., 2011, Janoušková et al., 2013, Emam, 2016). Isso deixa claro que a inoculação bem-sucedida em casas de vegetação nem sempre se traduz em sucesso em condições de campo.

A maioria dos estudos sobre o efeito de inoculantes de FMAs no desempenho de plantas foram conduzidos em casa de vegetação (Berruti

et al., 2016). No entanto, essa abordagem não captura as complexidades das condições de campo.

Muitas vezes, esses estudos são realizados na ausência de fungos micorrízicos. Além disso, a gama de condições ambientais que o isolado tem contato no campo é muito maior do que em condições de estufa, que são rigidamente controladas e geralmente favoráveis aos FMAs. Essas condições podem comprometer o desempenho do inoculante no campo (Verbruggen et al., 2013).

A falta de adaptação às características locais do campo também pode prejudicar o inoculante de FMA. Os campos agrícolas tipicamente abrigam menor taxa de fungos micorrízicos em comparação com os ambientes naturais (Oehl et al., 2010, Schnoor et al., 2011). Isso sugere, que as condições agrícolas podem selecionar estirpes de FMA e, portanto, possuírem fungos micorrízicos melhores adaptados do que os isolados exóticos contidos no inoculante.

É importante lembrar que, os estudos conduzidos em casas de vegetação podem superestimar o sucesso do desempenho de inoculantes de fungos micorrízicos. Com isso, os estudos realizados a campo frequentemente resultam em menor desempenho das videiras em comparação aos obtidos em casas de vegetação (Lekberg & Koide, 2005).

A ausência de incremento no desempenho das videiras a campo pode ocorrer pelo fato do isolado estrangeiro ser simplesmente incapaz de competir com a comunidade fúngica local ou pode ter sido afetado negativamente pelas condições ambientais do local.

Para aumentar a eficiência dos inoculantes, alguns autores sugerem o uso de um produto que contenha múltiplos isolados de FMA, para assim, aumentar as chances de que um ou mais isolados possam melhor se adaptar. Outra possibilidade é selecionar isolados de ocorrência local, que sejam mais propensos a ter um bom desempenho no ambiente local (Verbruggen et al., 2013).

Neste estudo ficou comprovado que o inoculante se estabeleceu com sucesso no cultivo a campo, mas sem eficiência na melhoria do desempenho das videiras. Isso sugere que o inoculante usado no estudo não foi mais benéfico para as videiras em comparação com os fungos micorrízicos nativos. Isso é compreensível pois, os inoculantes que

contém FMA são destinados ao uso geral e não são desenvolvidos para uma espécie hospedeira específica.

Deve-se enfatizar que o inoculante usado neste estudo foi ineficaz. Esses produtos têm custos significativos, tanto financeiramente para o produtor quanto ecologicamente, pelo risco de invasão (Schwartz et al., 2006; Hart et al., 2017; Ricciardi et al., 2017).

## CONCLUSÃO

A pré-inoculação das videiras com o inoculante que contém *Rhizoglosum irregulare* (DAOM 197198) favoreceu sutilmente o desempenho das videiras na fase de estacas cultivadas em casa de vegetação. Após o transplante para o campo a pré-inoculação com o FMA não proporciona nenhum benefício no crescimento das videiras. A estirpe fúngica pré-inoculada se estabeleceu com sucesso e manteve a simbiose com as videiras detectada após três anos da inoculação.

## REFERÊNCIAS

BERRUTI, A.; LUMINI, E.; BIANCIOTTO, V. AMF components from a microbial inoculum fail to colonize roots and lack soil persistence in an arable maize field. **Symbiosis**, v. 72, p. 73-80, 2016.

CAMARGO-RICALDE, S. L. Dispersal, distribution, and establishment of mycorrhizal fungi: a review. **Boletín de la Sociedad Botánica de México**, v. 71, p. 33-44, 2002.

CORDELL, D., & S. WHITE. Sustainable phosphorus measures: strategies and technologies for achieving phosphorus security. **Agronomy**, v. 3, p. 86-116, 2013.

EGERTON-WARBURTON, L. M., & E. B. ALLEN. Shifts in Arbuscular Mycorrhizal Communities along an Anthropogenic Nitrogen Deposition Gradient. **Ecological Applications**, v. 10, p. 484-496, 2000.

EMAM, T. Local soil, but not commercial AMF inoculum, increases native and non-native grass growth at a mine restoration site. **Restoration Ecology**, v. 24, p. 35–44, 2016.

FRIESE, C. F., AND M. F. ALLEN. The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil: inoculum types and external hyphal architecture. **Mycologia**, v. 83, p. 409–418, 1991.

HART, M. M.; ANTUNES, P. M.; ABBOTT, L. K. Unknown risks to soil biodiversity from commercial fungal inoculants. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, 2017.

HOEKSEMA, J. D.; CHAUDHARY, V. B.; GEHRING, C. A.; JOHNSON, N. C.; KARST, J.; KOIDE, R. T.; PRINGLE, A.; ZABINSKI, C.; BEVER, J. D.; MOORE, J. C.; WILSON, G. W.; KLIRONOMOS, J. N.; UMBANHOWAR, J. A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. **Ecology Letters**, v. 13, p. 394–407, 2010.

HAZARD, C., P. GOSLING, C. J. VAN DER GAST, D. T. MITCHELL, F. M. DOOHAN, AND G. D. BENDING. The role of local environment and geographical distance in determining community composition of arbuscular mycorrhizal fungi at the landscape scale. **The ISME journal**, v. 7, p. 498–508, 2013.

HERNÁDI, I.; SASVÁRI, Z.; ALBRECHTOVÁ, J.; VOSÁTKA, M.; POSTA, K. Arbuscular mycorrhizal inoculant increases yield of spice pepper and affects the indigenous fungal community in the field. **HortScience**, v. 47, p. 603–606, 2012.

JANOŮŠKOVÁ, M.; KRAK, K.; WAGG, C.; ŠTORCHOVÁ, H.; CAKLOVÁ, P.; VOSÁTKA, M. Effects of inoculum additions in the presence of a preestablished arbuscular mycorrhizal fungal community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 6507–6515, 2013.

KÖHL, L., C. E. LUKASIEWICZ, AND M. G. A. VAN DER HEIJDEN. Establishment and effectiveness of inoculated arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. **Plant, Cell and Environment**, v. 39, p. 136–146, 2016.

KOKKORIS, V.; LI, Y.; HAMEL, C.; HANSON, K.; HART, M. Site specificity in establishment of a commercial arbuscular mycorrhizal fungal inoculant. **Sci Total Environ**, v. 660, p. 1135–1143, 2019.

LEKBERG, Y.; KOIDE, R. T. Is plant performance limited by abundance of arbuscular mycorrhizal fungi? A meta analysis of studies published between 1988 and 2003. **New Phytologist**, v. 168, p. 189–204, 2005.

OEHL, F.; LACZKO, E.; BOGENRIEDER, A.; STAHR, K.; BÖSCH, R.; HEIJDEN, M. V. D.; SIEVERDING, E. Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 724–738, 2010.

ORTAS, I.; SARI, N.; AKPINAR, Ç.; YETISIR, H. Screening mycorrhiza species for plant growth, P and Zn uptake in pepper seedling grown under greenhouse conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 128, p. 92–98, 2011.

PELLEGRINO, E.; BEDINI, S.; AVIO, L.; BONARI, E.; GIOVANNETTI, M. Field inoculation effectiveness of native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi in a Mediterranean agricultural soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, p. 367–376, 2011.

PELLEGRINO, E.; ÖPIK, M.; BONARI, E.; ERCOLI, L. Responses of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi: A meta-analysis of field studies from 1975 to 2013. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 84, p. 210–217, 2015.

POWELL, C. Spread of mycorrhizal fungi through soil. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 22, p. 335–339, 1979.

RICCIARDI, A.; BLACKBURN, T. M.; CARLTON, J. T.; DICK, J. T. A.; HULME, P. E.; IACARELLA, J. C.; JESCHKE, J. M.; LIEBHOLD, A. M.; LOCKWOOD, J. L.; MACISAAC, H. J.; PYŠEK, P.; RICHARDSON, D. M.; RUIZ, G. M.; SIMBERLOFF, D.; SUTHERLAND, W. J.; WARDLE, D.; ALDRIDGE, D. C. Invasion Science: A Horizon Scan of Emerging Challenges and Opportunities. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 32, p. 464–474, 2017.

SCHNOOR, T. K.; LEKBERG, Y.; ROSENDAHL, S.; OLSSON, P. A. Mechanical soil disturbance as a determinant of arbuscular mycorrhizal

fungal communities in semi-natural grassland. **Mycorrhiza**, v. 21, p. 211–220, 2011.

SCHWARTZ, M. W.; HOEKSEMA, J. D.; GEHRING, C. A.; JOHNSON, N. C.; KLIRONOMOS, J. N.; ABBOTT, L. K.; PRINGLE, A. The promise and the potential consequences of the global transport of mycorrhizal fungal inoculum. **Ecology Letters**, v. 9, p. 501–515, 2006.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis. 3rd edition.** Academic Press, Inc, New York, p. 800, 2008.

SIEVERDING, E.; DA SILVA, G. A.; BERNDT, R.; OEHL, F. *Rhizoglomerus*, a new genus of the Glomeraceae. **Mycotaxon**, v. 129, p. 373-386, 2015.

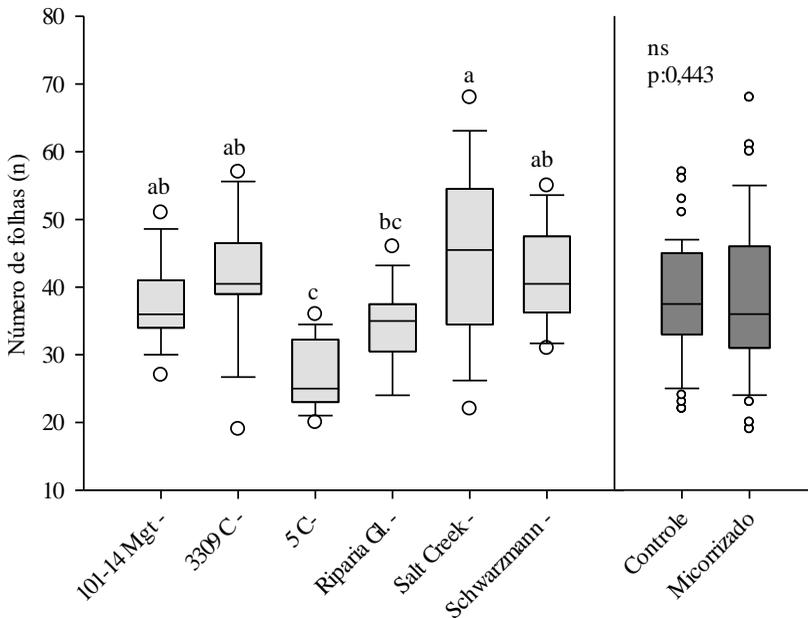
VERBRUGGEN, E.; HEIJDEN, M. G. A. V. D.; RILLIG, M. C.; KIERS, E. T. Mycorrhizal fungal establishment in agricultural soils: Factors determining inoculation success. **New Phytologist**, v. 197, p. 1104–1109, 2013.

VITOUSEK, P. M., PORDER, S.; HOULTON, B. Z.; OLIVER, A.; VITOUSEK, P. M.; PORDER, S.; HOULTON, B.Z.; CHADWICK, O. A. Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications, and nitrogen - phosphorus interactions. **Ecological Applications**, v. 20, p. 5–15, 2010.

ZAHARICK, J.; BECK, H.; BEAUCHAMP, V. An Experimental Test of Epi- and Endozoochory of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Spores by Small Mammals in a Maryland Forest. **Northeastern Naturalist**, v. 22, p. 163–177, 2015.

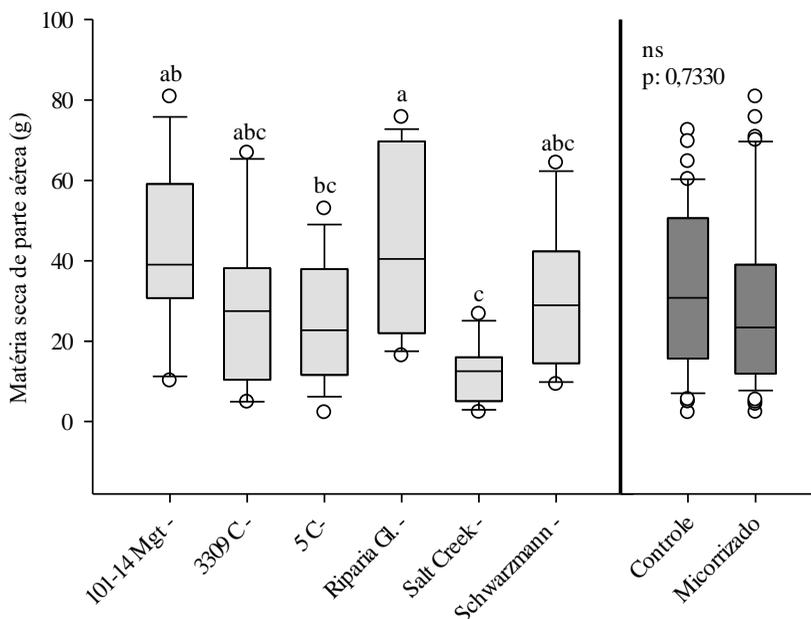
## MATERIAL SUPLEMENTAR

O número de folhas das videiras cultivadas em casa de vegetação diferiu apenas entre os porta-enxertos, sem apresentar nenhuma relação com a pré-inoculação de FMA (Suplementar 1). O maior número de folhas foi encontrado no Salt Creek, enquanto o menor número de folhas foi encontrado no 5C Teleki.



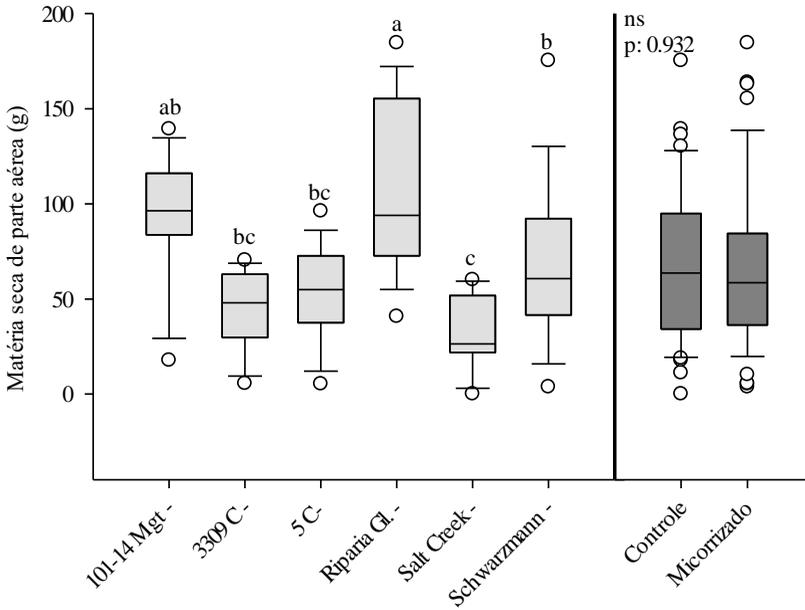
**Suplementar 1.** Número de folhas (n) em porta-enxertos de videira pré-inoculados com FMA e cultivados em casa de vegetação.

A matéria seca de parte aérea obtida após um ano de cultivo a campo diferiu apenas entre os porta-enxertos (Suplementar 2). Nenhuma diferença foi encontrada entre as pré-inoculadas ou não. A maior produção de matéria seca foi obtida em Riparia GL, enquanto a menor produção de matéria seca foi obtida em Salt Creek.



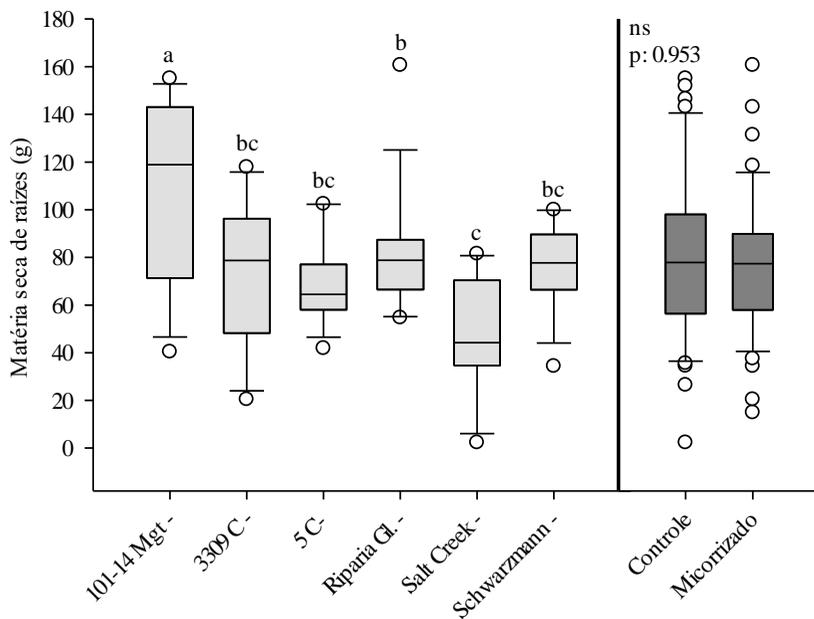
**Suplementar 2.** Matéria seca de parte aérea (g) em porta-enxertos de videira pré-inoculados com FMA e cultivados por um ano a campo.

A produção de matéria seca de parte aérea obtida aos dois anos de cultivo a campo não apresentou nenhuma diferença entre as videiras pré-inoculadas ou não, mas apresentou diferença entre os porta-enxertos (Suplementar 3). A maior produção de matéria seca foi encontrada no Riparia GL, enquanto a menor produção de matéria seca foi encontrada no Salt Creek.



**Suplementar 3.** Matéria seca de parte aérea (g) em porta-enxertos de videira pré-inoculados com FMA e cultivados por dois anos a campo.

A matéria seca de raízes das videiras obtida aos dois anos de cultivo a campo não apresentou diferença entre as plantas pré-inoculadas ou não, mas apresentou diferença entre os porta-enxertos (Suplementar 4). A maior matéria seca de raízes foi obtida em 101-14 Mgt, enquanto a menor produção de matéria seca de raízes foi obtida em Salt Creek.



**Suplementar 4.** Matéria seca de raízes (g) em porta-enxertos de videira pré-inoculados com FMA e cultivados por dois anos a campo.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Para o cultivo de videiras jovens em casa de vegetação utilizando-se substratos com elevados conteúdos de Cu, o uso combinado da calagem e da pré-inoculação das plantas com *R. clarus* contribuiu significativamente para melhorias no desempenho das videiras.

Apesar de o uso combinado de calagem e FMA ser eficiente, a calagem teve maior efeito no desempenho das videiras quando comparada a inoculação de *R. clarus*, que mostrou eficiência na estabilização dos parâmetros fotossintéticos mesmo quando com elevado teor de Cu e também na diminuição da atividade das enzimas antioxidantes, indicando que o FMA teve papel importante na diminuição do estresse. Por sua vez, a calagem contribuiu para a maioria dos fatores, aumentando o desempenho das videiras e a tolerância aos elevados conteúdos de Cu. Isso evidencia a necessidade da correção do pH do solo por meio da calagem, que muitas vezes é negligenciada nos vinhedos.

A toxicidade pelo elevado conteúdo de Cu foi linearmente prejudicial para as videiras e teve um efeito drástico de inibição da colonização das raízes das videiras pelos FMAs, provocando uma limitação dos benefícios que a simbiose poderia proporcionar pelo fato de simplesmente inibir o desenvolvimento dos FMAs.

O uso de inoculante contendo *Rhizoglosum irregulare* (DAOM 197198) para a pré-inoculação de estacas de porta-enxertos de videira, cultivadas em casa de vegetação com o objetivo de formação de mudas e posterior cultivo a campo, mostrou que o uso generalizado do inoculante nem sempre traz algum resultado no desempenho das videiras ou vantagem financeira ao viticultor.

Na produção das estacas em casa de vegetação, o uso de substrato inerte faz com que as mudas de videiras não inoculadas tenham uma pequena desvantagem, visto que as videiras são plantas que naturalmente fazem simbiose com FMAs. Apesar disso, ao transplantar essas videiras para o campo, onde o solo naturalmente contém estirpes de FMA, a diferença no desempenho desaparece e em alguns casos, as videiras não pré-inoculadas apresentaram maior desempenho que as pré-inoculadas, provavelmente pelo fato de serem colonizadas em maior proporção por fungos micorrízicos nativos do local.

A análise de ddPCR para a presença de DNA de DAOM 197198 mostrou que a estirpe de FMA pré-inoculada na fase de estacas se estabilizou no cultivo a campo, expandindo para todo o sistema radicular das videiras pré-inoculadas e também houve espalhamento para algumas videiras não pré-inoculadas, apesar de estas não serem vizinhas.

O alto custo do inoculante, a ausência de resultados positivos no desempenho das videiras logo após o transplante ao campo e o risco biológico provocado pela introdução de uma comunidade fúngica exótica são fatores relevantes a serem considerados antes de recomendar a pré-inoculação das videiras.

Para melhores conclusões quanto à colonização natural e a competição entre os fungos nativos e os pré-inoculados, faz-se necessário o sequenciamento genético das amostras de DNA extraídas das raízes das videiras. Assim, é possível saber quais fungos e em que escala cada estirpe está colonizando as raízes das videiras a campo. Esse resultado será importante para evidenciar a representatividade do FMA pré-inoculado e entender por que não obtivemos melhorias no desempenho das videiras.