

Efeitos da Quitosana no Desenvolvimento *In Vitro* de Videiras Cv. Merlot e no Crescimento Micelial do Fungo *Elsinoe ampelina*

Effects of the Chitosan on the Development of Grapevines Cv. Merlot and on the Mycelial Growth of the Fungus Elsinoe ampelina

MAIA; Aline José¹. LEITE; Carla Daiane¹. BOTELHO; Renato Vasconcelos¹, FARIA; Cacilda Márcia Duarte Rios¹. UBER, Suelen Cristina¹.

¹ Universidade Estadual do Centro Oeste-UNICENTRO. e-mail:alymaia2005@yahoo.com.br

Resumo

O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da quitosana no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de videira cv. Merlot e sua atividade antifúngica sobre *Elsinoe ampelina*, agente causal da antracnose da videira. No primeiro experimento, explantes da cv. Merlot foram transferidos para meio de cultura DSD1 acrescido das doses 0; 25; 50,100; 150 e 200 mg L⁻¹ de quitosana. Após 90 dias de cultivo *in vitro* as plântulas foram avaliadas quanto ao número de raízes e de folhas, porcentagem de enraizamento e brotação, comprimento de raízes e de parte aérea, massa fresca da planta. No segundo experimento, incorporou-se as doses 0, 60, 120, 180, 240 e 300 mg L⁻¹ de quitosana ao meio BDA, onde repicou-se o fungo. Posteriormente, avaliou-se o crescimento micelial aos 6 e 9 dias de incubação a 25°C no escuro. No primeiro experimento, para as variáveis: comprimento médio da parte aérea, massa fresca da planta inteira, porcentagem de enraizamento e porcentagem de estacas brotadas, houve efeito linear negativo em função das doses de quitosana. No segundo experimento a dose de 300mg L⁻¹ inibiu em 81,7% o crescimento micelial, demonstrando grande potencial do uso de quitosana no controle da antracnose da videira.

Palavras-chave: Uva, *Vitis vinifera*, antracnose da videira, agroecologia, fitopatologia.

Abstract

This research aimed to evaluate the effects of the chitosan in the development in vitro plantlets of grapevines cv. Merlot and its antifungal action on Elsinoë ampelina, causal agent of grapevine anthracnose. In the first trial, explants of the grapevine cv. Merlot were transferred to growing medium DSD1 plus doses of 0; 25; 50; 100; 150 e 200 mg L⁻¹ of the product. After 90 days of in vitro cultivation the plantlets were evaluated for roots and leaves number, roots and shoots length and fresh mass of roots and shoots. In the second experiment, doses of 0; 60; 120; 180; 240 e 300 mg L⁻¹ were incorporated to the PDA media, where the fungus was inoculated. The mycelial diameter was evaluated at 6 and 9 days after incubation at 25 °C in the dark. In the first experiment, for the variables mean shoot length, fresh mass of plant, percentage of rooted cutting there was negative linear effect in function as chitosan doses. In the second trial, in the dose of 300 mg L⁻¹ the mycelial growth inhibition, was 81.7%, showing great potential of chitosan on the control of anthracnose grapevine

Keywords: Grape, *Vitis vinifera*, grapevine anthracnose, agroecology, phytopathology.

Introdução

As cultivares de *Vitis vinifera*, Merlot, Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc, constituem-se em importantes produtoras de uvas viníferas para a elaboração dos melhores vinhos tintos finos do Sul do Brasil. São consideradas uvas de alta qualidade, porém, em geral são bastante sensíveis às doenças fúngicas (CAMARGO, 2003).

Resumos do VI CBA e II CLAA

Muitos são os fatores a serem manejados para se obter a máxima produtividade de um vinhedo. Um deles é o controle de doenças fúngicas, entre as quais se destaca a antracnose, causada por *Elsinoe ampelina*, com sintomas observados tanto nas folhas, ramos e bagas (SÔNEGO et al., 2005). Quando a severidade é alta, o vigor da planta é afetado, comprometendo não apenas a safra do ano como também as safras futuras (AMORIM e KUNIYUKI, 2005).

Como faz-se necessária a busca de alternativas de controle de doenças, destaca-se a indução de resistência em plantas (BONALDO et al., 2005) e a utilização de substâncias naturais bioativas com atividade antimicrobiana (CAMILI et al., 2007).

Dentre estas alternativas que vem sendo estudadas encontra-se a quitosana. Esta substância é um polímero policatiônico β -1,4 ligado à D-glucosamina definido como um diacetilato de quitina, sendo um polissacarídeo natural extraído da casca ou exoesqueleto de crustáceos como camarão, caranguejo, lagosta e de plantas como as algas marinhas. Bautista-Baños et al. (2003) verificaram, em testes *in vitro*, efeito fungicida da quitosana a 2 e 3% sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, assim como o controle da antracnose em frutos de mamão quando tratados com 1,5% de quitosana.

Poucas são as pesquisas sobre o efeito da quitosana no desenvolvimento de plantas. No entanto, Ait Barka et al. (2004), com o objetivo de avaliar o potencial da quitosana no desenvolvimento vegetativo e *in vitro* de plântulas de videira, verificaram aumento no comprimento dos brotos e peso seco de raízes e brotos quando adicionaram 1,75% (v/v) de chitogel, produto a base de quitosana, em meio de cultura.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de concentrações crescentes de quitosana no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de videira cv. Merlot e sua atividade antifúngica sobre *Elsinoe ampelina*, agente causal da antracnose da videira.

Metodologia

Como fonte de quitosana foi utilizada o produto comercial Fish Fértil Quitosana® (20g L⁻¹ de quitosana), Fish Indústria e Comércio de Fertilizantes Ltda., Mogi-Mirim-SP.

Efeito da quitosana no desenvolvimento vegetativo de plântulas de videira cv. Merlot
Neste experimento foram utilizados explantes já estabelecidos *in vitro* a partir de gemas apicais e laterais da videira cv. Merlot, retiradas de matrizes de área experimental do Departamento de Agronomia da UNICENTRO. Estes explantes consistiram de segmentos nodais com cerca de 1 cm de comprimento cada, possuindo uma gema axilar dormente e foram transferidos para meio de cultura DSD1 (SILVA e DOAZAN, 1995) acrescidos das seguintes concentrações de quitosana: 0; 25; 50,100; 150 e 200 mg L⁻¹. A cultura foi mantida em câmara de crescimento com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas de luz proveniente de lâmpadas fluorescentes com uma intensidade de 2500 lux.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos, seis repetições e a parcela experimental constituída por quatro explantes. Após 90 dias de cultivo *in vitro* as plântulas foram avaliadas quanto ao número de raízes e de folhas, comprimento de raízes e de parte aérea, massa fresca da planta inteira e porcentagem de enraizamento e brotação.

Efeito da quitosana sobre crescimento micelial *in vitro* do fungo *Elsinoe ampelina*

Para este experimento foi realizado isolamento do patógeno a partir de bagas de uvas provenientes da região de Guarapuava-PR, o qual foi mantido em meio de cultura BDA (Batata-dextrose-ágar).

Resumos do VI CBA e II CLAA

Para realização do experimento *in vitro* adicionou-se ao meio BDA as doses de 60, 120, 180, 240 e 300 mg L⁻¹ de quitosana, além da testemunha sem adição do produto. Em seguida, os meios foram autoclavados durante 20 minutos, a 120 °C e pressão de 1 atm, e vertidos em placas de Petri de 70 mm de diâmetro, onde inoculou-se o fungo a partir de discos de 8 mm de diâmetro colocados no centro da placa. Tais placas foram incubadas em câmara de crescimento (BOD) a 25 ± 1 °C, no escuro. Aos 6 e 9 dias após incubação, avaliou-se o crescimento micelial, através da medida do diâmetro (cm) da colônia, com auxílio de paquímetro. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos, quatro repetições e parcela experimental constituída por uma placa de Petri.

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância (Anava, onde $y_{ij}=m+t_i+e_{ij}$, em que: y = crescimento micelial ou desenvolvimento da plântula; m =media geral; t_i =doses de quitosana ($i=1$ a 6) e e_{ij} =erro experimental) e regressão polinomial ao nível de 1 % probabilidade (Tabela 1), através do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

Resultados e discussões

Efeito da quitosana no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de videira cv. Merlot

Para as variáveis, comprimento médio da parte aérea, massa fresca da planta inteira, porcentagem de estacas enraizadas e porcentagem de estacas brotadas houve efeito linear negativo em função das doses de quitosana, no entanto, na menor dose de 25 mg L⁻¹ os valores absolutos para estas variáveis foram, respectivamente, 15,2; 54,0; 29,4 e 33,3 % superiores aos da testemunha (dados não apresentados). Em relação as variáveis, número de raízes, comprimento médio de raízes e número de folhas não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Entretanto, os segmentos nodais mantidos em meio de cultura DSD1 acrescidos de 25 mg L⁻¹ apresentaram os maiores valores absolutos de comprimento médio de raízes (2,87 cm) e número de folhas (7,8) (dados não apresentados). Resultados similares foram obtidos por Ait Barka et al., (2004) que, avaliando o potencial da quitosana no desenvolvimento vegetativo de plântulas de cv. Chardonnay (*Vitis vinifera* L) verificaram que a adição de 1,75% (v/v) de chitogel, produto a base de quitosana, em meio de cultura promoveu aumento no comprimento dos brotos e peso seco de raízes e brotos. No entanto, a concentração de 2% de chitogel, teve um efeito negativo no crescimento das plântulas e concentrações maiores promoveram morte das mesmas.

Efeito da quitosana sobre o crescimento micelial *in vitro* do fungo *Elsinoe ampelina*

Neste experimento, verificou-se redução do diâmetro da colônia do fungo *Elsinoe ampelina* com o aumento das concentrações de quitosana, com significância para regressão quadrática nos dois períodos de avaliação, aos 6 e 9 dias após incubação (Figura 1). Nota-se que na concentração de 300 mg L⁻¹ houve o máximo efeito fungistático, ou seja, redução de 81,7% sobre o desenvolvimento de *Elsinoe ampelina*. De forma semelhante AIT BARKA et al. (2004), obtiveram a máxima inibição (64%) com a dose de 5% (v/v) de chitogel sobre o desenvolvimento *in vitro* de *Botrytis cinerea*.

Resumos do VI CBA e II CLAA

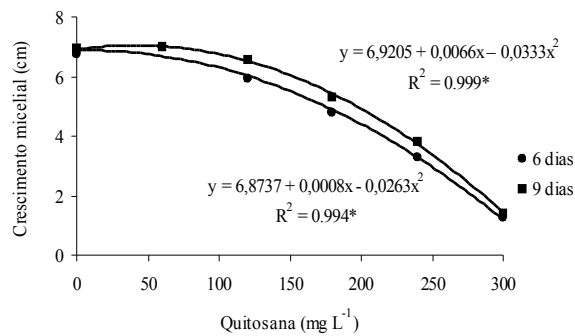


FIGURA 1. Crescimento micelial (cm) de *Elsinoe ampelina* em função de concentrações crescentes de quitosana, aos 6 e 9 dias após incubação em câmara de crescimento (Guarapuava-PR, 2008).

TABELA 1. Análise de Variância para os dados do crescimento micelial (cm) de *Elsinoe ampelina*, submetidos às diferentes concentrações de quitosana após seis e nove dias de incubação (Guarapuava-PR, 2008).

Causa de Variação	GL	SQ		QM		F	
		6	9	6	9	6	9
Tratamento	5	99,30	98,1	19,86	19,61	38,003**	36,015**
Resíduo	18	9,41	9,8	0,523	0,544		
Total	23						
CV%14,99 aos 6 dias				CV%14,24 aos 9 dias			

** Significativo a 1% de probabilidade.

Conclusões

- 1) A quitosana apresentou efeito fitotóxico em plântulas de videira cv. Merlot, reduzindo a porcentagem de brotação e enraizamento, o comprimento médio da parte aérea e a massa fresca da planta toda.
- 2) A quitosana apresentou efeito fungistático sobre o fungo *Elsinoe ampelina* reduzindo o diâmetro micelial em 81,7%, na concentração de 300 mg L⁻¹.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior – CAPES pela bolsa de mestrado concedida ao primeiro autor.

Referências

AIT BARKA, E. et al. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports*, Heidelberg, v.22, n. 8, p. 608-614, 2004.

AMORIM, L.; KUNIYUKI, H. Doenças da videira. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*. 4. ed. São Paulo, 2005. v.2, p. 639-651.

BAUTISTA-BAÑOS, S. et al. Effects of chitosan and extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*, London, v.22, n. 9, p. 1087-1092, 2003.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: Noções básicas e perspectivas. In: *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba: FEALQ,

Resumos do VI CBA e II CLAA

2005. 263 p.

CAMARGO, A.U. Porta-Enxertos e Cultivares In: PROTAS, J.S.F. *Uvas Viníferas para Processamento em Clima Temperado*. Embrapa Uva e Vinho, 2003. Disponível em: <<http://sistemas.deproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/>>. Acesso em: 19 set. 2007.

CAMILI, E.C. et al. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 33, p. 215-221, 2007.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para análise de variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. *Programas e Resumos...* São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.

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

SÔNEGO, O.R.; GARRIDO, L.R.; GRIGOLETTI JR., A. *Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil*. 2005. (Circular Técnico Embrapa Uva e Vinho). Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/circular/cir056.pdf>>. Acesso em: 16 jul. 2008.