

CIRCULAR TÉCNICA

149

Bento Gonçalves, RS
Agosto, 2020

Avaliação de produtos biológicos e um indutor de resistência no controle do míldio da videira

Fabio Rossi Cavalcanti
Kelly Francine Cassuba
João Caetano Fioravanço



Avaliação de produtos biológicos e um indutor de resistência no controle do míldio da videira¹

Introdução

As doenças causadas por microrganismos fitopatogênicos resultam em grandes perdas econômicas para a viticultura nacional e mundial. O míldio é uma doença causada pelo pseudofungo *Plasmopara viticola* (Berk. & Curtis) Berlese & De Toni e tem seu ciclo de vida favorecido no Sul do Brasil, por causa das condições gerais de clima temperado típicas da região. Em geral, as cultivares viníferas são mais sensíveis ao míldio, enquanto que as variedades americanas e híbridas apresentam níveis maiores de resistência ao patógeno, em seus tecidos (Fioravanzo et al., 2015). O *P. viticola* parasita os tecidos da planta, da brotação até a colheita de cachos. Este microrganismo consegue colonizar e produzir esporângios (estruturas propagativas do oomiceto) viáveis em estruturas da planta, como folhas, ramos, pedúnculos e bagas. A doença é favorecida por condições de alta umidade e temperaturas amenas, sendo possível observar epidemias com perdas de produção de até 100%, em vinhedos não protegidos (Gessler et al., 2011).

Existem várias estratégias para o controle do míldio da videira, desde o uso de cultivares que apresentem maior resistência a esta doença, até a utilização de esquemas de controle por pulverização de substâncias que matem o patógeno (Gessler et al., 2011). No caso de variedades resistentes, há pouco material apresentando alinhamento entre as necessidades comerciais e fitossanitárias; ou seja, até hoje ainda são poucas as copas aceitas pelos consumidores que apresentem uma resistência genética competitiva ao míldio, ao ponto de uma estratégia de controle se basear nesse aspecto. Desta forma, é fundamental a adoção de precauções para o manejo do vinhedo, dentre eles:

¹ Fabio Rossi Cavalcanti, Eng. Agrônomo, Dr. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS; Kelly Francine Cassuba, Tecnóloga em Viticultura e Enologia, Instituto Federal de Ensino Tecnológico, Campus Bento Gonçalves, RS; João Caetano Fioravanzo, Eng. Agrônomo, Dr. em Agronomia, Pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS.

i) instalar vinhedos em áreas afastadas de formação de neblina; ii) utilizar espaçamento que não promova um adensamento excessivo entre as plantas e iii) efetuar podas constantes, para reduzir condições microclimáticas favoráveis ao desenvolvimento do *P. viticola* (Cavalcanti e Garrido, 2015).

Muito embora as precauções acima componham uma recomendação generalista aos viticultores convencionais ou alternativos, nenhum produtor pode prescindir de esquemas de pulverização sobre as copas para controlar o míldio. Para esta doença, o controle se baseia na utilização de produtos à base de cobre, em formas como: hidróxido, oxicleto, sulfato, óxido e octanoato (Garrido, 2017). No entanto, apesar de ser eficiente e amplamente recomendada, medidas de controle baseadas em produtos que contenham cobre apresentam algumas objeções, por causa de danos ao meio ambiente (Fioravanço et al., 2015).

Em viticultura convencional, diferentes esquemas de controle químico do míldio já estão bem estabelecidos em todas as regiões produtoras do mundo. Há abordagens protetoras (pré-infecção) e curativas (pós-infecção) para o controle dessa doença. Substâncias protetoras são do grupo M (modo de ação múltiplo), tais como cobre inorgânico, ditiocarbamatos, captana, quinona e estrubirulinas. Produtos sistêmicos (grupo FRAC: A1+M) e fosfitos (grupo FRAC: P7) estão disponíveis para controle em situação de infecção estabelecida e altas pressões de infecção, por exemplo, misturas de metalaxil-M (com mancozebe) e fosfito de potássio (Magarey, 2010).

No entanto, como comentado, o mercado pressiona por uvas que estejam livres da presença de substâncias de síntese química, tanto para consumo in natura quanto para seus produtos de processamento. Nesse sentido, as estratégias para a redução do uso de produtos químicos na viticultura convencional e na viticultura orgânica ganharam importância nos últimos anos. Ambos sistemas buscam prescindir do uso de sintéticos e outros químicos, embora ainda aceitem o cobre. A viticultura orgânica eficiente é tecnicada e não depende apenas de pulverizações de produtos, mas também se baseia fortemente na adoção de práticas de Manejo Integrado de Pragas e Doenças - MIPD (Cavalcanti e Garrido, 2015). Estudos envolvendo agentes de controle biológico (*Biological Control Agents*, BCAs) vêm ganhando espaço na pesquisa de proteção de vinhedos com estudos envolvendo, por ex., fungos do gênero *Trichoderma* e bactérias endofíticas, como *Bacillus* spp (Vecchione

et al., 2007). Por exemplo, foram evidenciados controles de míldio da videira por pulverizações com as bactérias *Streptomyces viridosporus* e *S. violatus*, com *Trichoderma harzianum*, *T. viride* e uma cepa comercial da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Tais respostas atingiram percentuais de proteção, de acordo com os autores, próximos de 70%, por duas safras, em vinhas de 12 anos de idade. Essas proteções foram atingidas ao largo de significativas modificações nos teores de fenóis e açúcares totais, macronutrientes e enzimas relacionadas à defesa celular, com espessamento de parede celular em folhas de videira (El-Sharkawy et al., 2018). Em outro trabalho, cepas de bactérias endofíticas *Bacillus subtilis* e *B. pumilus*, isoladas de folhas de videira, cultivadas e usadas como agentes de pulverização para proteção de copas contra o míldio, garantiram proteções (percentual de eficiência) em torno de 50% em folhas e cachos, por duas safras consecutivas (Zhang et al., 2017).

Estudos envolvendo redução de teores de cobre em misturas bordalesa e sulfocálcica vêm sendo conduzidos, na Embrapa Uva e Vinho, para redução do impacto do acúmulo de cobre no substrato, causado por misturas cúpricas com altas concentrações deste elemento, passíveis de serem adotadas na viticultura orgânica (Fioravanço et al., 2015).

No entanto, de modo geral, a pesquisa envolvendo prospecção por substâncias alternativas a produtos químicos para controle do míldio ainda está em seu início. Em paralelo, estudos para caracterização mecanismos biológicos de proteção visando ao aumento da ação protetora/erradicante de substâncias alternativas precisam ser conduzidos para que a eficiência desses elementos possa se rivalizar com os produtos químicos convencionais, cativando mais agricultores a fazer a conversão de seus vinhedos, de convencionais para orgânicos. Os produtos alternativos para o controle do míldio da videira passam por substâncias que possuam mecanismos antagonistas à biologia dos patógenos (El-Sharkawy et al., 2018). Adicionalmente, certas substâncias alternativas podem promover *Indução de Resistência* (IR) vegetal, agindo como elicitores, moléculas capazes de serem reconhecidas por receptores celulares para promover sinalização da expressão de genes relacionados à defesa (Cavalcanti et al., 2014). Tais respostas coordenadas de defesa podem promover a aclimatação de células em torno de sítios de infecção, produzindo defesas químicas (fitoalexinas, PR-proteínas) e físicas

da planta, como respostas de enrijecimento e lignificação de parede celular (Cavalcanti et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de substâncias baseadas em agentes de controle biológico (*Biological Control Agents* - BCAs) e extratos biológicos com potencial aplicação como substituintes ao cobre no controle do míldio. Para isso, investigações foram realizadas em condições de casa de vegetação e campo, sendo monitoradas estruturas vegetativas (folhas, em ambos os experimentos) e reprodutivas (cachos, em condições de campo) das cultivares Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) e Isabel (*Vitis labrusca* L.).

Material e Métodos

Avaliações em casa de vegetação e campo

Ensaio em casa de vegetação e campo foram realizados na Embrapa Uva e Vinho, localizada em Bento Gonçalves – Rio Grande do Sul, entre os meses de setembro de 2017 e fevereiro de 2018.

Para os ensaios em casa de vegetação, Principal e Confirmatório, foram utilizadas mudas de ‘Cabernet Sauvignon’ de três anos e rebrotas de 45 dias. O desenho experimental usado para as avaliações, nesse caso, foi o delineamento em blocos casualizados com três repetições por tratamento, com cada repetição sendo acondicionada em gaiola de madeira individualizada. A gaiola consistiu de uma estrutura de madeira envolvida por filme plástico transparente, com um umidificador ultrassom ligado 24h em seu interior, para garantia da lâmina de umidade foliar favorável à infecção. Cada parcela experimental foi preparada com cinco mudas plantadas em vasos de 1 L, contendo areia, vermiculita e solo peneirado nas proporções 2:1:1.

Os tratamentos do **Ensaio Principal** (setembro e outubro de 2017) em casa de vegetação foram:

1. Suspensão de *Bacillus subtilis* (concentrado solúvel), na concentração de 100 mL/100 L;

2. Suspensão de *Bacillus subtilis* (concentrado solúvel), na concentração de 200 mL/100 L;
3. Suspensão de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa D-747 (granulado dispersível), na concentração de 2,5 kg/1.000 L;
4. Efusão de extrato pirolenhoso², na dose de 100 mL/100 L;
5. Efusão de extrato pirolenhoso, na dose de 1.000 mL/100 L;
6. Extrato de *Reynoutria sachalinensis* (200 mL/100 L);
7. Fertilizante organomineral classe “A” (FOA)³, na dose 100 mL/100 L;
8. Fertilizante organomineral classe “A” (FOA), na dose 200 mL/100 L;
9. Calda bordalesa a 1% (CB1010) como controle positivo (Ctrl+) na diluição usual 1,0:1,0, ou seja, 10 g de CuSO₄ e 10 g de CaO em 1 L de água;
10. Água destilada, como controle negativo (Ctrl-).

Todos os tratamentos seguiram as mesmas datas de aplicação, em um esquema experimental típico de proteção de plantas: aplicações em intervalos de quatro dias (intercalados a inoculações), por atomização líquida aplicada até o ponto de escorrimento foliar. As plantas foram inoculadas por meio de pulverização com suspensão de esporângios de *Plasmopara viticola* coletados no campo e ressuspensos em água destilada até a concentração de 10⁵ esp/mL, até o ponto de escorrimento.

Os tratamentos do **Ensaio Confirmatório** (novembro e dezembro de 2017) em casa de vegetação foram:

1. Suspensão de *Bacillus subtilis* (concentrado solúvel), na concentração de 100 mL/100 L;
2. Fertilizante organomineral classe “A” (FOA), na dose 100 mL/100 L;

² Obtido conforme Campos (2007)

³ O FOA usado, registrado como MAPA: SP-09067-10039-6 continha, segundo o fabricante, 14% C orgânico, 0,02 % B e 3% de Fosfito (HPO₃)⁻².

3. Calda bordalesa a 1% (CB1010) como controle positivo (Ctrl+) na diluição usual 1,0:1,0, ou seja, 10 g de CuSO_4 e 10 g de CaO em 1 L de água;
4. Água destilada, como controle negativo (Ctrl-).

Para as avaliações a **Campo** (a partir de outubro de 2017 até fevereiro de 2018), da cultivar Isabel, utilizou-se um vinhedo pé-franco de cerca de um hectare, com aproximadamente 43 anos de idade, que foi implantado no espaçamento de 3,0 m entre filas e 2,0 m entre plantas. A disposição das linhas do vinhedo foi no sentido oeste-leste, com inclinação entre 20-30° norte (GPS: -29.161956, -51.528818). As condições climáticas gerais do experimento seguiram de acordo com a Tabela 1.

Para a aplicação dos tratamentos e avaliações de doença, foi utilizada apenas uma fileira, com uma bordadura de cinco plantas, a partir da extremidade, e duas fileiras laterais. O desenho experimental adotado foi inteiramente casualizado, com parcela experimental de uma planta por repetição e cinco repetições por tratamento.

Os tratamentos avaliados no **Ensaio de Campo** foram:

1. Fertilizante organomineral classe “A” (FOA), na dose 200 mL/100 L;
2. Calda bordalesa na dosagem clássica 1,0:1,0 (CB1010), como o controle positivo (Ctrl+) para enquadramento em viticultura orgânica;
3. Produto [metalaxil-M (40 g/kg) + mancozeb (640 g/kg)], como segundo controle positivo (Ctrl+) comparativo viticultura convencional, na dose 300 g/100 L;
4. Parcelas experimentais não tratadas, definidas como controle negativo (Ctrl-).

As três substâncias utilizadas no ensaio seguiram o mesmo calendário de aplicações durante a safra (2017-2018), com aplicações semanais de setembro a dezembro. Uma emulsão obtida a partir de folhas picadas de figo-da-Índia (*Opuntia* spp.) foi utilizada como espalhante adesivo. Para o preparo, adicionou-se 1 kg de folhas de figo-da-Índia em 5 L de água, deixando-se em repouso por aproximadamente 24 horas. Após esse período, filtrou-se

a emulsão resultante, ajustando-se a calda de tratamento para a concentração de 0,5%.

Pertinente lembrar aqui que, como CB1010 é o tratamento clássico para controle de míldio em produção orgânica, no ensaio de campo, o mesmo foi considerado como controle positivo (Ctrl+), em paralelo às parcelas com (metalaxil-M + mancozeb). O fertilizante organomineral classe “A” (FOA, 200 mL/100 L) foi avaliado para conhecimento de seu rendimento em vinhedo no controle do míldio, a partir de respostas muito promissoras verificadas no **Ensaio Principal** em casa de vegetação, entre set/out de 2017.

Para quantificação de doença em todos os experimentos, foram monitorados o progresso e densidade de sintomas (manchas de óleo) e sinais (pulverulência característica na parte abaxial da folha) de míldio, a partir de inoculação natural no vinhedo. Avaliações da doença foram feitas em todas as folhas de dois ramos sorteados nas plantas, e, posteriormente, em três cachos por ramo, em cada planta tratada. As avaliações em sintomas/sinais foliares foram realizadas por meio da escala gráfica de Azevedo (1998), dividida em cinco (5) níveis de doença, cobrindo 0-100% de severidade. As leituras foram divididas em classes e submetidas à

Tabela 1. Condições ambientais gerais para os experimentos de Campo 2. Estação Meteorológica Automática - Embrapa Uva e Vinho - Bento Gonçalves-RS, Lat. 29°09'S; Lon. 51°31'O; Alt. 640 m, safra 2017/2018.

Parâmetro	Mês/Ano										
	Set/17	Out/17	Nov/17	Dez/17	Jan/18	Fev/18					
T. máx. do ar (média do mês / normal) (°C)	24,6	20,4	22,7	22,8	24,2	24,8	27,6	26,7	27,8	27,1	27,5
T. mín. do ar (média do mês / normal) (°C)	14,8	10,6	13,5	12,3	13,1	14,2	17,0	16,0	17,5	16,7	17,3
T. méd. do ar (média do mês / normal) (°C)	19,1	14,9	17,7	17,0	18,2	18,9	21,7	20,7	21,4	21,8	21,7
Precip. pluviom. (total do mês / normal) (mm)	106	185	184	156	162	140	104	144	146	140	86
Umidade relativa do ar (média do mês) (%)	74,3	-	75,6	-	70,4	-	72,6	-	77,4	-	73,6

Fonte: A estação meteorológica utilizada neste estudo pertence à rede de estações do Instituto Nacional de Meteorologia (<http://www.inmet.gov.br>)

transformação angular $\omega = \arcsen(ID^{1/2})$, sendo, a seguir, realizados normalidade por Shapiro-Wilk, ANOVA e inferência por Tukey a 5% de probabilidade sobre os dados avaliados. Valores de Índice de Doença (ID%) foram definidos como a intensidade de doença (Czermainsky, 1999). Áreas Abaixo da Curva de Progresso de Doença (AACPDs) foram calculados de acordo com Campbell e Madden (1990). Percentagens de proteção (%) foram definidas como sendo a AACPD do tratamento testado sobre a AACPD do Ctrl-. Para avaliação de doença nos cachos foram contadas as bagas murchas e as bagas interrompidas/danificadas pelo grão preto ou míldio larvado. Em cachos, para a análise dos dados não normalizados, a metodologia seguiu a mesma adotada para as avaliações da parte vegetativa.

Viabilidade do esporângio

Em laboratório, foram conduzidos estudos de viabilidade de esporângios sadios (frescos) de *P. viticola* e do lançamento de zoósporos quando expostos às mesmas substâncias avaliadas no **Ensaio Principal** (casa de vegetação). Esses esporos são veículos de disseminação típicos do patógeno. Esporângios frescos foram ressuspensos a partir de pulverulências de míldio encontradas em folhas não tratadas. Uma suspensão de 10^5 esp/mL foi, então, usada como fonte de esporângios a serem expostos às substâncias testadas, em lâminas escavadas (lâminas de vidro com cavidades, para uso em microscopia), em câmara úmida durante 15 horas. Dados foram interpretados como uma variação (Δ) entre esporângios contados cheios (C), inativados pelo produto, menos os vazios (V), ativos: $[\Delta = C - V]$. Após o tratamento, foram feitas médias de contagens de 4 quadrantes em câmara de Neubauer, sendo contados um total de $n = 100$ esporângios, em 15 HAT (horas após tratamento). Como testemunhas (Ctrl-) foram considerados esporângios expostos à água destilada.

Qualidade dos esporângios

Estudos da qualidade dos esporângios de *P. viticola* foram conduzidos, também em condições de laboratório. Para isso, esporângios foram ressuspensos a partir de pulverulências do míldio em folhas expostas às substâncias estudadas no **Ensaio Confirmatório**, ao longo de 18 dias após

pulverizações (DAP). Com um volume fixo de água (4 mL), foram obtidas suspensões de esporângios em folhas coletadas das parcelas submetidas aos tratamentos. Foram contados esporângios intactos (sadios) em quatro quadrantes de câmara de Neubauer, bem como os totais de esporângios (sadios + danificados) ressuspensos. A contagem se deu imediatamente após a coleta. Os esporângios extraídos de folhas pulverizadas com água destilada, ao longo de 18 DAP, foram considerados como testemunhas (Ctrl-).

Atividade de enzimas relacionadas à lignificação

Na tentativa de evidenciar respostas celulares relacionadas à indução de resistência vegetal, atividades das enzimas peroxidases de monolignóis (GPX, guaiacol 20 mM e H₂O₂ 30 mM) e polifenoloxidasas (PPO, pirogalol 30 mM), associadas ao metabolismo de lignificação de parede celular foram monitoradas, entre 12-48 horas após a pulverização (HAP) de FOA (200 mL/100 L), em plantas de 'Cabernet Sauvignon' em casa de vegetação. Folhas foram coletadas 12, 24 e 48 HAP, a partir de plantas com rebrotas de 45 dias. Foram utilizadas três plantas por tratamento como repetições biológicas. Amostras foram usadas para extração de proteínas solúveis totais, com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,2. Os extratos foram centrifugados e o sobrenadante foi utilizado como substrato em misturas reacionais. As atividades das duas enzimas foram monitoradas durante 10 minutos e GPX foram lidas a 480 nm e PPO a 410 nm (Cavalcanti et al., 2008; Gauillard et al., 1993). Foi definido como uma unidade relativa de atividade enzimática (UA) a variação de absorvância no comprimento de onda respectivo à enzima, por um miligrama de proteína solúvel por minuto (UA mgP⁻¹ min⁻¹).

Determinações enoquímicas

Para determinação das variáveis enoquímicas, cachos das parcelas experimentais do **Ensaio de Campo** foram coletados, embalados e armazenados a -20 °C. As bagas foram descongeladas e o mosto extraído e macerado dentro das próprias embalagens plásticas. A parte líquida obtida do mosto foi transferida para análises de pH, °Brix e acidez total, em cada amostra. Para obtenção do pH, realizou-se a leitura em potenciômetro calibrado (OIV, 2018: OIV-MA-AS313-15:R2011). Graus Brix (°Brix) das

amostras foram determinados com o auxílio de um refratômetro de bancada (OIV, 2018: OIV-MA-AS2-02:R2012). Acidez total (mEq/L) foi obtida através da titulometria de neutralização (OIV, 2018: OIV-MA-E-AS313-01:R2015).

Análises estatísticas

Estatística descritiva, testes de Normalidade, ANOVA, testes t de Student, testes F e Tukey foram conduzidos utilizando-se o Origin 8.0 (OriginLabCorp., Northampton, MA, EUA).

Resultados e Discussão

No **Ensaio Principal** as substâncias promoveram proteções que variaram entre 31% a 75%, em plantas inoculadas e reinoculadas com suspensão de 10^5 esporângios por mL de *Plasmopara viticola* (Figura 1). As plantas pulverizadas com a calda bordalesa (CB1010), usadas como controle positivo (Ctrl+), atingiram um valor de 67% de proteção. Nesse ensaio, o tratamento FOA na dose selecionada promoveu uma proteção de 75%, sendo o único tratamento a igualar significativamente ($P < 0,05$) os níveis obtidos pelas plantas pulverizadas com a calda bordalesa (Figura 2). As demais substâncias promoveram rendimentos intermediários de proteção de planta, com o extrato pirolenhoso na dose 100 mL/100 L não diferindo ($P > 0,05$) significativamente do controle negativo (plantas pulverizadas com água) (Figura 2).

Para o **Ensaio Confirmatório** (Figura 3), também em casa de vegetação, a adoção das diluições visou também à verificação da hipótese de perda no potencial de proteção, pela redução do volume dos produtos aplicado sobre as folhas. Ao contrário do esperado, as substâncias promissoras na proteção da videira 'Cabernet Sauvignon' ao míldio responderam com incrementos nos percentuais de proteção, entre 66,6% e 92,7%, para *B. subtilis* e FOA, respectivamente. De modo marcante, o FOA promoveu novamente maiores proteções das plantas, quando comparado ao Ctrl+. Entretanto, a eficiência do Ctrl+ (CB1010) também aumentou no **Ensaio Confirmatório**, sugerindo que a pressão de doença foi maior no **Ensaio Principal**, realizado entre set/out de 2017 ($23,3 \pm 3,2$ °C), possivelmente porque as temperaturas diurnas da casa de vegetação apresentaram-se mais amenas que as verificadas na

condução do **Ensaio Confirmatório** no mesmo ambiente, entre nov/dez de 2017 ($26,3 \pm 3,1$ °C).

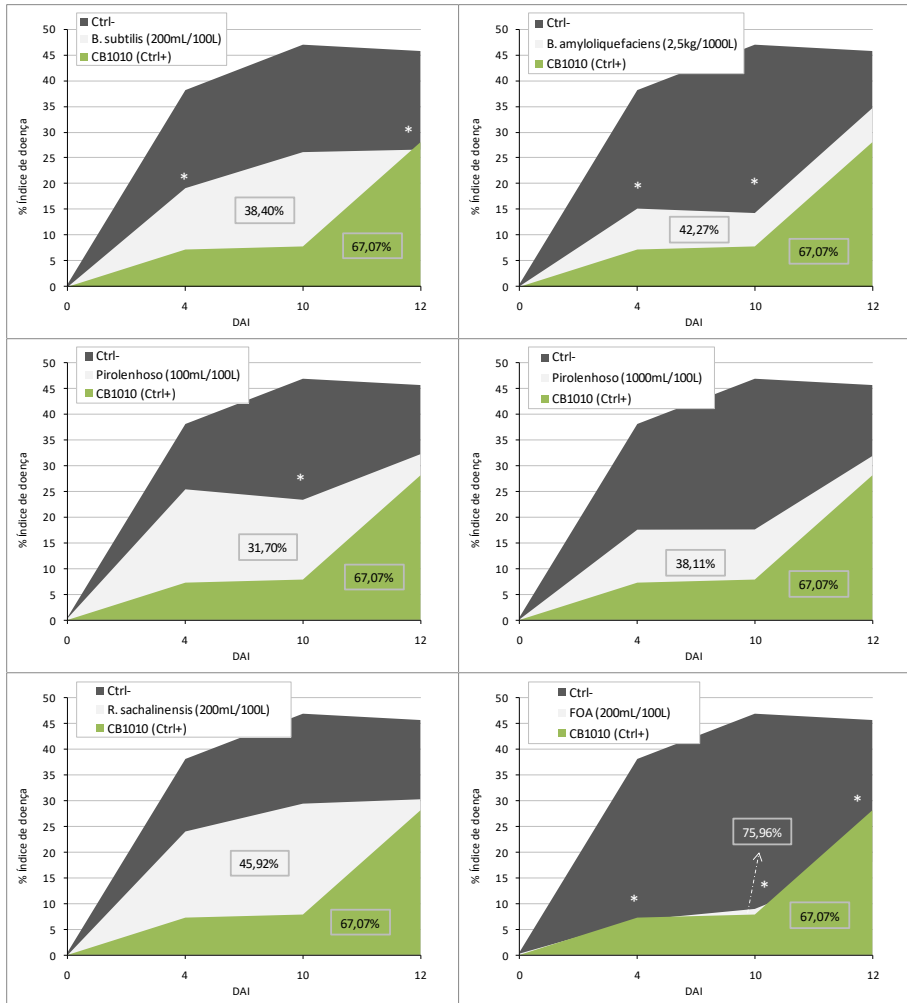


Figura 1. Ensaio Principal (casa de vegetação). Avaliação do progresso do míldio e percentagem de proteção (valores nas caixas) em folhas de videira 'Cabernet Sauvignon', submetidas a diferentes doses e intervalos de pulverização de substâncias em teste. A figura apresenta apenas as doses mais eficientes de *B. subtilis* e FOA, no experimento. Asteriscos dentro de cada dia de avaliação representam valores diferentes entre tratamento e Ctrl-, de acordo como teste t (Student) a um nível de significância de 5%.

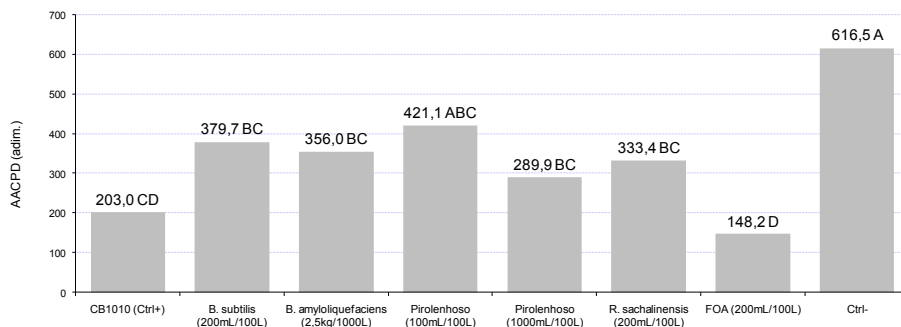


Figura 2. Áreas abaixo da curva de progresso do míldio (AACPD) em folhas de videira ‘Cabernet Sauvignon’ (**Ensaio Principal**). A figura apresenta apenas as doses mais eficientes de *B. subtilis* e FOA, no experimento. Médias seguidas por letras distintas são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

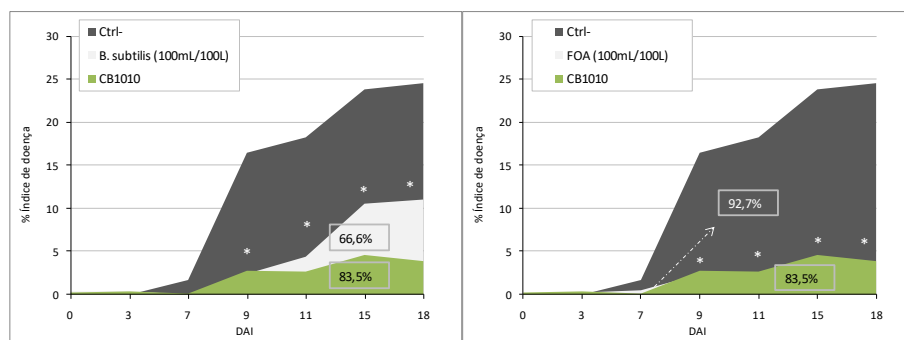


Figura 3. Ensaio Confirmatório. Avaliação do progresso do míldio e % de proteção (valores nas caixas) em folhas de videira ‘Cabernet Sauvignon’, submetidas a diferentes doses e intervalos de pulverização de substâncias em teste. Asteriscos dentro de cada dia de avaliação representam valores diferentes entre tratamento e Ctrl-, de acordo com o teste t (Student) a um nível de significância de 5%.

A partir dos resultados do **Ensaio Principal**, em casa de vegetação, foi selecionada a substância FOA para confirmação da sua eficiência no controle do míldio em ensaio de campo em um vinhedo de ‘Isabel’ durante a safra 2017-2018. Para isso, a substância foi incorporada ao calendário de pulverizações do vinhedo, juntamente com os outros tratamentos experimentais: metalaxil-M + mancozeb (300 g/100 L) e calda bordalesa com diluição clássica (CB1010). Ao final de sete avaliações a partir do início das pulverizações (outubro/2017), foi possível evidenciar que o FOA promoveu 83,4% de proteção da parte vegetativa da copa (sintomas em folhas) (Figura 4).

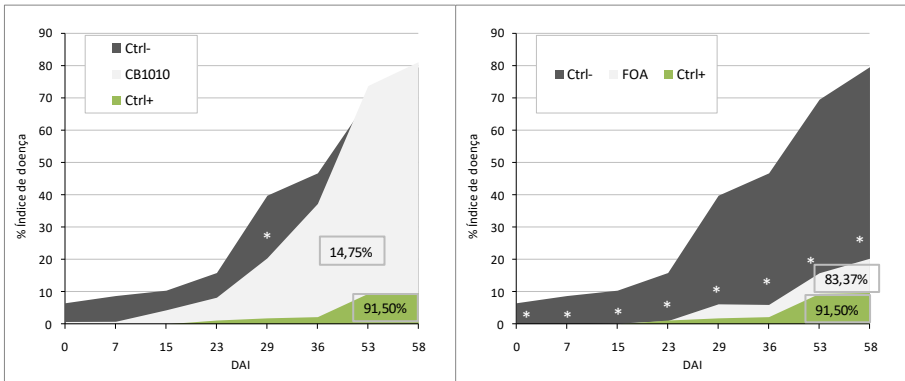


Figura 4. Ensaio de Campo. Avaliação do progresso do míldio e percentagem de proteção (valores nas caixas) em folhas de videira em vinhedo 'Isabel', submetidas a diferentes doses e intervalos de pulverização de substâncias em teste, durante a safra 2017-2018. Asteriscos dentro de cada dia de avaliação representam valores diferentes entre tratamento e Ctrl-, de acordo como teste t (Student) a um nível de significância de 5%.

Trata-se de outro resultado significativo para essa substância, pois, em comparação com a calda bordalesa (o Ctrl+ comparativo à viticultura orgânica), o FOA obteve um desempenho cinco vezes maior, na proteção das partes vegetativas do vinhedo 'Isabel', inclusive igualando-se estatisticamente ($P < 0,05$) às parcelas protegidas por metalaxil-M + mancozeb (Figura 5). Inesperadamente, porém, foi observado um baixo rendimento da calda bordalesa (médias não diferiram do Ctrl-, $P > 0,05$) na proteção das parcelas expostas naturalmente ao inoculo de *P. viticola* no **Ensaio Campo**, no vinhedo utilizado para o experimento (Figura 5).

Com relação à proteção contra as injúrias produzidas pelo míldio sobre os cachos, FOA não diferiu ($P > 0,05$) da calda bordalesa (CB1010) e de metalaxil-M + mancozeb (Ctrl+) usadas para o mesmo fim, e todas mostraram reduções marcantes ($P < 0,05$) na severidade de míldio em cachos, quando comparadas às parcelas do controle negativo (Ctrl-) (Figura 6). Em cachos, as plantas tratadas com FOA responderam com o mesmo padrão observado em folhas, apresentando maiores proteções (89,5%) em comparação com a calda bordalesa (65,4%), a partir dos perfis de área abaixo da curva de progresso de doença (AACPDs) construído sem resposta à eficiência de cada tratamento demonstrada em campo (Figura 7).

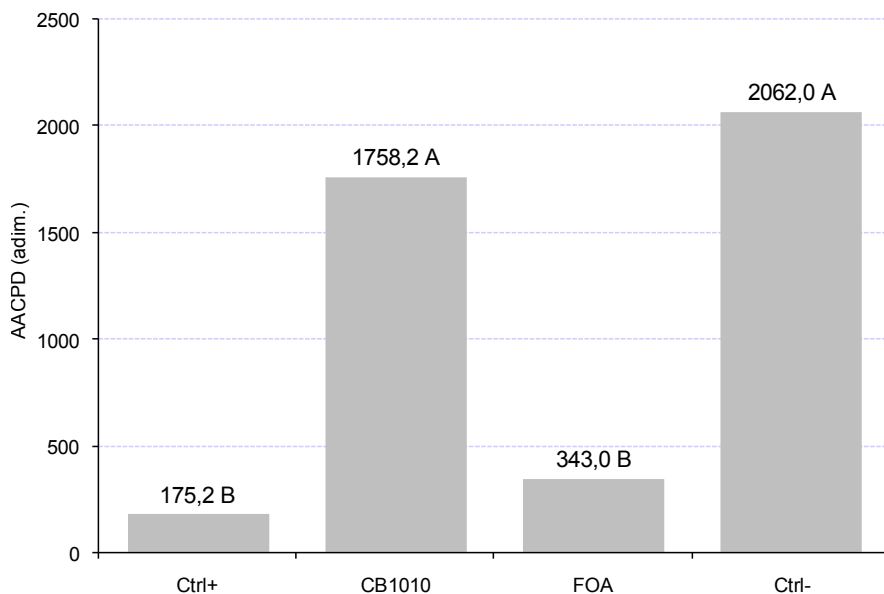


Figura 5. Ensaio de Campo. Áreas abaixo da curva de progresso do míldio (AACPD) em folhas de videira em vinhedo 'Isabel'. Médias seguidas por letras distintas são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

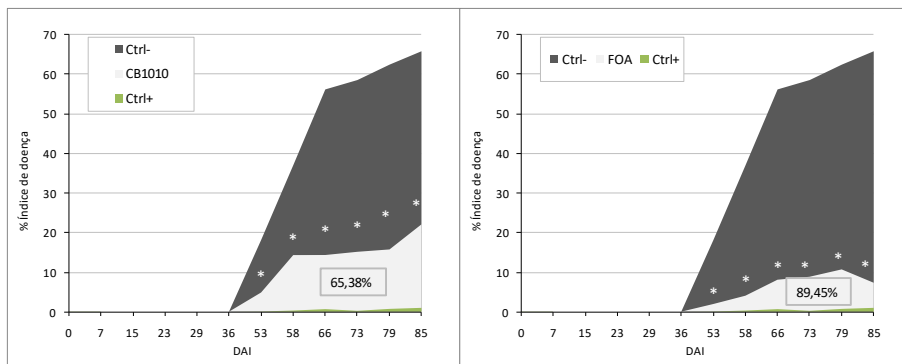


Figura 6. Ensaio de Campo (cachos). Avaliação do progresso do míldio larvado e percentagem de proteção (valores nas caixas) em cachos de videira 'Isabel', submetidas a diferentes doses e intervalos de pulverização de substâncias em teste. Asteriscos dentro de cada dia de avaliação representam valores diferentes entre tratamento e Ctrl-, de acordo com teste t (Student) a um nível de significância de 5%.

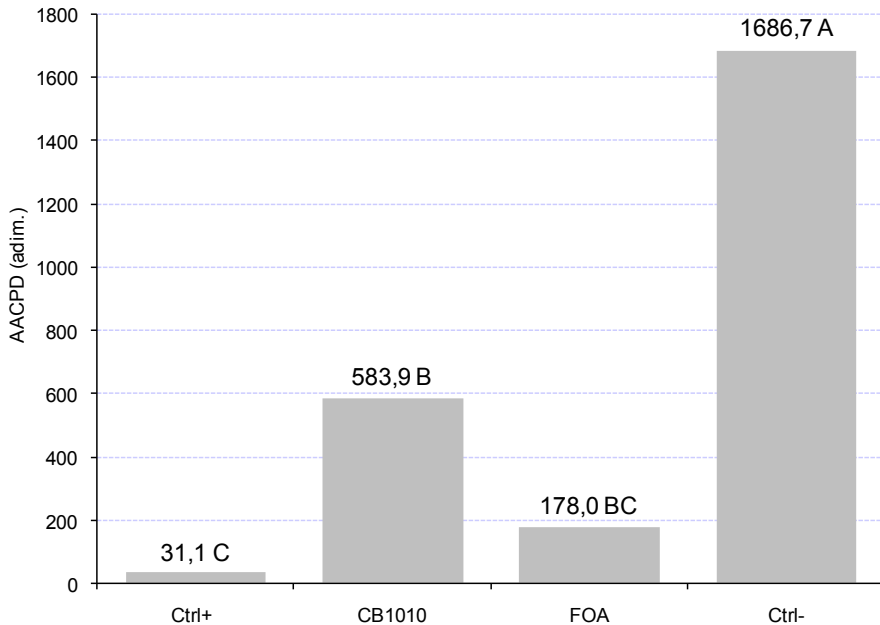


Figura 7. Ensaio de Campo (cachos). Áreas abaixo da curva de progresso do míldio (AACPD) em cachos de videira 'Isabel'. Médias seguidas por letras distintas são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Foi verificado que o mosto das bagas expostas a FOA apresenta perfis de pH, °Brix e de acidez total mais adequados ao aproveitamento para processamento de bebidas, pois revelaram perfis associados a bagas menos injuriadas e mais bem preservadas (Tabela 2). Os valores de características enoquímicas associados a bagas protegidas por FOA e metalaxil-M + mancozeb não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$). Considerando os cachos do Ctrl- (controle negativo), a calda bordalesa também demonstrou capacidade de proteção e preservação das bagas, mas não no mesmo nível de eficiência apresentado pelas outras substâncias adotadas no experimento.

Na realidade, infere-se que o alto rendimento mostrado pelo tratamento FOA em todos os experimentos se deva à presença do fosfito $[(\text{HPO}_3)_2]$ em sua composição. É bem relatado que substâncias a base de fosfito possuem ação eficaz no controle de doenças causadas por oomicetos (Achary et al., 2017). Mesmo assim, não há um consenso em um mecanismo unificado para expli-

Tabela 2. Ensaio de campo: características enoquímicas do mosto, após o calendário de proteção contra o míldio 2017-2018 em cachos de videira 'Isabel'.

Tratamentos ^(*)	pH	°Brix	Acidez Total (mEq/L)
Ctrl(-)	3,11 B	15,06 B	98,44 A
Ctrl(+)	3,18 AB	18,57 AB	81,44 B
CB1010	3,12 B	15,12 B	81,40 B
FOA	3,29 A	20,20 A	83,46 B

(*) Médias seguidas por letras distintas são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05).

car o controle de doenças pelo fosfito, uma vez que já foram evidenciados muitos modos de ação em alvos celulares. Já foram evidenciados desde um efeito direto na inibição de reações de fosforilação, seja por promoção do aumento de formas de polifosfatos inertes, seja por inibição direta sobre fosforilases/quinases, até a ativação de indução de resistência em células vegetais, em resposta a processos de parasitismo (Achary et al., 2017). Evidências para essa 2ª hipótese foram evidenciadas no presente estudo (Figura 10).

Resultados de avaliações de viabilidade e qualidade dos esporângios

Em todos os tratamentos utilizados no **Ensaio Principal**, foram observadas respostas de inibição de viabilidade de esporângios no lançamento de zoósporos para o meio aquoso da lâmina escavada (Figura 8), com diferenças significativas com relação ao Ctrl- (P < 0,05). Ou seja, todas as substâncias testadas no presente trabalho apresentaram maiores ou menores capacidades de danificar a estrutura de dispersão do patógeno, o que pode justificar parcialmente o fato de todas as substâncias terem produzido atrasos no progresso do míldio, conforme apresentado na Figura 2. As duas doses de extrato pirolenhoso testadas produziram as maiores respostas de redução na viabilidade de esporângio com inibição de atividade de zoósporo. Os agentes de controle biológico, *Bacillus subtilis* (200 mL/100 L), *Bacillus amyloliquefaciens* (2,5 kg/1.000 L) e extrato de *Reynoutria sachalinensis* (200 mL/100 L) produziram reduções na viabilidade de esporângio, mas não

inativaram os zoósporos lançados. Por outro lado, FOA (200 mL/100 L) teve baixa influência sobre esporângios, mas inativou zoósporos (Figura 9).

Os ensaios de ação direta das substâncias testadas sobre esporângios frescos coletados de folhas infectadas não tratadas (Figura 9) e inspeção

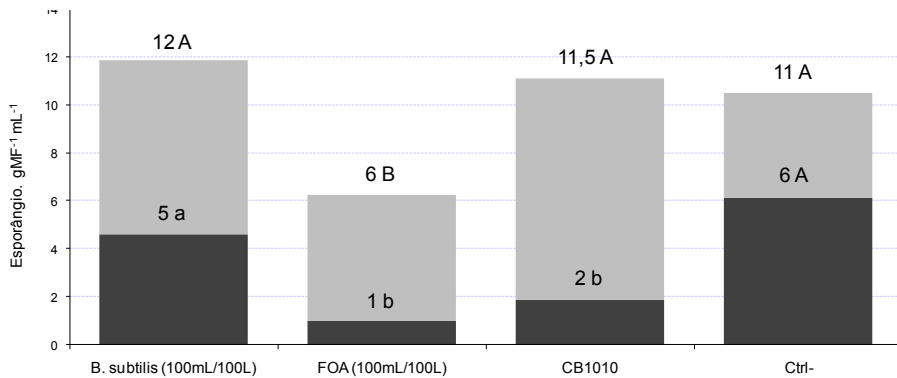


Figura 8. Qualidade de esporângios de *P. viticola* coletados 18 DAP, submetidos às substâncias estudadas no Ensaio Confirmatório. Colunas escuras representam a média de esporângios intactos (sadios) contados em quatro (4) quadrantes de câmara de Neubauer. Colunas claras representam a média dos totais de esporângios (sadios + danificados) ressuspensos e contados imediatamente após a coleta. Valores seguidos com as mesmas letras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($P > 0,05$), letras maiúsculas para esporângios totais e letras minúsculas para esporângios sadios.

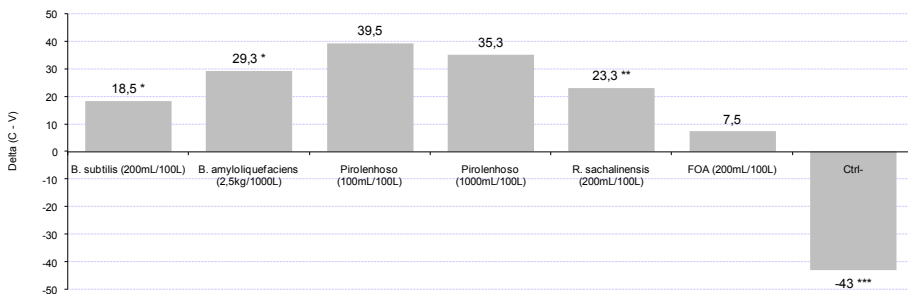


Figura 9. Viabilidade de esporângios sadios (frescos) de *P. viticola* e do lançamento de zoósporos em meio aquoso, submetidos às substâncias testadas no **Ensaio Principal**, que permitiram inspeção e contagem ao microscópio óptico. Asteriscos indicam (***), altíssima atividade, (**) alta atividade e (*) baixa atividade de zoósporos após 15 HAT.

sobre a qualidade de esporângios coletados de folhas infectadas, após 18 dias de pulverizações (DAP) (Figura 8), foram realizados na tentativa de investigar possíveis mecanismos de inibição sobre as estruturas do patógeno. A literatura já reporta que agentes de controle biológico (como *Bacillus* spp.) podem inibir a ação patogênica por meio de mecanismos como competição por nutrientes e espaço, liberação de substâncias antifúngicas e parasitismo sobre o patógeno, reduzindo o processo de parasitismo promovido por patógenos gerais (El-Sharkawy et al., 2018). Com relação ao extrato pirolenhoso, poucas são as demonstrações do mecanismo de ação dessa substância. No entanto, polifenóis diversos já foram relatados na fração não decantada do extrato, podendo haver propriedades antimicrobianas nessas frações que podem subsidiar sua aplicação no controle de doenças (Campos, 2007).

Em videira, já foram evidenciadas respostas de defesa vegetal mediadas a agentes de controle biológico e extratos totais, em doenças causadas por patógenos como *Botrytis cinerea*, *P. viticola* e *Erysiphe necator* (Godard et al., 2009; Perazzolli et al., 2012; Cavalcanti et al., 2014). Tais relatos foram fundamentados tanto na observação dos atrasos nos progressos dessas doenças correlacionados com a detecção de aumentos em teores de fitoalexinasestilbenos (resveratrol, Δ -viniferina, ϵ -viniferina), aumento de atividades de PR-proteínas e lignificação de parede celular. No presente estudo, foi observado que FOA (100 mL/100 L) promoveu uma redução significativa ($P < 0,05$) no total de esporângios ressuspensos de folhas submetidas a pulverizações, 18 DAP, em comparação com *B. subtilis* (100 mL/100 L), CB1010 e o controle negativo (Ctrl-), que não diferiram entre si (Figura 8). Com relação à observação de esporângios sadios observados do total ressuspendido, a calda bordalesa e FOA induziram menores percentuais de inóculo viável dentre os tratamentos testados, com 18% e 16% respectivamente, 18 DAP. Ou seja, apenas o FOA produziu uma diminuição significativa ($P < 0,05$) em aproximadamente a metade do total de esporângios ressuspendidos, 18 DAP. Dessa forma, há um indício de que apenas a substância FOA tenha atrasado o ciclo do patógeno (colonização) no tecido do hospedeiro, impondo uma redução significativa ($P < 0,05$) na produção de inóculo (Figura 9). Tal redução é um indício de uma possível situação envolvendo indução de resistência conferida pela substância testada.

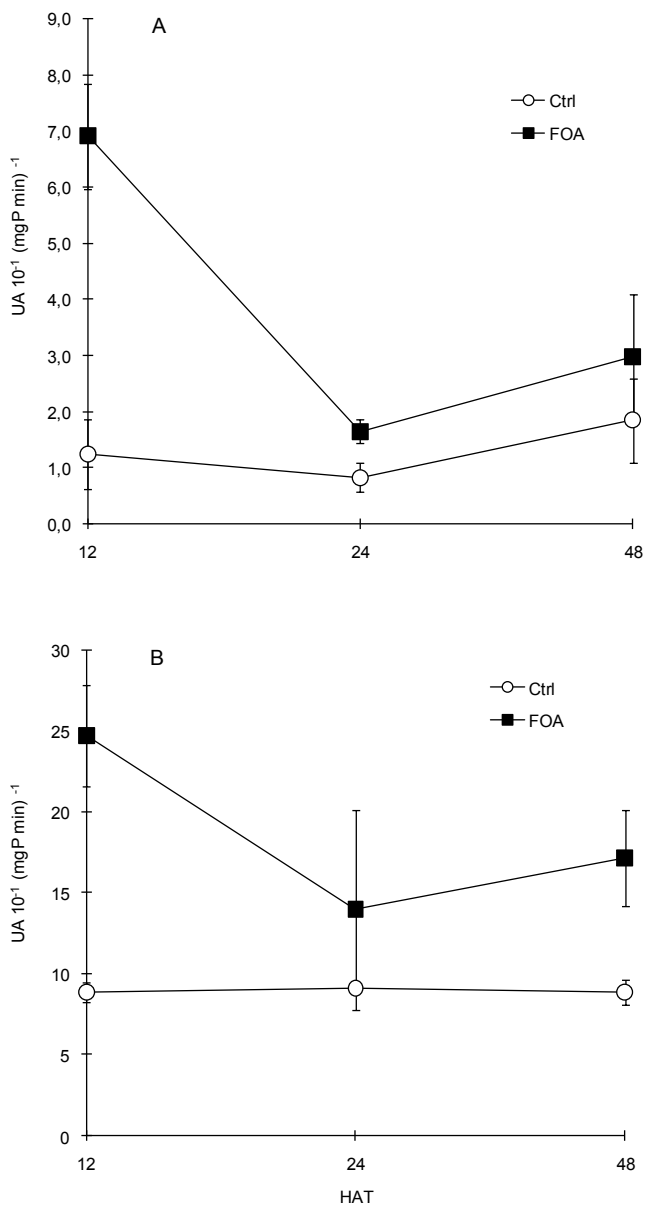


Figura 10. Avaliação Atividade de Enzimas (UA $\text{mgP}^{-1} \text{min}^{-1}$) de: (A) peroxidases de monolignóis (GPX) e (B) polifenoloxidasas (PPO) em folhas de videira 'Cabernet Sauvignon'. Respostas enzimáticas de amostras de tecido foliar fresco monitoradas em 12, 24 e 48 horas após tratamento (HAT) de FOA (100 mL/100 L) em comparação com com água destilada (Ctrl). Barras de erros indicam desvio-padrão da média.

Respostas de duas enzimas relacionadas à patogênese

Para reforçar as evidências para suportar a hipótese de indução de resistência envolvendo o FOA (com fosfito), os perfis de atividades de peroxidases de monolignóis (GPX) e polifenoloxidasas (PPO) foram monitorados 12, 24 e 48 horas após pulverização (HAP) do produto (Figura 10). Foi possível verificar que as atividades de ambas, GPX e PPO, tiveram aumentos proeminentes a partir de 12 HAP atingindo, respectivamente, sete e duas vezes e meia os níveis do controle, em termos de atividade relativa. Após 12 HAP, os níveis de atividades de ambas as enzimas baixaram, mas se mantiveram sempre aumentadas com relação aos controles, até 48 HAP, o que corrobora um indício de perturbação coordenada no metabolismo de lignificação na célula vegetal.

Considerações finais

Substâncias baseadas em agentes de controle biológico (BCA), *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, extrato de *Reynoutria sachalinensis* possuem potencial para serem utilizadas como alternativas ao controle do míldio, adequadas às normativas de viticultura orgânica. No entanto, suas eficiências são menores do que as verificadas em plantas protegidas pela calda bordalesa.

O fertilizante organomineral classe “A” (FOA, com fosfito) demonstra grande potencial no controle do míldio, com performances equiparadas ao do controle químico (metalaxil-M + mancozeb) e da calda bordalesa, em condições de campo, tanto na proteção das partes vegetativas e reprodutivas da planta. A substância atua inativando estruturas de propagação do patógeno, com indicativo de indução de resistência vegetal.

Referências Bibliográficas

- ACHARY, V. M. M.; RAM, B.; MANNA, M.; DATTA, D.; BHATT, A.; REDDY, M. K.; AGRAWAL, P. K. Phosphite: a novel P fertilizer for weed management and pathogen control. *Plant Biotechnology Journal*, v. 15, n. 12, p. 1493-1508, 2017. Doi: 10.1111/pbi.12803.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. *Introduction to plant disease epidemiology*. New York: Wiley& Sons, 1990. 532 p.
- CAMPOS, A. D. Técnicas para produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. (Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica, 65).
- CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Induction of resistance against *Verticillium dahliae* in cacao by a *Crinipellis perniciososa* suspension. *Journal of Plant Pathology*, v. 90, n. 2, p. 273-280, 2008.
- CAVALCANTI, F. R.; BUFFON, V.; SILVA, G. A. da; CZERMAINSKY, A. B. C. Unbalance between peroxidase and polyphenol oxidase activities during an elicitor-induced lignification in 'Merlot' grapevine. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 44., 2011, Bento Gonçalves. Anais... *Tropical Plant Pathology*, Brasília, DF, v. 36, 2011. p. 502.
- CAVALCANTI, F. R.; PEREIRA, V. F.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M. Aspectos da indução de resistência em plantas de videira. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014. (Embrapa Uva e Vinho. Documento, 88).
- CAVALCANTI, F. R.; GARRIDO, L. da R. Controle de doenças. In: GARRIDO, L. da R.; HOFFMANN, A.; SILVEIRA, S. V. da. *Produção integrada de uva para processamento: manejo de pragas e doenças*. Brasília, DF: Embrapa, 2015. v. 4, 85 p. Manual 4.
- CZERMAINSKY, A. B. C. Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de avaliação de doenças em plantas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 34, n. 9, p. 1545-1555, 1999. Disponível em: < https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/AL-SEDE/16480/1/pab97_443.pdf >. Acesso em: 04 nov. 2019.
- EL-SHARKAWYL, H. H. A.; ABO-EL-WAFA, T. S.; IBRAHIM, S. A. A. Biological control agents improve the productivity and induce the resistance against downy mildew of grapevine. *Journal of Plant Pathology*, v. 100, n. 3, p. 33-42, 2018. Doi: 10.1007/s42161-018-0007-0.
- FIORAVANÇO, J. C.; HUNOFF, T. S.; ZILIO, R. A.; CAVALCANTI, F. R. Alternativas para redução de cobre em caldas usadas no controle do míldio da videira. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2015, 8 p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 119).
- GARRIDO, L. da R. Redução da adição ambiental de cobre utilizando outras formulações cúpricas em relação à calda bordalesa para o controle do míldio tardio da videira. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2017, 10 p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 195).
- GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F.; NICOLAS, J. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. *Analytical Biochemistry*, v. 215, n. 1, p. 59-65, 1993. Doi: 10.1006/abio.1993.1554.
- GESSLER, C.; PERTOT, I.; PERAZZOLLI, M. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea*, v. 50, n. 1, p. 3-44, 2011. Doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-9360.

GODARD, S.; SLACANIN, L.; VIRET, O.; GINDRO, K. Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin- and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 47, n. 9, p. 827–837, 2009. Doi: 10.1016/j.plaphy.2009.04.003.

MAGAREY, P. A. Managing downy mildew: winning the war! Adelaide, AU: Australian Government, Grape and wine research and development corporation (GWRDC) , 2010. (Fact Sheet)

OIV. International Organization of Vine and Wine. Technical standards and documents. Methods of analysis. Compendium of International Methods of Analysis of Wine and Musts (2 vol.). Paris, FR: OIV, 2018. Volume 1. Disponível em: < <http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/methods-of-analysis/compendium-of-international-methods-of-analysis-of-wines-and-musts-2-vol>>. Acesso em: 04 de nov. 2019.

PERAZZOLLI, M.; MORETTO, M.; FONTANA, P.; FERRARINI, A.; VELASCO, R.; MOSER, C.; DELLEDONNE, M.; PERTOT, L. Downy mildew resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 in susceptible grapevines partially mimics transcriptional changes of resistant genotypes. *BMC Genomics*, v. 13, n. 660, p. 1471-2164, 2012. Doi: 10.1186/1471-2164-13-660.

VECCHIONE, A.; ZULINI, L.; PERTOT, I.; MUSETTI, R. Biological control of *Plasmopara viticola*: a multisite approach. *Acta Horticulture*, n. 754, v. 754, p. 361-366. 2007. Doi: 10.17660/ActaHortic.2007.754.47.

ZHANG, X.; ZHOU, Y.; LI, Y.; FU, X.; WANG, Q. Screening and characterization of endophytic *Bacillus* for biocontrol of grapevine downy mildew. *Crop Protection*, v. 96, p. 173-179, 2017. Doi: 10.1016/j.cropro.2017.02.018.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Uva e Vinho

Rua Livramento, 515 - Caixa Postal 130
95701-008 Bento Gonçalves, RS

Fone: (0xx) 54 3455-8000

Fax: (0xx) 54 3451-2792

www.embrapa.br

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

Publicação digitalizada (2020)



Comitê Local de Publicações
da Embrapa Uva e Vinho

Presidente

Adeliano Cargnin

Secretário-Executivo

Edgardo Aquiles Prado Perez

Membros

João Henrique Ribeiro Figueredo, Jorge Tonietto,

Klecius Ellera Gomes, Luciana Mendonça Prado,

Nubia Poliana Vargas Gerhardt, Rochelle Martins

Alvorcem, Viviane Maria Zanella Bello Fialho

Supervisão editorial

Klecius Ellera Gomes

Revisão de texto

Edgardo Aquiles Prado Perez

Normalização bibliográfica

Rochelle Martins Alvorcem CRB10/1810

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Edgardo Aquiles Prado Perez

Foto da capa

João Henrique Ribeiro Figueredo