

CIRCULAR TÉCNICA

154

Bento Gonçalves, RS
Dezembro, 2020

Agentes de controle biológico aplicados no substrato promovem proteção equivalente à pulverização de copa contra o míldio, em casa de vegetação

Aline Mallmann Michel
Fabio Rossi Cavalcanti



Agentes de controle biológico aplicados no substrato promovem proteção equivalente à pulverização de copa contra o míldio, em casa de vegetação¹

Introdução

A cultura da videira (*Vitis* spp.) possui reconhecidamente um grande valor econômico no mundo inteiro, por causa da enorme aceitação dos produtos derivados da uva, principalmente o vinho. No entanto, vários fatores podem comprometer o desenvolvimento da planta em condições agrônomicas, sendo o ataque de patógenos um dos mais impactantes. A principal doença da cultura é o **míldio** (*downy mildew*), causado pelo oomiceto *Plasmopara viticola* (Gessler et al., 2011).

Especificamente na cultura da videira, o míldio pode causar perdas de 100% quando não são adotadas medidas de controle. O pseudofungo oomiceto ataca diversos tecidos da planta e, como consequência desse processo de parasitismo, ocorrem lesões foliares conhecidas como manchas de **óleo**, secamento de inflorescências, bagas e brotações. Perdas indiretas também ocorrem, já que, devido ao desfolhamento precoce, há desperdício de reservas pela redução das taxas fotossintéticas e o consequente enfraquecimento da planta (Cavalcanti, 2014). *P. viticola* é um parasita obrigatório (só vive à custa de um hospedeiro), sendo considerado um microrganismo biotrófico que necessita de tecidos verdes de videira para efetivar o seu ciclo reprodutivo (Gessler et al., 2011; Cavalcanti et al., 2019).

Na viticultura convencional, as principais estratégias de controle da doença são baseadas em calendários de pulverização de substâncias químicas. Geralmente, uma diversidade de moléculas é adotada em um esquema de

¹ Aline Mallmann Michel, bióloga, estudante de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, RS; Fabio Rossi Cavalcanti, engenheiro agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS.

controle químico para garantir maior eficiência por alternância entre protetores e sistêmicos, bem como realizar um manejo de resistência (Rosa et al., 2008). Contudo, tais moléculas podem causar riscos ao ambiente e à saúde humana, principalmente quando aplicadas inadequadamente. Aliás, a alta suscetibilidade da planta de videira à doença, as condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento de patógenos, além do manejo inadequado da cultura, fazem com que o cultivo da videira só se viabilize com a aplicação de fungicidas, aumentando os custos de produção, os riscos de intoxicação dos trabalhadores e de contaminação do ambiente (Silveira et al., 2015).

Na viticultura orgânica, o controle de *P. viticola* se baseia em aplicações de produtos com cobre (Cavalcanti et al., 2019). Na região da Serra Gaúcha sua utilização é parte fundamental dos tratamentos fitossanitários, sob forma de calda bordalesa. Contudo, o uso sistemático deste produto em altas concentrações e altos volumes de aplicação, repetido por diversas vezes ao ano, pode causar o acúmulo de cobre no solo, afetando a composição química dos solos (Fioravanço et al., 2015). O excesso do cobre no solo pode causar toxidez na videira. Os sintomas de toxidez aparecem, em geral, ao se reinstalar um vinhedo em solo onde tenha sido arrancado um vinhedo velho. O excesso de cobre provoca uma redução no crescimento da planta, atingindo em maior grau o sistema radicular que tem seu desenvolvimento muito reduzido. O cobre se acumula nas raízes e não migra para as partes aéreas, sendo, portanto, difícil diagnosticar seu excesso por análise foliar (Giovannini, 1997). Segundo Vecchione et al., (2007), a redução do uso do cobre pode ser alcançada pelo uso de alternativas como agentes de controle biológico (*Biological Control Agents*, BCA), produtos naturais ou formulações que permitem dosagens mais baixas de cobre, mantendo uma eficácia adequada contra a doença. Por esta razão, tem potencial uma abordagem para controlar *P. viticola* que possa interferir no desenvolvimento do patógeno em diferentes fases do seu ciclo de vida.

Novas alternativas para o controle de míldio são cada vez mais importantes, pois o patógeno, biotrófico, infecta todas as partes verdes da planta e se desenvolve rapidamente em locais com condições climáticas quentes e úmidas durante toda a estação de crescimento. Microorganismos BCA são fungos, leveduras e bactérias que, além de sua atividade antagonista, também podem ser capazes de induzir o crescimento de plantas controlando patógenos

menos agressivos (Vecchione et al., 2007). Vários outros microrganismos, isolados de rizosfera ou superfícies de uva também foram selecionados como BCA nas últimas décadas para o controle em *P. viticola*, como *Bacillus subtilis* KS1, *Lysobacter capsici* AZ78, *Trichoderma harzianum* T39 e *Fusarium proliferatum* G6. (Zhang et al., 2017; Cavalcanti et al., 2020). Embora *Bacillus* spp. tenham sido relatados como os endofíticos bacterianos mais frequentemente isolados de videiras, seus mecanismos de controle das doenças da videira têm sido raramente estudados (Zhang et al., 2017).

Como busca por alternativas ao controle químico do míldio da videira e para melhor compreensão de seus mecanismos biológicos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de duas cepas de *Bacillus* spp., recomendáveis à viticultura orgânica, administrados em videira ‘Cabernet Sauvignon’ por duas vias, em casa de vegetação: i) por pulverização na copa e ii) por derramamento de suspensão celular do BCA no substrato.

Adicionalmente, fez parte do presente estudo um ensaio in vitro para avaliação direta das suspensões baseadas em *Bacillus*, no controle do míldio.

O desempenho de produtos baseados em BCA na proteção das plantas contra doenças, quando inoculados em substrato, foi investigado à luz da hipótese de que tais compostos, quando percebidos pelo sistema radicular, poderiam ativar um mecanismo inato de proteção sistêmico capaz de dificultar a penetração de patógenos e a eficiência dos seus mecanismos de ataque sobre tecidos foliares.

Material e Métodos

Ensaio experimental

O ensaio experimental foi realizado em casa de vegetação da Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves/RS, entre janeiro e março de 2019. As plantas utilizadas no experimento foram da cultivar Cabernet Sauvignon, com idade de um ano. As plantas foram cultivadas em vasos de um litro, contendo areia, vermiculita e solo peneirado nas proporções 2:1:1. Para obtenção de folhas a serem inoculadas e tratadas, foi efetuada a poda das plantas provenientes

de população clonal, sendo utilizadas rebrotas de 40 dias. Para o ensaio experimental foram utilizados os seguintes tratamentos², obtidos de produtos comerciais adquiridos em dez/2018:

- a) Plantas sem qualquer tratamento (controle negativo);
- b) *Bacillus subtilis* (2 mL/L), pulverizado na copa;
- c) *Bacillus subtilis* (1 mL/L), pulverizado na copa;
- d) *Bacillus subtilis* (2 mL/L), vertido no substrato;
- e) *Bacillus subtilis* “concentrado”³ (125 mL/L), vertido no substrato;
- f) *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa D-747 (granulado dispersível), na concentração de 2,5 g/L, pulverizado na copa;
- g) *Bacillus amyloliquefaciens* cepa D-747 (granulado dispersível), na concentração de 5,0 g/L, pulverizado no substrato;
- h) Calda bordalesa a 0,5% (CB0505) como controle positivo (Ctrl+) na diluição “à meia força” 0,5:0,5, ou seja, 5 g de CuSO₄ e 5 g de CaO em 1 L de água, pulverizado na copa.

O experimento foi conduzido mediante delineamento em blocos casualizados (DBC), com três blocos contendo uma repetição de cada tratamento por bloco. Cada bloco foi individualizado por uma gaiola com estrutura de madeira, envolvido por plástico translúcido. Cada parcela experimental (uma repetição) foi constituída de quatro plantas, com os vasos dispostos contigualmente. A distância entre as parcelas internas a cada bloco foi de 30 cm, sem bordadura. A alta umidade relativa (90-100% UR) do ar foi garantida por umidificadores ultrassônicos no interior da gaiola ligados 24 horas/dia.

Todos os tratamentos foram aplicados em um mesmo momento seguindo um mesmo calendário, em intervalos de quatro dias intercalados a inocu-

² a presente publicação é complementar a Cavalcanti et al. (2020). Tratam-se dos mesmos produtos biológicos, ministrados aqui no substrato ou na copa.

³ o mesmo produto comercial (líquido) de *B. subtilis* (CCN3) foi usado para as três diluições citadas neste trabalho: tratamentos e), d) e c) usaram, respectivamente 125, 2 e 1 mL de produto comercial por litro de água.

lações do patógeno. Em todo o intervalo experimental, foram feitas quatro aplicações de tratamentos e três inoculações do patógeno (descrito adiante). A aplicação das suspensões biológicas foi feita por pulverização em copa até o ponto de escorrimento foliar, seguindo as concentrações de estudo. Plantas de diferentes tratamentos foram protegidas, para as pulverizações, por meio de anteparos de papelão ajustados para impedir a deriva. Uma das aplicações de tratamento foi realizada três dias antes da inoculação do patógeno e do início do progresso de doença.

Para a inoculação dos BCAs no substrato, um volume fixo de 250 mL do composto foi vertido (derramado) cuidadosamente em torno do colo de cada planta de cada parcela experimental, sobre o substrato, obedecendo-se às concentrações de estudo.

Para a inoculação do patógeno, folhas de videiras infectadas, apresentando alta densidade de pulverulências frescas de *P. viticola*, foram coletadas em vinhedo 'Isabel' interno à Embrapa Uva e Vinho e armazenadas em câmara úmida por dois dias, em condições ambiente (24 ± 1 °C, 12 h fotoperíodo). Em seguida, com a ajuda de um pincel e água ultrapura, foi efetuada uma raspagem na parte inferior do limbo das folhas infectadas para ressuspensão dos esporângios e obtenção de uma suspensão com um volume final de 10^5 esporângios/mL. A inoculação se deu por pulverização da suspensão sobre as folhas saudáveis das parcelas experimentais com atomizador manual, mirando principalmente a parte inferior das folhas, até o ponto de escorrimento. Este processo foi repetido a cada dois dias até a observação de sintomas e o início de progresso de doença na copa das plantas.

O experimento em casa de vegetação foi avaliado por uma metodologia de inspeção visual. Por esse procedimento, os níveis de severidade dos sintomas foliares do míldio foram convertidos em uma escala de notas por um avaliador humano com acuidade visual treinada e validada pelo software Rocket v 1.0 (Ampese et al., 2017). Uma escala gráfica (Azevedo, 1998) foi, então, dividida em cinco classes de doença (notas 0 a 4) como referência para cobrir 0-100% de severidade da doença. As avaliações foram organizadas e as notas foram convertidas em um índice percentual de doença (ID%) seguida de transformação angular $\omega = \arcsen(ID^{1/2})$, conforme metodologia de quantificação de doença (Czermainski, 1999). Sobre o valor ω foram realizados testes de normalidade por Shapiro-Wilk, ANOVA e inferência por Tukey a 5%

de probabilidade. Áreas Abaixo da Curva de Progresso de Doença (AACPD) foram calculadas de acordo com Campbell e Madden (1990). Percentagens de proteção (%) foram definidas como sendo a AACPD do tratamento testado sobre a AACPD do Ctrl-.

Ensaio in vitro: viabilidade de esporângios expostos aos BCAs

Por meio deste ensaio, foram investigadas a viabilidade de esporângio de *P. viticola* e sua capacidade de lançamento de zoósporos após exposição aos agentes de controle biológico. A mesma suspensão de esporângios pulverizada nas folhas (10^5 esp./mL) foi utilizada também neste ensaio. Alíquotas dessa suspensão foram transferidas para lâminas escavadas de vidro e expostas aos produtos em estudo. As lâminas foram incubadas por 15 h em caixa tipo Gerbox em incubadora BOD regulada para 25 °C, no escuro. Após a incubação, foram realizadas caracterizações dos esporângios e contagens diretas nas lâminas escavadas, por meio de microscópio óptico com aumento de 400x. As contagens dos esporângios foram computadas como uma variação (Δ) entre esporângios cheios (C), inativados pelo tratamento, menos os vazios (V), ativos no lançamento de zoósporos. Assim: $[\Delta = C - V]$. A cavidade da lâmina escavada foi dividida em quatro quadrantes e os esporângios foram considerados totalizando $n = 100$ esporângios, 25 para cada quadrante. Controles negativos (Ctrl-) foram considerados como esporângios expostos à água destilada.

A atividade de zoósporos a 15 horas após tratamento (HAT) foi definida como: i) “altíssima atividade”, zoósporos nadando agitadamente no meio de imersão - ao nível do controle negativo (Ctrl-); ii) “alta atividade”, todos os zoósporos nadando de modo lento, e iii) “baixa atividade”, zoósporos se mexendo sem deslocamento, ou imóveis.

Análise estatística

Estatísticas descritivas, normalidade, homocedasticidade, ANOVA, comparações de médias incluindo t, F e Tukey foram feitos a 5% de significância por meio do método genérico, em plataforma R, mostrado na Figura 1.

```

par(mfrow=c(1,3))
qqnorm(dbc$variavel); qqline(dbc$variavel)
with(subset(dbc, trat=="T1"), { qqnorm(variavel); qqline(variavel) })
with(subset(dbc, trat=="T2"), { qqnorm(variavel); qqline(variavel) })
par(mfrow=c(1,1))
qqnorm(scale(dbc$variavel), asp=1); qqline(scale(dbc$variavel))
hist(scale(dbc$variavel), freq=FALSE)
curve(dnorm(x), add=TRUE, col=2); lines(density(scale(dbc$variavel)), col=3)
shapiro.test(residuals(m0))
bartlett.test(residuals(m0)~dbc$trat)
bartlett.test(residuals(m0)~dbc$bloco)
Stud <- with(dbc, LSD.test(variavel, trat,
                           group=FALSE,
                           DFerror=df.residual(m0),
                           MSerror=deviance(m0)/df.residual(m0))); Stud
Bon <- with(dbc, LSD.test(variavel, trat,
                           p.adj="bon",
                           DFerror=df.residual(m0),
                           MSerror=deviance(m0)/df.residual(m0))); Bon
Tu <- with(dbc, HSD.test(variavel, trat,
                          DFerror=df.residual(m0),
                          MSerror=deviance(m0)/df.residual(m0))); Tu
Du <- with(dbc, duncan.test(variavel, trat,
                             DFerror=df.residual(m0),
                             MSerror=deviance(m0)/df.residual(m0))); Du
Sk <- SK(x=dbc, y=dbc$variavel, model="variavel-bloco+trat", which="trat")
summary(Sk)

```

Figura 1. Script em R para análise de experimentos em casa de vegetação, em DBC, para estudos dos rendimentos dos tratamentos na proteção de mudas de videira contra o míldio.

Resultados e Discussão

Os sintomas (e sinais) foliares típicos do míldio foram evidenciados logo aos quatro dias após a inoculação (DAI), nas videiras do controle negativo (Ctrl-). Com o andamento dos 49 dias de avaliações experimentais, muitas folhas, devido à severidade da doença nos controles negativos, acabaram secando por completo e se desprenderam do caule. Essas folhas decaídas continuaram a ser avaliadas com nota máxima. Folhas de plantas tratadas com as suspensões baseadas em *Bacillus* spp. permaneceram necrosadas ao longo de todo o tratamento em estágios avançados. No entanto, sinais associados ao patógeno (pulverulência na superfície inferior) foram reduzidos indicando atraso no ciclo de parasitismo, além dessas plantas terem apresentado menor perda de folhas (Figura 2).

Por meio do ensaio experimental proposto, foi observado controle parcial do míldio em plantas pulverizadas com os produtos estudados. Nenhum tratamento proporcionou a completa proteção das plantas à inoculação com *Plasmopara viticola*, ou proteções ao nível da atingida pelas parcelas pulverizadas com calda bordalesa (CB0505) na quantificação do controle da doença (Figuras 3 e 4). Por exemplo, *Bacillus subtilis* na concentração de 2 mL/L administrado na copa proporcionou apenas 5,33% de proteção,

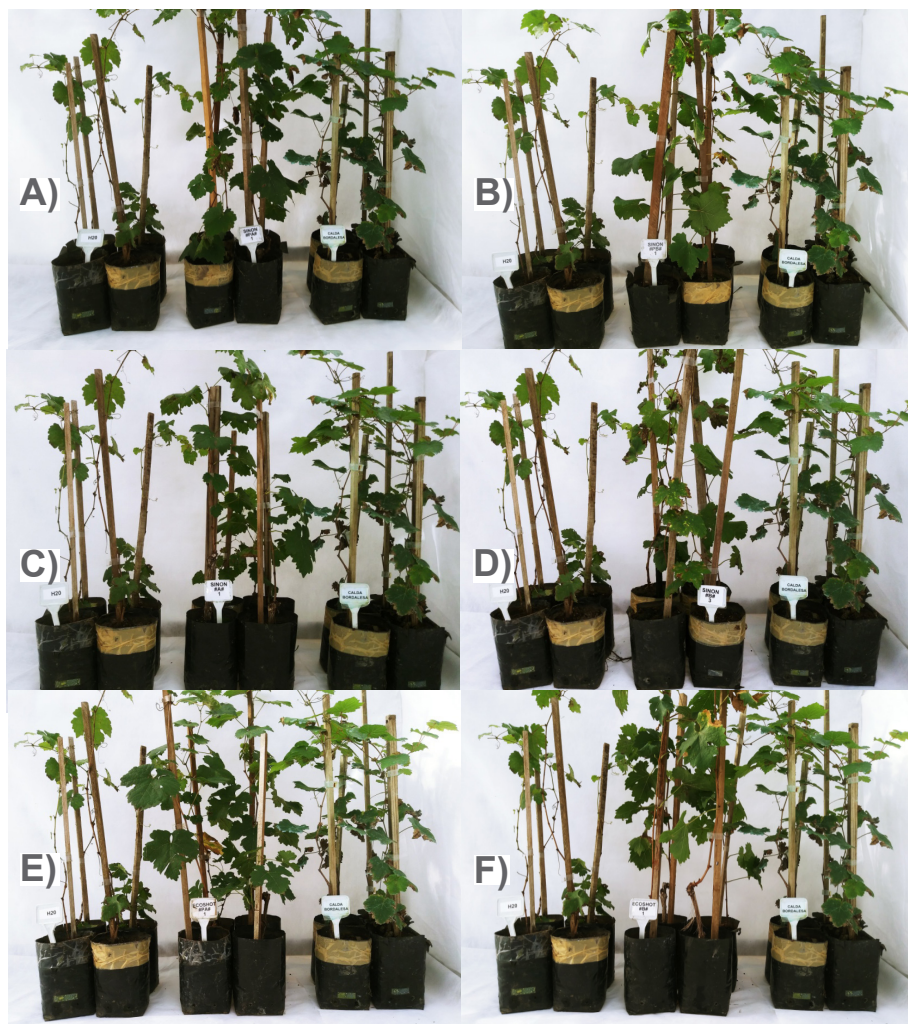


Figura 2. Sintomas gerais, necrose e queda em folhas causados por *Plasmopara viticola*, em plantas de videira ('Cabernet Sauvignon'), 40 dias após a primeira inoculação (DAI). Respectivamente, da esquerda para direita: testemunha não pulverizada (sem tratamento protetor, Ctrl-), produto testado e parcela pulverizada com NA COPA com calda bordalesa (CB0505, Ctrl+). **A)** *Bacillus subtilis*, 2 mL/L - NA COPA; **B)** *Bacillus subtilis*, 1 mL/L - NA COPA; **C)** *Bacillus subtilis*, 2 mL/L - NO SUBSTRATO; **D)** *Bacillus subtilis* "concentrado", 125 mL/L - NO SUBSTRATO; **E)** *Bacillus amyloliquefaciens*, 2,5 g/L - NA COPA; **F)** *Bacillus amyloliquefaciens*, 5,0 g/L - NO SUBSTRATO.

com AACPD de 1362,4, não diferindo estatisticamente ($P > 0,05$) do controle negativo (Ctrl-) (Figura 3).

Curiosamente, considerando o tratamento anterior, o *B. subtilis* com a metade da dose, 1 mL/L pulverizado na copa, promoveu uma proteção um pouco mais alta, de 26,42%, associada a um valor de AACPD de 1059 que, no entanto, não diferiu significativamente do controle negativo (Ctrl-) ($P > 0,05$). Menos do que uma variação experimental, tal resposta pode ser atribuída à hipótese de um possível papel de indução de resistência (IR) impulsionada pelo agente de controle biológico (BCA), sendo que o caráter dose-resposta associado a um indutor independe de altas concentrações (Llorens et al., 2017). Como observado, mesmo com a suspensão diluída tendo aumentado o valor percentual de proteção com relação ao tratamento concentrado de *B. subtilis* pulverizado nas folhas, os níveis de proteção foram menores que os conferidos pela calda bordalesa à meia força (CB0505), a qual atingiu 97,65% de proteção. O CB0505 foi considerado o controle positivo (Ctrl+) do experimento (Figura 3).

Com relação ao tratamento suspensão de *B. subtilis* ministrado diretamente no solo, na dose 2 mL/L, foi verificada proteção que atingiu 47,22%, com um atraso significativo ($P < 0,05$) no progresso do míldio até 27 DAI. Este resultado

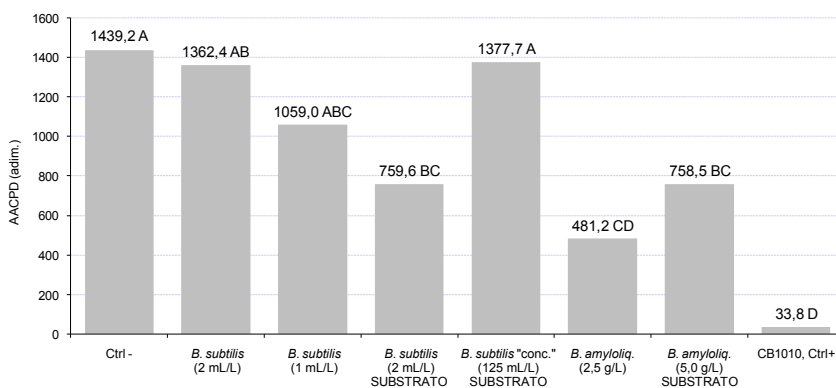


Figura 3. Áreas abaixo da curva de progresso do míldio (AACPD) em folhas de videira 'Cabernet Sauvignon', em condições de casa de vegetação. Tratamentos estão especificados junto ao eixo horizontal. Médias seguidas por letras distintas são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

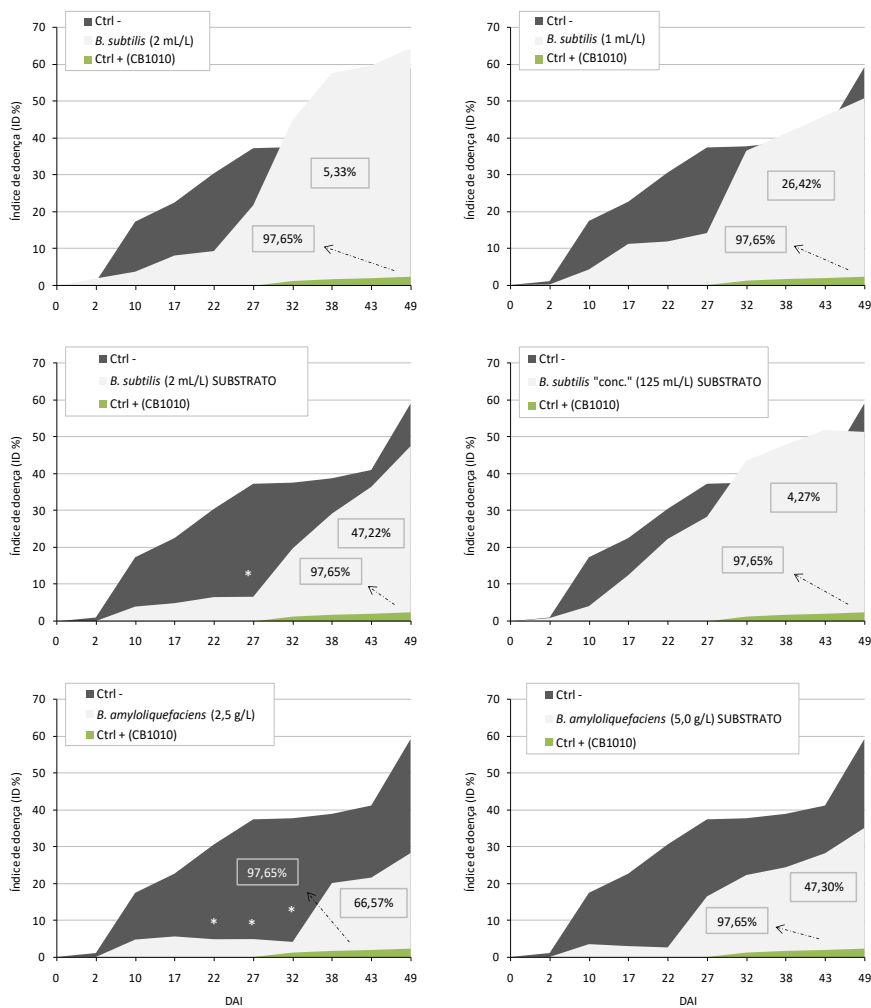


Figura 4. Avaliação do progresso do míldio e percentagem de proteção (valores nas caixas) em folhas de videira 'Cabernet Sauvignon', submetidas a diferentes agentes de controle biológico pulverizados na copa ou vertidos no substrato. Tratamentos e suas vias de aplicação estão identificados nas legendas referentes ao gráfico respectivo. 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%.

se destaca devido ao fato do tratamento com o mesmo BCA, vertido no solo, e com maior concentração (125 mL/L), não ter promovido proteção da planta da videira contra o patógeno, uma vez que o índice de proteção observado foi muito baixo, atingindo apenas 4,27% (Figura 3). Ou seja, aparentemente, um possível efeito sistêmico atribuído ao BCA também parece estar dissociado à diluição do mesmo, em termos de unidades formadoras de colônia (UFC) de *B. subtilis* por mililitro. Além disso, a explicação para o atraso no progresso de doença se afasta da hipótese de ação direta do BCA sobre o patógeno, neste caso, uma vez que a inoculação do BCA no solo não promove contato direto entre a bactéria e o oomiceto. Vale lembrar que a hipótese do contato direto vista em Cavalcanti et al. (2020) também foi investigada neste trabalho. Assim, pesquisas para elucidar mecanismos de ação sistêmica associados à aplicação de BCA em substratos de plantas de videira terão de ser conduzidos para explicar com exatidão o efeito específico de proteção do *B. subtilis* aplicado ao substrato.

Na literatura, o controle de míldio da videira associado à aplicação de *Bacillus* spp. vem sendo relatado nos últimos anos. Furuya et al. (2011) obtiveram resultados promissores após utilização de cepas de *B. subtilis* na redução da severidade dessa doença em condições de campo. Zhang et al. (2017) também obtiveram resultados marcantes com dois *Bacillus*, GLB191 (*B. subtilis*) e GLB197 (*B. pumilus*), em duas safras (2013 e 2014). Os autores sustentam que o mecanismo do controle é impulsionado a partir da pré-aplicação do BCA previamente à entrada da doença, de modo a permitir que o *Bacillus* possa colonizar os tecidos foliares e secretar compostos antibióticos diretamente nos sítios (foliares) do parasitismo, antes do ataque do patógeno (Zhang et al., 2017).

De fato, a qualidade da colonização é um fator essencial para interação de um BCA com patógenos e a colonização de *Bacillus* spp. no substrato, na rizosfera e em tecidos radiculares tem sido investigada (Zhang et al., 2017). Zhang et al. (2011) relataram o *B. subtilis* N11 capaz de colonizar de modo eficaz rizosfera de bananeira, inclusive com penetração na raiz. Ren et al. (2013) conseguiram evidenciar que *B. pumilus* (cepa SX001) foi capaz de colonizar tecidos internos de raízes de *Populus* (choupo, uma árvore típica da América do Norte), inclusive com observação da migração dos BCAs através de caules e folhas. No entanto, ainda se considera que o controle biológico

do míldio da videira seja mais efetivo com a garantia da colonização de BCAs em folhas, uma vez que o sítio de parasitismo do patógeno se localiza justamente no tecido foliar do hospedeiro.

Com relação aos tratamentos baseados em *Bacillus amyloliquefaciens*, de um modo geral foi evidenciado maior percentual de proteção de 'Cabernet Sauvignon' contra o míldio, em comparação a *B. subtilis*. Ambos os veículos de aplicação, pulverização na parte aérea e aplicação no solo, produziram respostas de atraso no progresso de doença (Figura 4). *B. amyloliquefaciens* (2,5 g/L) pulverizado na copa das plantas promoveu 66,57% de controle do míldio, o maior percentual de proteção evidenciado no presente estudo. Até 32 DAI foi verificado um significativo ($P < 0,05$) atraso no progresso do míldio (Figura 3). A mesma suspensão contendo *B. amyloliquefaciens* aplicada ao solo, com o dobro da concentração (5,0 g/L), promoveu atraso não significativo, de acordo com o teste t de Student ($P < 0,05$). Mesmo assim, foi considerado que o tratamento por adição de BCA no solo pôde promover um nível intermediário de proteção das plantas (47,30%) contra *P. viticola*. Como revisado por El-Sharkawy et al. (2018), um agente de controle biológico pode possuir vários mecanismos para antagonismo ao patógeno, incluindo competição por nutrientes e espaço no sítio de parasitismo, produção de compostos antifúngicos e processos de hiperparasitismo. Adicionalmente, BCA podem induzir resistência sistêmica por enrijecimento celular (*strengthening cell walls*) e promover incrementos na fisiologia da planta, estimulando a absorção, mobilização e disponibilidade de nutrientes e hormônios em processos que vão desde a fixação de nitrogênio até a biossíntese de clorofila (El-Sharkawy et al., 2018).

Comparativamente ao controle positivo (CB0505), apenas o tratamento *B. amyloliquefaciens* (2,5 g/L), pulverizado na copa, promoveu controle da doença num mesmo patamar estatístico, de acordo com o teste de Tukey (Figuras 3 e 4). Todos os demais tratamentos baseados em *Bacillus* spp. mostraram performances abaixo da eficiência apresentada por CB0505. Isso, até certo ponto, foi um resultado esperado, pois o cobre ainda é o elemento mais efetivo nas diferentes estratégias de controle de *P. viticola*, em aplicações diretas no dossel vegetativo (La Torre et al., 2018).

Fez parte do presente estudo um ensaio in vitro para avaliação direta das suspensões baseadas em *Bacillus* contra estruturas do *P. viticola*, em termos

de viabilidade de esporângios e atividade de zoósporos. Por este ensaio, foi evidenciado que apenas *B. subtilis* “concentrado” (125 mL/L) e *Bacillus amyloliquefaciens* (2,5 g/L) paralisaram a função dos esporângios em lançarem zoósporos para o meio aquoso (Figura 5). Respectivamente, os valores de Δ atingiram 80,88% e 90,87%, sem atividade de zoósporos verificada, após 15 h de exposição aos produtos (Figura 6). Esses resultados indicam uma ação de paralisação na viabilidade de zoosporângios de *P. viticola* e estão equivalentes com os encontrados por Cavalcanti et al. (2020), em diferentes concentrações. Mesmo com a confirmação da inibição com a concentração de 125 mL/L, *B. subtilis* diluído 1 mL/L, ao contrário, surpreendentemente pareceu ter estimulado a viabilidade de esporângios e a atividade de zoósporos (Figura 6). Também, a despeito das inibições verificadas in vitro por meio do contato direto entre os BCA em estudo e estruturas do patógeno (esporângios), tal mecanismo não pode explicar o controle de míldio obtido pelos tratamentos baseados em *Bacillus* que foram administrados no solo, uma vez que os mesmos não entraram em contato direto com o inóculo do patógeno, nem com o tecido colonizado por ele, na folha de ‘Cabernet Sauvignon’.

Portanto, a elucidação precisa do mecanismo do controle biológico obtido com inoculação de *Bacillus* em substrato, para a proteção da videira contra o míldio, permanece como meta de pesquisa subsequente ao presente estudo.

Considerações Finais

a. Suspensões baseadas em *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens*, quando pulverizadas em folhas, reduzem o progresso de míldio em condições de casa de vegetação. Essas observações confirmam as obtidas por Cavalcanti et al. (2020). No entanto, o nível atingido pelo controle biológico promovido por esses agentes se apresenta abaixo do desempenho do cobre, nas diferentes concentrações avaliadas;

b. Suspensões baseadas em *Bacillus subtilis* (2 mL/L) e *Bacillus amyloliquefaciens* (5,0 g/L), quando administradas no substrato, promovem reduções no progresso de míldio em condições de casa de vegetação. O mecanismo exato desse controle biológico ainda precisa ser investigado;

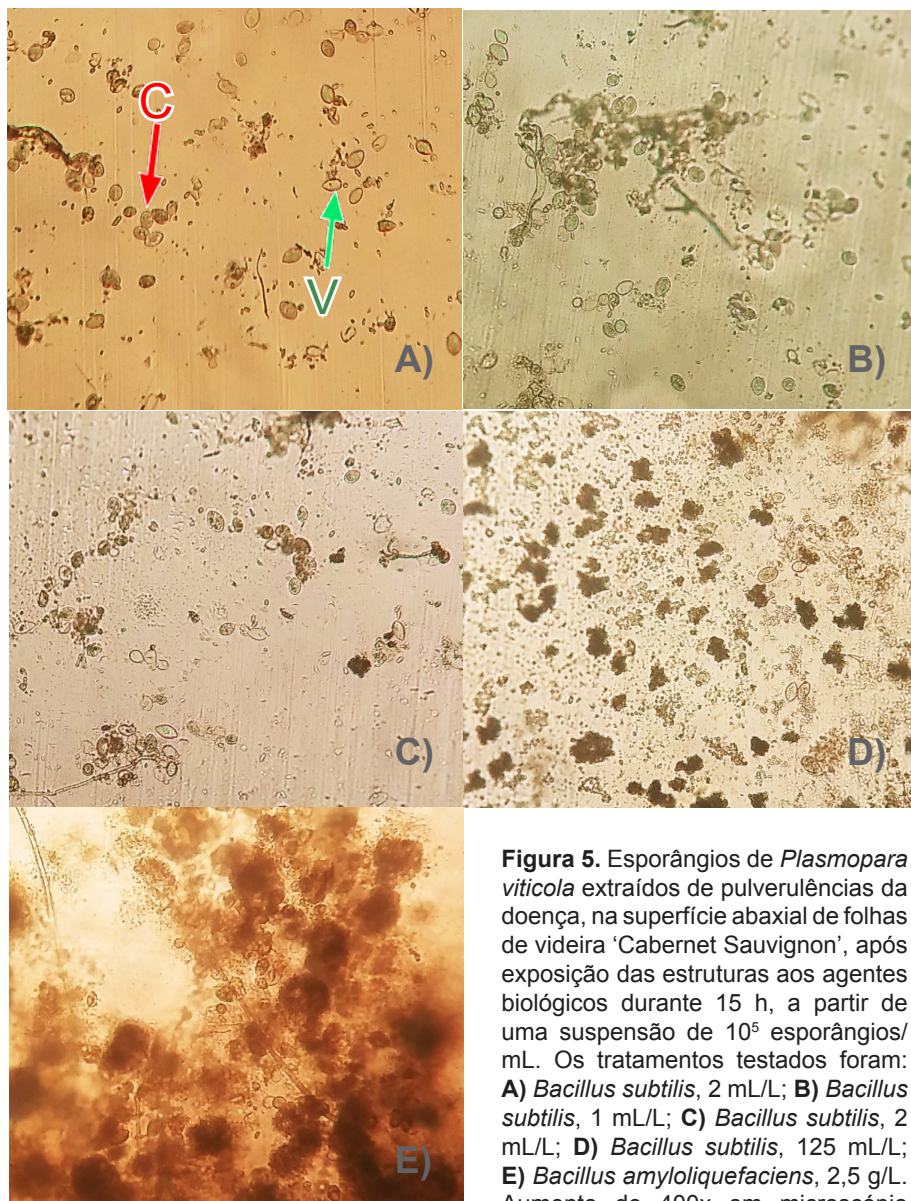


Figura 5. Esporângios de *Plasmopara viticola* extraídos de pulverulências da doença, na superfície abaxial de folhas de videira ‘Cabernet Sauvignon’, após exposição das estruturas aos agentes biológicos durante 15 h, a partir de uma suspensão de 10^5 esporângios/mL. Os tratamentos testados foram: **A)** *Bacillus subtilis*, 2 mL/L; **B)** *Bacillus subtilis*, 1 mL/L; **C)** *Bacillus subtilis*, 2 mL/L; **D)** *Bacillus subtilis*, 125 mL/L; **E)** *Bacillus amyloliquefaciens*, 2,5 g/L. Aumento de 400x em microscópio óptico. Barra de referência ~100 μm. Seta vermelha indica esporângio cheio (C), enquanto seta verde indica esporângio vazio (V).

c. Bacillus amyloliquefaciens (2,5 g/L) pulverizado na copa produz um controle de mildio comparável ao promovido pela calda bordalesa (CB0505). O mecanismo parcial que justifica o desempenho desse BCA em contato direto com as folhas, na dose testada, reside no fato desse agente produzir inibição significativa ($P < 0,05$) da etapa de atividade de esporângios de *P. viticola* e consequente interrupção no lançamento de zoósporos, no ciclo de parasitismo do patógeno.

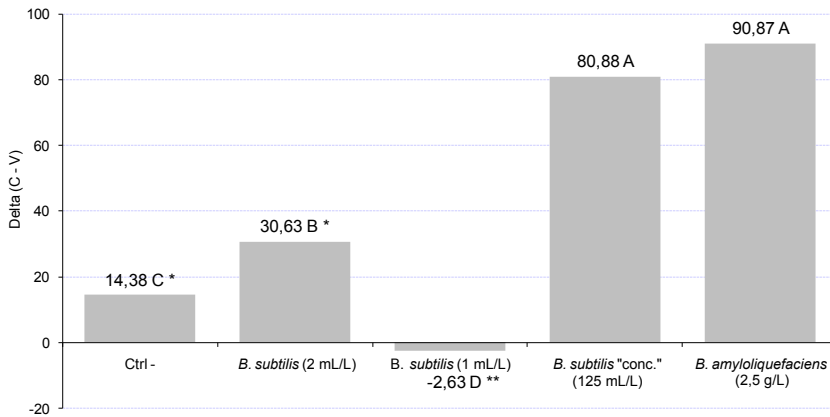


Figura 6. Viabilidade de esporângios saudáveis (frescos) de *P. viticola* e do lançamento de zoósporos em meio aquoso, submetidos aos agentes de controle biológico. Tratamentos estão especificados junto ao eixo horizontal. Asteriscos indicam (**), altíssima atividade, (**) alta atividade e (*) baixa atividade de zoósporos após 15 HAT.

Bibliografia

AMPESE, L. C.; LOBATO, A.; CAVALCANTI, F. R. ROCKET: ferramenta para validar a detecção visual de um avaliador. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., 2017; ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO, 11., 2017, Bento Gonçalves. **Resumos...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2017. p. 56. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 103). Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/162552/1/Anais-15IC-2017-56.pdf>>. Acesso em: 24 ago. 2020.

AZEVEDO, L. A. S. de. **Manual de quantificação de doenças de plantas**. São Paulo: Novartis Biociências, 1998.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Wiley & Sons, 1990. 532 p.

CAVALCANTI, F. R. **Thermal Pest Control (TPC) III**: percepção do fluxo de ar quente no tecido foliar da videira e impactos sobre o metabolismo antioxidativo, membrana celular e fotossíntese. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 165). Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/112753/1/Cot165.pdf>>. Acesso em: 24 ago. 2020.

CAVALCANTI, F. R.; CASSUBA, K. F.; FIORAVANÇO, J. C. **Produtos com menor teor de cobre para o controle do míldio em viticultura**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2019 (Embrapa Uva e Vinho. **Circular Técnica** 146), 24p. Disponível em: < <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1115614>>. Acesso em: 24 ago. 2020.

CAVALCANTI, F. R.; CASSUBA, K. F.; FIORAVANÇO, J. C. **Avaliação de produtos biológicos e um indutor de resistência no controle do míldio da videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2020 (Embrapa Uva e Vinho. **Circular Técnica** 149), 24p. Disponível em: < <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1124483/1/CIRCULAR-TECNICA-149-PUBLICA-229-BIOLOGICOS-versao-2020-08-19.pdf>>. Acesso em: 24 ago. 2020.

CZERMAINSKI, 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, set. 1999. Disponível em: < https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/AI-SEDE/16480/1/pab97_443.pdf>. Acesso em: 24 ago. 2020.

EL-SHARKAWY, 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, p. 33–42, March 2018.

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. (Embrapa Uva e Vinho. **Circular Técnica**, 119). Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/130797/1/Circular-Tecnica-119.pdf>>. Acesso em: 24 ago. 2020.

FURUYA, S.; MOCHIZUKI, M.; AOKI, Y.; KOBAYASHI, H.; TAKAYANAGI, T.; SHIMIZU, M.; SUZUKI, S. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KS1 for the biocontrol of grapevine fungal diseases. **Biocontrol Science and Technology**, v. 21, n. 6, p. 705-720, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583157.2011.574208>.

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, April 2011. Doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-9360.

GIOVANNINI E. Toxidez por cobre em vinhedos. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 3, n. 2, p. 115-117 1997.

LA TORRE, A.; IOVINO, V.; CARADONIA, F. Copper in plant protection: current situation and prospects. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 57, n. 2, p. 201-236, 2018. OI: https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-23407.

LLORENS, E.; GARCIA-AGUSTIN, P.; LAPENA, L. Advances in induced resistance by natural compounds: towards new options for woody crop protection. **Scientia Agricola**, v. 74, n. 1, p. 90-100, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2016-0012>.

REN, J. H.; LI, H.; WANG, Y. F.; YE, J. R.; YAN, A. Q.; WU, X. Q. Biocontrol potential of an endophytic *Bacillus pumilus* JK-SX001 against poplar canker. **Biological Control**, v. 67, n. 3, p. 421-430, 2013. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2013.09.012.

ROSA, R. C. T. da; CAVALCANTI, V. A. L. B.; COELHO, R. S. B.; PAIVA, J. do E. de. Efeito de produtos alternativos e de fungicidas no controle do míldio da videira. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 3, p. 256-258, jul./sept. 2008. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052008000300010>.

SILVEIRA, S. V. da; GARRIDO, L. da R.; HOFFMANN, A. (Ed.). **Produção integrada de uva para processamento**: bases para adoção da produção integrada. Brasília, DF: Embrapa, 2015. v. 1, 72 p. Manual 1. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/uva-e-vinho/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1060087/producao-integrada-de-uva-para-processamento-bases-para-a-adocao-da-producao-integrada>>. Acesso em: 12 nov. 2020.

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

ZHANG, N.; WU, K.; HE, X.; LI, S.-Q.; ZHANG, Z. H.; SHEN, B.; YANG, X.-M.; ZHANG, R.-F.; HUANG, Q.-W.; SHEN, Q.-R. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11. **Plant and Soil**, v. 344, n. 1, p. 87-97, July 2011. DOI: 10.1007/s11104-011-0729-7.

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 Cargini

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

Fabio Rossi Cavalcanti