

100

Circular
TécnicaBento Gonçalves, RS
Julho, 2014

Autores

Fabio Rossi Cavalcanti

Eng. Agrôn., Dr., Pesquisador,
Embrapa Uva e Vinho,
Bento Gonçalves, RS,
fabio.cavalcanti@embrapa.br

José E. B. de A. Monteiro

Eng. Agrôn., Dr., Pesquisador,
Embrapa Informática Agropecuária,
Campinas, SP,
eduardo.monteiro@embrapa.br

Marcus A. K. Almança

Eng. Agrôn., Dr., Professor
Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia,
Bento Gonçalves, RS,
marcus.almanca@bento.ifrs.edu.br

Thiago Sfreddo Hunoff

Graduando em
Tecnologia em Alimentos
Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia,
Bento Gonçalves, RS,
thiagosfreddo@hotmail.com

Carine Rusin

Graduando em
Tecnologia em Horticultura
Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia,
Bento Gonçalves, RS,
carine.rusin@gmail.com

Thermal Pest Control (TPC) II: Aspectos Gerais do Efeito Biológico do Fluxo de Ar Quente na Proteção da Videira contra o Míldio

Introdução

Em 1996, foi concedido pelo Departamento de Patentes e Marcas Registradas dos EUA (USPTO), um direito de prioridade (US5934013) ao Sr. Florêncio Lazo Barra, que apresentava um método para aplicação de ar quente propelido por ventilador na agricultura (BARRA, 1997). O método para trocar ar frio por ar quente, a ser expelido sobre o cultivo, dependia de propulsão por trator e apresentava-se como uma alternativa mecanizada ao uso de fogueiras a lenha, aquecedores de combustível, ventiladores estáticos ou hélices, e até mesmo o uso de helicópteros no combate aos efeitos destrutivos da geada sobre cultivos.

Depois, em 2002, um termo de depósito (US7134239) emitido pelo mesmo departamento, foi incorporado à patente anterior, já designando e contextualizando o método tratorizado de aplicação do ar quente como sendo uma ferramenta para o controle térmico de pragas. O texto do pedido da patente descrevia, com riqueza de detalhes, a natureza física do fluxo de ar quente a ser aplicado sobre o dossel vegetal, e apresentava o método como uma alternativa ao controle por uso indiscriminado de inseticidas na fruticultura. De acordo com o documento, este controle poderia ser feito, em termos gerais (sem apresentação de qualquer dado experimental específico), pela alteração térmica imposta pelo método sobre o habitat de insetos e microrganismos, sendo mencionados efeitos biológicos de natureza tão diversa como pasteurização, desidratação de insetos, imposição de danos em suas asas, até a eliminação dos mesmos e de fungos, como *Botrytis cinerea* (BARRA, 2002).

Mais recentemente, em 2012, um pedido de prioridade, concedido pela Organização Mundial de Propriedade Intelectual (WIPO, WO 2013147962), documentou (já referindo o método como "tecnologia") que os efeitos resultantes do aperfeiçoamento do método inaugurado por Lazo Barra poderiam trazer ganhos agrônômicos em termos de melhora de polinização, ganho de cor e peso em frutos, teor antioxidante, enrijecimento de casca e ativação de fenômenos associados à Resistência Sistêmica Adquirida (*System Acquired Resistance*, SAR), que é um importante mecanismo de defesa da célula vegetal a infecções por biotróficos (FISHER; DAWSON, 2013). Com respeito à SAR, a imprensa já vinha publicando reportagens circunstanciais (sem evidências experimentais robustas) a respeito da "tecnologia", que está no Brasil desde 2007 com o nome de *Thermal Pest Control* (TPC), reportando indução de resistência (IR) e/ou proteção de plantas de videira contra a incidência de doenças, principalmente o míldio (IBRAVIN, 2011; ALBUQUERQUE, 2013; EBERT et al., 2013a; EBERT et al., 2013b). Isso, a partir da exposição da copa dos vinhedos ao tratamento baseado em fluxo de ar quente (FAQ) pelo TPC, um choque térmico extremamente rápido (de 0,5 a 2s), mais ou menos conforme descrito nas patentes mais recentes e no trabalho de Monteiro et al. (2014), e quase sempre num contexto de substituição de pesticidas sintéticos no controle de doenças.

Tratamentos baseados na transferência de calor podem ser aplicados em um contexto de proteção de plantas, através de métodos de controle térmico (físico), quase sempre em um contexto de manejo integrado de pragas e doenças (MIPD) e mirando no parasita, ou seja, visando ao dano direto sobre o inseto ou fungo. De um modo geral, esses métodos envolvem i) exposição direta a chamas; ii) exposição ao infravermelho; iii) uso de vapor e iv) de ar comprimido (controle pneumático) (VINCENT et al., 2001). Por dedução, o uso do fluxo de ar quente pode ser considerado um método ativo de controle físico, abiótico, pois consiste no uso de alguma forma de energia para destruir, injuriar ou induzir estresse a pragas e patógenos, ou removê-los do ambiente. Entre as décadas de 1960 até meados da de 90, muitos trabalhos envolvendo pragas de alface, algodão, alfafa, ervilhas, crucíferas, alhos e cebolas foram conduzidos no intuito de investigar a viabilidade do uso do controle térmico e pneumático na proteção de plantas, bem como na desfolha, polinização e controle de plantas invasoras (VINCENT et al., 2001).

Realmente, existe um número considerável de trabalhos que utilizam o calor como fundamento de métodos para o controle de doença, quase sempre envolvendo banhos de água ou promoção de atmosfera de estresse por calor, para redução de inóculo residual (fungos, vírus, bactérias e nematoides) e/ou assepsia de propágulos, em viveiros de plantas de videira ou outras espécies (LEAR; LIDER, 1959; NEGA et al., 2003; UCHANSJI et al., 2004; TURECHEK; PERES, 2009; CAVALCANTI et al., 2013). Nesses trabalhos, as temperaturas encontradas giram em torno de 35-60°C, em tempos de exposição que vão de um minuto a 12 horas ou até mais, em intervalos de semanas ou meses. Há trabalhos envolvendo indução de resistência (SAR ou outro mecanismo) que utilizam exposições em torno de 50°C por 20 s (WIDIASTUTI et al., 2011; 2013). Contudo, até o presente momento, não foram encontrados na literatura trabalhos com base científica abordando exposições térmicas muito rápidas (0,5, 1, 2 até 5 s) a temperaturas tão extremas (> 100°C) em tecidos vivos, além do presente estudo e alguns trabalhos recentes envolvendo TPC (DOMINGUES, 2013; MONTEIRO et al., 2014; CAVALCANTI, 2014).

Dentre os benefícios e vantagens prometidos como alternativas à agricultura convencional, e

sugestões de ‘mecanismos biológicos’ trazidos ao debate pelas documentações associadas ao TPC e pela imprensa, destaca-se a indução de resistência vegetal, marcadamente por meio da SAR, como um mecanismo de proteção de cultivos e controle de doenças. Nesse ponto, há que se esclarecer alguns aspectos a respeito da ação TPC e, a partir dos quais se baseiam, inclusive, as hipóteses do presente estudo: i) o tratamento térmico por FAQ pode injuriar o patógeno ou inseto; ii) o FAQ induz um estresse abiótico e físico (sem envolvimento de moléculas) sobre a célula vegetal; iii) o pretense aparecimento de SAR é uma consequência do estresse abiótico imposto previamente por FAQ e iv) o tratamento de FAQ deve trabalhar em uma estreita faixa de perturbação celular, onde o estresse abiótico possa induzir uma resposta biológica coordenada de defesa e depois recuperar a homeostase, sem produzir colapso e morte da célula. Adicionalmente, de um modo mais específico aos conceitos de SAR e resistência basal da célula vegetal, é possível admitir que o tratamento por FAQ possa perturbar a célula da planta de uma forma que esta consiga produzir um dos dois fenômenos (ou os dois): i) um pré-condicionamento (*priming*) tal que a célula torne-se “alerta” e consiga ser muito mais rápida para identificar componentes (moleculares, químicos) associados ao parasitismo e produzir defesas contra a invasão. (CONRATH, 2011); ii) um reconhecimento de sinais associados ao estresse abiótico, à percepção do ambiente de estresse térmico, capaz de produzir diretamente IR e respostas de defesa vegetais, como por ex. a SAR.

Na literatura, é amplamente evidenciado que, para a planta hospedeira, um pré-requisito à ativação de defesas é a percepção *molecular* do patógeno por receptores celulares. Isso pode acontecer por meio do reconhecimento de moléculas associadas a um padrão específico de microrganismo (*microbe-associated molecular pattern*, MAMP) ou de um patógeno (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) altamente conservados, geralmente de natureza peptídica, que podem reforçar um padrão de produtos de parasitismo (*damage-associated molecular pattern*, DAMP) e produzir paletas muito diferentes e particulares de resposta de defesa na célula da planta, que varia desde a imunidade até a indução de resistência basal (NIKS; MARCEL, 2009; CAVALCANTI et al., 2014). Importante lembrar que os padrões MAMP/DAMP podem englobar inúmeros tipos de glicopeptídeos, glicolipídeos e/

ou oligossacarídeos provenientes de estruturas (por ex., parede celular) celulares do patógeno ou do hospedeiro envolvidos em um processo de parasitismo, desde que sejam moléculas ligantes de receptor vegetal (BOLLER; FELIX, 2009).

Possivelmente, a única forma de um estresse resultante de FAQ cooperar com a IR vegetal seria através de injúria(s), ou por algum desequilíbrio hormonal (envolvendo ácidos salicílico, jasmônico ou abscísico) nas células foliares, como consequência da injúria promovida pelo FAQ. Assim, o *priming* teria um papel fisiológico que permitiria a plantas pré-condicionadas responderem a um nível muito baixo de um segundo estresse, de uma maneira muito mais rápida e eficaz, fosse este estresse causado por invasão de patógenos e insetos (bióticos), fosse por estresses abióticos (CONRATH, 2011). Num contexto de doença, um estímulo indutor de *priming* promoveria o acúmulo de proteínas amplificadoras de sinal (ex. cascatas de quinases ativadas por mitógenos, MAPKs) que permaneceriam inativas, apenas aguardando uma segunda perturbação, no caso do parasitismo, a exposição da célula do hospedeiro a MAMPs e DAMPs, efetores e elicitores do patógeno para a ativação das proteínas de amplificação de sinal acumuladas a partir do primeiro estresse, sendo, aí, capazes de produzir respostas de defesa local e sistêmica muito mais robustas e coordenadas do que células que não foram pré-condicionadas (CONRATH, 2011; PASTORA et al., 2013).

Nesse ponto, vale lembrar que a célula hospedeira produzindo defesas via SAR, que é a categoria de IR vegetal mais associada à defesa contra biotróficos, pode responder local e sistemicamente com aumento de atividade enzimática de PR-proteínas como peroxidases de monolignóis (GPX, EC 1.11.1.7), endo- e exo-quitinases (CHI, EC 3.2.1.14) e β -1,3-glucanases (GLU, EC 3.2.1.39), dentre outras. Pode também produzir fitoalexinas antimicrobianas e reforçar a sua parede celular, com aumento de deposição de lignina na área da lamela média (CAVALCANTI et al., 2007). Enquanto CHI e GLU são enzimas que atuam na degradação de carboidratos poliméricos componentes da parede celular de patógenos fúngicos, as polifenoloxidasas de plantas (PPO, EC 1.10.3.2) com atividade difenolásica, podem auxiliar as GPXs na deposição de fenólicos poliméricos sobre a parede celular do hospedeiro (MAYER; STAPLES, 2002).

Atualmente já é bem elucidada a importante participação de hormônios na regulação de defesa vegetal, principalmente os ácidos salicílico (AS), jasmônico (AJ) e o etileno. Esses sinalizadores estão principalmente associados à geração de sinalização de defesa a longas distâncias (com relação ao sítio de infecção), sistemicamente. Ao mesmo tempo, o hormônio vegetal ácido abscísico (ABA) pode participar de funções importantes na regulação de defesa celular, principalmente na comutação de respostas entre estresses bióticos e abióticos, e o tempo de resposta ao estímulo (ATKINSON; URWIN, 2012; DOMINGUES, 2013; PASTORA et al., 2013), no intuito de economia de energia. Portanto, informações sobre ABA também são importantes para o entendimento do possível papel do FAQ como agente de *priming* celular e potencializador de IR. Num contexto de IR, podemos presumir, neste ponto, que o FAQ possa ser o agente que produz uma injúria transiente que seja capaz de pré-condicionar a célula vegetal a estar mais “alerta” para eventual infecção por patógeno. Nesse caso, seria uma situação de composição de estresses, sendo um primário, o FAQ (abiótico), e outro secundário (biótico), o parasitismo (doença). No entanto, estudos nesse sentido mostram que redes de sinalização celular de respostas a estresses ambientais podem, com frequência, agir antagonicamente, enfraquecendo a defesa, e que isso é particularmente verdadeiro em casos envolvendo combinações de estresses bióticos e abióticos, com exceções (ASSELBERGH, et al., 2008; VERHAGE et al., 2010).

De todo o modo, vários tipos de estresse podem induzir, também, a síntese de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSPs), além do calor. Em condições de estresse, HSPs se ligam a outras proteínas, estabilizando suas estruturas durante condições de estresse severo e funcionando como chaperonas moleculares que previnem agregação e desnaturação de outras proteínas. Combinações específicas de HSPs são induzidas em resposta a diferentes estresses, e além de proteger proteínas, HSPs atuam como reguladores da proteção oxidativa e de especificidade à natureza do estresse (BARTELS; SUNKAR, 2005). Em circunstâncias gerais as HSPs não têm um envolvimento direto com respostas de defesa de plantas a patógenos, entretanto, chaperonas Hsp90 e Hsp70 são componentes essenciais em sistemas de defesa por reforçar a sinalização, pela sua interação

com proteínas R e MAP quinases (SIPK) de reconhecimento de patógeno e transdução de sinais de defesa em *Nicotiana* sp., trigo e milho (KANZAKI et al., 2003; LIU et al., 2004).

De acordo com as premissas (i-iii) de Widiastuti et al. (2010), um tratamento por calor somente pode reduzir doença por meio de i) inibição direta ao desenvolvimento de estruturas do patógeno, ii) remoção de inóculo da superfície de partes vegetativas e/ou reprodutivas da planta, iii) por meio de mecanismos constitutivos de defesa ou IR, e, adicionalmente, iv) por uma combinação dos fenômenos citados.

À luz do exposto, o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar diversas combinações de tratamentos TPC baseados em FAQ, sobre estruturas da planta e patógeno, em termos de: i) redução do míldio (modelo de estudo) em experimentos de casa de vegetação e campo; ii) investigar atividade de injúria e inibição de estruturas do patógeno (esporangióforos, esporângios e zoósporos de *Plasmopara viticola*) e iii) investigar respostas de IR, por monitoramento de atividades enzimáticas de PR-proteínas, atividade de PPOs, teores de fenóis totais e lignina.

Metodologia

Ensaio de progresso de doença em casa de vegetação

Plantas da cv. Cabernet Sauvignon (CS), cultivadas em sacos plásticos com substrato 2:0,5:1 (areia/argila/húmus), em ambiente de casa de vegetação (situada à Embrapa Uva e Vinho, lat.: 29,1°S, lon.: 51,5°O), com rebrotas de 60 dias, foram submetidas a um ensaio envolvendo aplicação de fluxo de ar quente (FAQ) e inoculação com *Plasmopara viticola*, o agente causador do míldio da videira. Cada tratamento de FAQ consistiu na aplicação de um fluxo (500 L min⁻¹) de ar quente por 0,5 s, em aplicação única, simulando o fluxo que é expelido por um equipamento *Thermal Pest Control* (TPC). Várias combinações de tratamentos envolvendo aplicações FAQ foram ensaiadas: i) ar quente a 60°C, 5x pré-inoculação; ii) ar quente a 120°C, pós-inoculação a cada dois dias; iii) ar quente a 120°C, 5x pré-inoculação e iv) ar quente a 120°C, 10x pré-inoculação. Nesse ponto, é conveniente informar que os valores de 60°C e 120°C utilizados se referem

as temperaturas do FAQ ao atingirem às folhas e que FAQ de 60°C por 0,5 s produz aumento súbito de 3°C ($\Delta T = 3^\circ\text{C}$) na superfície da folha, enquanto FAQs de 120°C por 0,5 s resulta em $\Delta T = 8^\circ\text{C}$ (MONTEIRO et al., 2014). O grupo controle (Ctrl-) permaneceu com as folhas expostas à temperatura ambiente (aprox. 25°C). O ensaio foi organizado em blocos inteiramente casualizados (DBC), com três repetições por tratamento, a partir de uma unidade experimental de cinco plantas por repetição. Cada bloco (comportando uma repetição de cada tratamento) foi estruturado sobre uma bancada apoiando uma gaiola plástica transparente (2,5 m x 1,0 m x 1,8 m), com o uso de um umidificador ultra-som interno para garantia da umidade relativa sempre acima de 80% e 12 h de fotoperíodo.

As avaliações foram realizadas após inoculação com uma suspensão de esporângios (5×10^4 esp. mL⁻¹) de *P. viticola*, aos 8, 14, 19, 23 e 27 dias após a inoculação (DAI). Percentuais de proteção (valores % nas caixas) foram obtidos a partir dos valores de AACPD de cada tratamento (CAMPBELL; MADDEN, 1990). Os níveis de severidade de sintomas/sinais foliares (área da mancha de óleo; área tomada pela pulverulência do pseudofungo) foram anotados por avaliador único, devidamente treinado na escala diagramática de Azevedo (1998) dividida em seis níveis de doença, cobrindo 0-100% de severidade. As leituras foram divididas em seis classes e submetidas à transformação angular $\omega = \arcsen(ID^{1/2})$, sendo aí realizados testes de normalidade, ANOVA e inferências a 5% de probabilidade sobre os dados avaliados, e considerando ID (%) como a intensidade de doença (CZERMAINSKY, 1999).

Ensaio laboratoriais para caracterização de atividade biológica

Um ensaio para verificação de toxidez direta sobre estruturas de dispersão do *P. viticola* foi realizado em folhas da cv. Cabernet Sauvignon infectadas com míldio, 20 dias após inoculação. Foram selecionadas dez folhas com um mesmo padrão de severidade em sintomas e presença de estruturas de frutificação do pseudofungo. Sobre a superfície abaxial, diretamente nas estruturas do patógeno, foram aplicados tratamentos de FAQ a 120°C, cinco vezes em um grupo de folhas e dez vezes em outro grupo, com o grupo controle sem tratamento algum. Com o gasto de volume fixo de 25 mL de água destilada e um pincel, esporângios

foram delicadamente removidos da superfície abaxial das folhas e coletados. Para contagens e estudo da morfologia dos esporângios, 100 μL do inóculo foram depositados em cada cavidade de uma lâmina escavada. As cavidades foram divididas em quatro quadrantes e, para o inóculo recolhido de cada tratamento, foram analisados aleatoriamente 100 esporângios por quadrante e o delineamento obedecido foi o inteiramente casualizado (DIC), com a unidade experimental sendo um único esporângio. As lâminas foram incubadas em ambiente saturado e mantidas a 25°C. Os esporângios foram visualmente inspecionados, a 3 e 15 horas após o preparo (HAP) da suspensão e disposição nas lâminas, em termos de: esporângios não ativos (zoósporos não lançados) e esporângios ativos (vazios, com zoósporos já lançados no meio). A atividade de zoósporos também foi visualmente confirmada, mas de quantificação impossível em ampliação de 400x em microscópio ótico.

Para o levantamento de evidências de respostas metabólicas associadas à indução de resistência em células foliares de videira submetidas ao tratamento FAQ, foram realizados ensaios para coleta de amostras em plantas das cvs. Cabernet Sauvignon (CS) e Bordô, a partir de rebrotas de 45 dias. As plantas foram cultivadas seguindo as especificações acima descritas para condução de experimentos em casa de vegetação. Para cada cultivar, tratamentos de FAQ foram aplicados durante 0,5 s, em dois níveis, 60°C e 120°C em todas as folhas. O grupo controle (Ctrl-) permaneceu com as folhas expostas à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). De cada tratamento, foram realizadas coletas de folhas para extração de proteínas solúveis totais, às 12, 24, 48 e 72 horas após tratamento (HAT), em três repetições por tratamento e tempo de coleta, com as parcelas, uma planta por repetição, dispostas em DIC. A cada coleta, folhas foram destacadas por uma lâmina, removendo-se o pecíolo. Imediatamente, folhas foram delicadamente lavadas em água destilada, secas em papel absorvente e congeladas com nitrogênio líquido antes do armazenamento em freezer – 80°C.

Para ambas as cultivares, a extração de proteínas solúveis totais das amostras foi realizada por maceração do tecido fresco em tampão fosfato de potássio (PBS, 100 mM pH 7,2 + NaCl 0,5 mM), em uma relação 1:5 m/v. Em seguida, o extrato filtrado foi centrifugado por 13 min a 4°C a 12.600 x g e o sobrenadante recolhido. A dosagem de proteínas

solúveis seguiu o método de Bradford (1976), em alíquotas e diluições adequadas para a curva padrão de BSA, previamente ensaiada. A determinação da atividade de peroxidases de monolignóis (GPX) seguiu a metodologia inicialmente proposta por Urbanek et al. (1991), com modificações. A mistura de reação conteve uma alíquota dos extratos de cada amostra, guaiacol 60 mM e H_2O_2 20 mM, com diluições (com o tampão de extração, sem adição de NaCl), tempo de reação e alíquotas para cada cultivar, ajustadas para maximizar a catálise enzimática na absorbância de 480 nm. Para determinação da atividade difenolase de polifenoloxidasas (PPO), usou-se procedimento análogo ao utilizado para GPX, por meio da adição de pirocatecol (50 mM) à mistura de reação, e leitura em 410 nm (GAUILLARD et al., 1993). As alíquotas das amostras para as atividades de GPX e PPO foram de 100 μL .

A atividade de quitinases (CHI) foi determinada pela adição de 150 μL do extrato protéico à solução com 130 μL do tampão de extração (sem NaCl) e 60 μL de CM-Chitin-RBV (2 mg mL^{-1}), substrato específico para quitinase fornecido por Loewe Biochemica GmbH, em microplacas de 96 poços (350 μL /poço). Após incubação a 35°C, por 80 min, as amostras foram acidificadas com 50 μL de HCl 0,5 N, resfriadas e centrifugadas (1.450 x g por 10 min). Alíquotas de 210 μL do sobrenadante de cada amostra foram transferidas para uma nova microplaca, para leitura a 492 nm em um leitor de ELISA (WIRTH; WOLF, 1990). Atividades de β -1,3-glucanases (GLU) foram medidas de forma análoga, usando-se, desta vez, outro colóide substrato: CM-Curdlan-RBB (4 mg mL^{-1}), ajustando-se alíquotas e diluições das amostras no tampão de extração sem NaCl. Para promover a ação hidrolítica da GLU foi adotado tempo de incubação de 35°C por 100 min, antes da leitura em leitor de ELISA regulado para leituras de 620 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para todas as enzimas, foi definida uma unidade de atividade enzimática (UA) como sendo a alteração de uma unidade de densidade ótica, por miligrama de proteína, por minuto.

Para quantificação de lignina, alíquotas de 0,2 mg de tecido foliar fresco foi homogeneizada e incubada com acetona PA 85% por 48 h, centrifugado 7500 x g por 15min. O precipitado foi seco e incubado com 5 mL de ácido tioglicólico em HCl 2N durante 4 h.

Após procedimento de lavagens e centrifugações, a absorvância a 280 nm foi medida e valores convertidos em curva padrão de alkali-2-hidroxipropil éter (MONTIES, 1989). Determinação colorimétrica de fenóis totais nas amostras de folhas tratadas por FAQ foi ensaiada a partir do método de Spanos e Wrostad (1990), com adaptações. Uma alíquota de 100 μ L do extrato de cada amostra foi diluída em 900 mL de água grau MilliQ + 5 mL 1:10 (v/v) do reagente de Folin-Ciocalteau em 4 mL de 75 g L⁻¹ de Na₂CO₃ e o conjunto foi agitado por 1 h a 23°C. As absorvâncias das misturas, por amostra, foram medidas a 765 nm, e as concentrações foram aferidas por uma curva padrão de tirosina, com os pontos distribuídos linearmente até a leitura espectrofotométrica de novecentos mili-absorvância (mA).

Ensaio de progresso de doença em condições de campo

Ensaio em condições de campo foram conduzidos em vinhedos da Vinícola Geisse (Pinto Bandeira – Rio Grande do Sul) entre os meses de agosto de 2013 a fevereiro de 2014, com plantas das cvs. Chardonnay e Pinot-Noir, com aproximadamente quatro anos de idade. Para a aplicação dos tratamentos e avaliações de doença, foram utilizadas fileiras com espaçamento de 2,5 x 1 m. Na área de ‘Pinot Noir’ as parcelas consistiram em cinco linhas de espaldeira, com cerca de 70 metros, em média, sendo útil apenas a linha central e as demais usadas como bordadura. Na área de ‘Chardonnay’, por ser mais estreita, as parcelas eram formadas de três linhas, sendo útil a linha central e as demais usadas como bordadura.

Para cada cultivar estudada, o desenho experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC), com parcela experimental de uma (1) planta, com dois tratamentos e dez repetições. O primeiro tratamento (QUI) consistiu na aplicação do protocolo químico tradicionalmente usado na propriedade, sem aplicação de TPC. O segundo tratamento (TPC + QUI) consistiu na aplicação de protocolo químico complementado pela aplicação de TPC, em um total de 11 aplicações de TPC entre os meses de outubro a dezembro de 2013, após o início da floração.

Nos meses de outubro e novembro de 2013, e janeiro e fevereiro de 2014, foram realizadas avaliações da incidência e severidade de míldio nas folhas e, depois, nos cachos das plantas, a partir

de inoculação natural no vinhedo. As avaliações da doença foram feitas em todas as folhas de ramos sorteados nas plantas, e, posteriormente, em três cachos por ramo produtivo, em cada repetição. Da mesma forma que feito nos ensaios em casa de vegetação, os níveis de área tomada por sintomas/sinais foliares foram anotados por avaliador único, devidamente treinado na escala diagramática de Azevedo (1998), dividida em seis níveis de doença e cobrindo 0-100% de severidade. O tratamento de dados de avaliação seguiu conforme foi realizado para as avaliações em casa de vegetação, acima descrito. Para avaliação de doença nos cachos foi utilizada uma escala gráfica desenvolvida pelo Dr. Marcus A. K. Almança para podridão cinzenta (*Botrytis cinerea*), ainda não publicada. A escala gráfica adaptada para cacho também foi dividida em seis níveis de doença, até cobrir 100% de doença no cacho. Isso permitiu o uso da mesma metodologia de quantificação de severidade e análise dos dados feita nas avaliações das folhas e descrita anteriormente.

As aplicações do TPC (Lazo TPC do Brasil LTDA) foram realizadas com o equipamento configurado a 140°C e velocidade de deslocamento de 2,4 km h⁻¹. A distância média entre a saída do difusor de ar do TPC e o dossel das plantas era de aproximadamente 20 cm, podendo variar de 10 a 30 cm, dependendo de irregularidades no terreno. Nessas condições, a temperatura média do fluxo de ar quente ao atingir o dossel é de 90 a 120°C, dependendo da altura considerada na espaldeira, provocando choques térmicos de 3 a 8°C, sendo mais baixa no terço inferior e mais alta no terço superior da espaldeira (MONTEIRO et al., 2014).

Análise estatística

Neste trabalho foram realizadas análises sobre dados numéricos, estatística descritiva, testes de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e Levene, análise de variância, testes F e Tukey todos com um nível de significância de 5%. Os cálculos foram realizados com o uso de ferramentas estatísticas, como o OriginPro 8 (OriginLab Corp.) e SISVAR (Ferreira, 2000), da Universidade Federal de Lavras.

Resultados e Discussão

Ensaio com aplicação de FAQ sobre o limbo de folhas de videira infectadas, simulando o tratamento por TPC em campo, foram conduzidos para

investigar os efeitos do FAQ sobre as estruturas de *Plasmopara viticola*, o agente causador do míldio. O estado visual de esporangióforos emergidos dos estômatos, rompimento de esporângios e atividade de zoósporos no meio de preparo foram observados em estereoscópio e microscópio ótico (MO), com aumentos entre 50-400x. Por inspeção visual, foi verificado que o FAQ produziu uma eliminação de esporangióforos maduros e esporângios da superfície abaxial do limbo foliar, o que se refletiu na redução da concentração da suspensão de esporângios obtida do mesmo tecido, após imposição dos tratamentos de FAQ. Para os preparos microscópicos, as concentrações para os as folhas não tratadas por FAQ (Ctrl-), tratadas com 120°C (5x) e 120°C (10x) foram, respectivamente, $6,7 \times 10^4$, $3,1 \times 10^4$ e $1,1 \times 10^4$ esporângios mL⁻¹, ressuspensos em volume padronizado. É possível considerar que não foi adotado um método mais preciso para escolhas das folhas do que a avaliação visual e que isso poderia causar perda de acuidade neste ensaio, porém o efeito de remoção das estruturas mais amadurecidas ("efeito limpeza") foi facilmente verificado (Figuras 1A e 1B).

Com as suspensões de esporângios provenientes das folhas tratadas com FAQ a 120°C 5x e 10x, e não tratadas, foi realizada uma avaliação da atividade de esporângios no lançamento de zoósporos ao longo do tempo. Foi verificado, após duas contagens de 400 esporângios por tratamento, a três (Figuras 1C, 1E e 1G) e 15 horas (Figuras 1D, 1F e 1H) após preparo (HAP) que o FAQ, a 120°C, aplicados 5x (Figuras 1E e 1F) e 10x (Figuras 1G e 1H), não inviabilizou o lançamento de zoósporos para o meio de preparo, muito menos inativou os zoósporos lançados. Os zoósporos provenientes das estruturas submetidas ao FAQ comportaram-se como os zoósporos lançados pelos esporângios coletados das folhas não tratadas (Figuras 1C e 1D), não sendo possível a quantificação de zoósporos com um aumento de 400x.

O FAQ produziu um aumento na atividade de lançamento de zoósporos pelo esporângio, que foi muito significativo a 15 HAP ($P < 0,01$), assemelhando-se a uma resposta dose dependente, em termos de número de aplicações de FAQ (Figura 2A). Esse aumento na atividade de esporângios no inóculo ressuspensado de folhas tratadas 5x e 10x a 120°C, por conseguinte se refletiu no número de esporângios não ativos contados, após 15 HAP (Figura 2B). Essas evidências reforçam uma ausência

de inibição nas funções biológicas de dispersão de *P. viticola*, e no reinício do ciclo de parasitismo do patógeno. Na verdade, muito pelo contrário: o FAQ produziu uma ativação na propriedade do esporângio em lançar zoósporos, a 15 HAP, sensível, inclusive, ao número de aplicações de FAQ experimentadas. Sem referências sobre a sensibilidade à temperatura de *P. viticola*, microrganismos taxonomicamente próximos do pseudofungo mostram resistência a aumentos de temperatura. Recentemente, foi encontrado um novo isolado de *Phytophthora hydrogena*. Essa espécie mostrou um crescimento vegetativo ótimo entre 30-35°C, mas mostrou tolerância é crescimento em faixa de temperatura entre 5-40°C (YANG et al., 2014). Um outro exemplo é o mofo azul do fumo, causado pelo oomiceto *Peronospora tabacina*. Ensaio térmico com este microrganismo demonstraram que a ativação dos esporângios de dois isolados diminuiu ao longo de 48 horas em temperaturas acima de 16°C. No entanto, cerca de 3% dos esporângios sobreviveram mesmo após exposição de 24 horas em temperaturas de 70°C (SUKANYA; SPRING, 2013).

Ou seja, deve existir uma tolerância térmica para os isolados de *P. viticola*. E mais, aparentemente há uma faixa ótima de temperatura para a liberação de seus zoósporos. Considerando que aplicações de FAQ na temperatura de 120°C produzem, no máximo, variações de temperatura de 8°C sobre a folha, é possível hipotetizar que o choque térmico imposto pelo FAQ do TPC fique ainda distante de atingir um efeito de inativação térmica dos propágulos do patógeno, ou mesmo danificar a estrutura do esporângio. Para se aumentar o choque térmico e um eventual efeito sobre o patógeno, uma possível solução seria aumentar a temperatura do FAQ ou o tempo de aplicação. No entanto, esse aumento está limitado à resistência da própria folha ao calor, de modo a não sofrer injúrias que prejudiquem a planta. E o tratamento de 120°C a 0,5 s já está muito próximo desse limite, pois folhas de Cabernet Sauvignon tratadas com FAQ por 0,5s começam a exibir danos por queimadura na faixa entre 120 e 130°C, exibindo até 10% de área do limbo foliar necrosada após uma aplicação de 0,5 s a 130°C (MONTEIRO et al., 2014).

Em ambiente controlado (casa de vegetação), ensaios foram realizados para submissão e coleta de tecido foliar das cvs. Cabernet Sauvignon (CS, V.

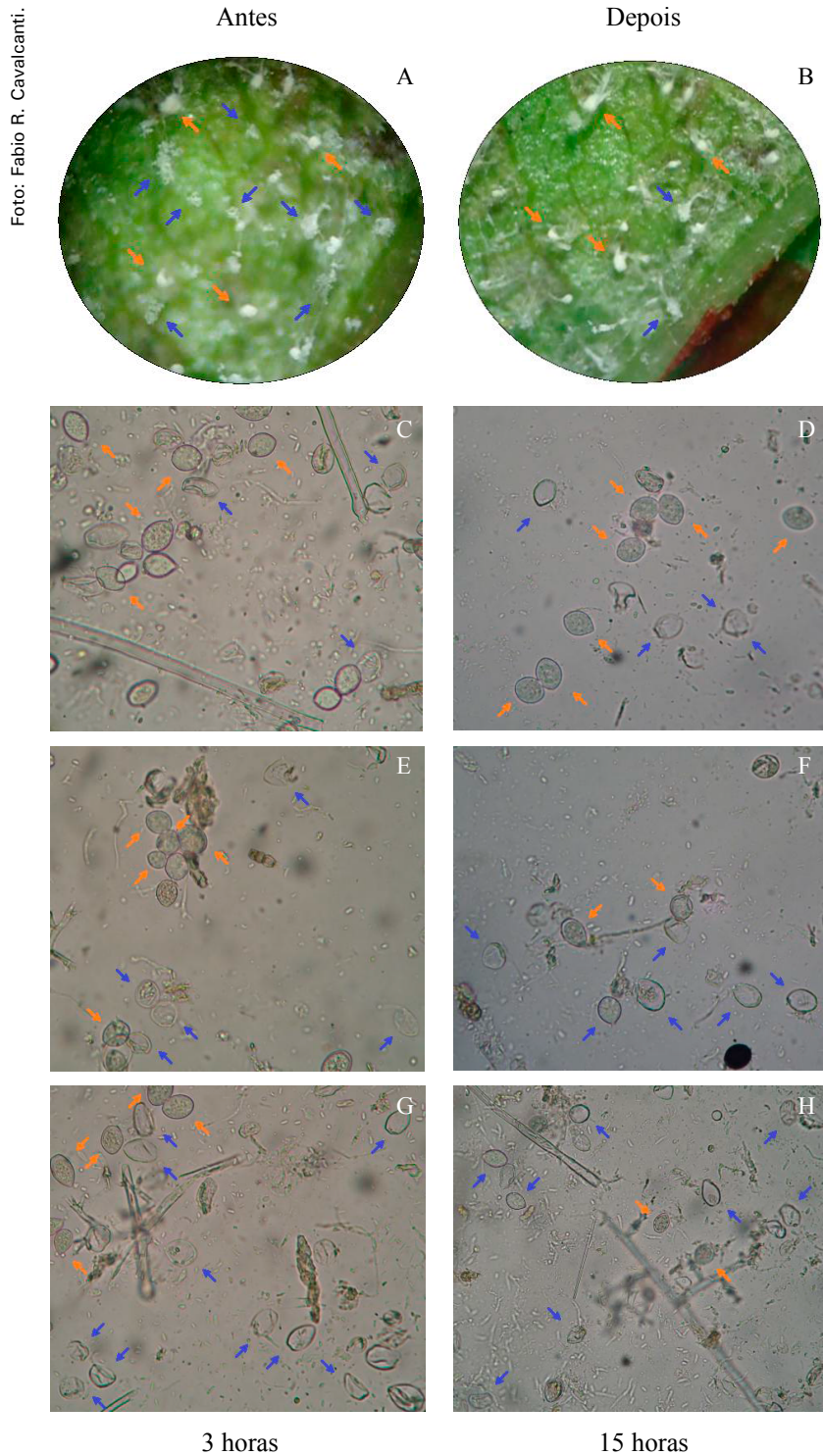


Fig. 1. Análise visual do impacto do fluxo de ar quente sobre as estruturas propagativas de *P. viticola*. A. Esporangióforos imaturos (seta vermelha) e maduros (seta azul) antes do tratamento. B. Na mesma região da folha infectada de Cabernet Sauvignon, após a aplicação 10x fluxo de ar quente a 120°C durante 0,5 s, é possível observar a remoção de alguns esporangióforos maduros e a permanência de estruturas imaturas, possivelmente após dispersão de inóculo secundário. Em C, esporângios retirados de folhas não tratadas (Ctrl-), 3 horas após preparo (HAP) da suspensão. D. Esporângios do Ctrl-, 15 HAP, com zoósporos encapsulados (não viáveis/ativos, seta vermelha) e após a sua liberação (viáveis/ativos, seta azul). No Ctrl- não foram verificadas alterações significativas ($P < 0,05$) nas proporções de esporângios viáveis e não viáveis, dentro do intervalo de tempo. E, F. Esporângios retirados de folhas submetidas a cinco aplicações de fluxo de ar quente a 120°C, respectivamente 3 e 15 HAP de uma suspensão com aprox. 4×10^4 esp. mL⁻¹. É possível verificar um significativo aumento ($P < 0,01$) na proporção de esporângios viáveis sobre esporângios totais, com relação ao controle negativo (Ctrl-). G, H. Esporângios retirados de folhas submetidas a dez aplicações de fluxo de ar quente a 120°C, respectivamente 3 e 15 HAP de uma suspensão com aprox. $1,5 \times 10^4$ esp. mL⁻¹. Após as dez aplicações, foi evidenciado um aumento significativo ($P < 0,01$) na proporção de esporângios viáveis sobre esporângios totais em comparação com o tratamento de 120°C aplicado cinco vezes. As estruturas foram ressuspensas em preparo aquoso, com magnificação de imagem entre 400-450x em MO.

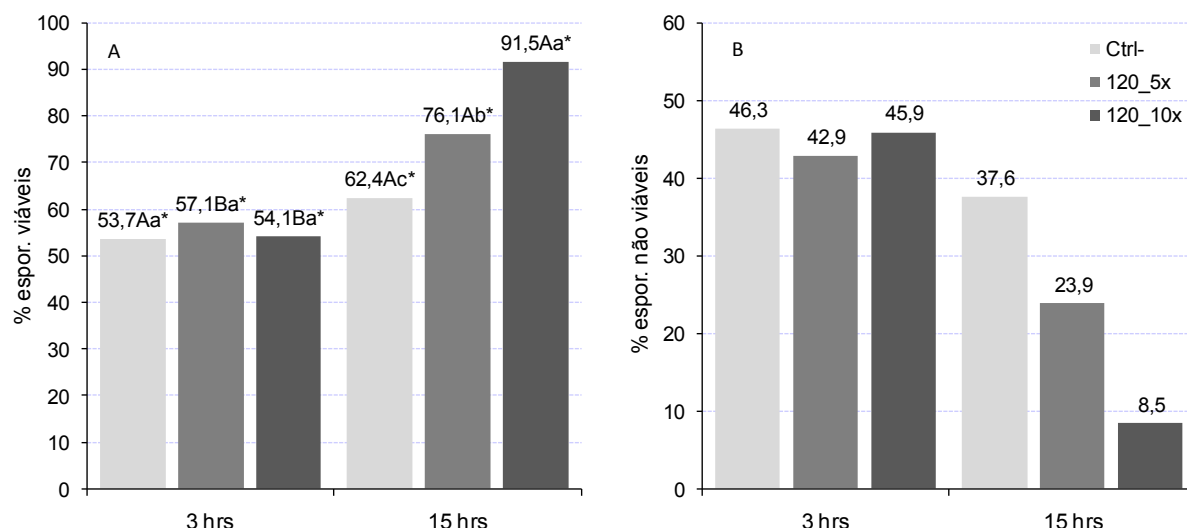


Fig. 2. Teste de viabilidade do esporângio no lançamento de zoósporos em meio aquoso. A. Percentual de esporângios que lançaram zoósporos para o meio (esporângios ativos ou viáveis) sobre o número total de esporângios contados por tratamento ($n = 400$), após 3 e 15 HAP. B. Percentual de esporângios que permaneceram inalterados, sem lançar zoósporos (esporângios não ativos/viáveis), sobre o total de esporângios contados por tratamento ($n = 400$), após 3 e 15 HAP. Os esporângios foram obtidos de folhas infectadas por *P. viticola* submetidas a nenhum tratamento (Ctrl-), cinco (120_5x) e dez (120_10x) aplicações de fluxo de ar quente a 120°C por 0,5 s. Asteriscos confirmam presença de zoósporos ativos em meio aquoso, após inspeção por MO. Valores dos mesmos tratamentos seguidos com as mesmas letras maiúsculas não diferem significativamente entre 3 e 15 HAP, de acordo com o teste de Tukey ($P > 0,01$). Valores em cada tempo e em diferentes tratamentos, seguidos com letras minúsculas, não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($P > 0,01$).

vinifera) e Bordô (*V. labrusca*), em rebrotas de 45-60 dias, a tratamentos de FAQ simulando as condições do TPC. A partir desse material, foram realizadas análises envolvendo atividade enzimática de PR-proteínas, teores de fenóis solúveis e lignina, na tentativa de evidenciar ativação da SAR por FAQ, em algumas variáveis relacionadas à IR.

Houve proeminente decréscimo na atividade de β -1,3-glucanases (GLU) das plantas CS tratadas a 60°C e 120°C a partir de 48 h, em relação às plantas controle (Figura 3A). Com relação à Bordô, não foram observadas diferenças entre os tratamentos, no intervalo 12-72 horas após a imposição dos tratamentos (HAT) (Figura 3D). Considerando as respostas de quitinases (CHI) da CS, os níveis atividade da enzima do tecido exposto a 120°C foram discretamente (não significativamente) maiores que os da temperatura controle após 24 HAT, os quais não diferiram significativamente das plantas de CS submetidas a 60°C (Figura 3B). De modo particular, na cv. Bordô, a atividade de CHI a 120°C e a 60°C foi cerca de 3x maior do que as plantas controle, a 12 HAT, mas, em seguida, retornaram aos níveis do controle (Figura 3E). De um modo geral, os tratamentos não causaram diferenças ao longo do tempo nas atividades de GLU e CHI, considerando as duas cultivares e o intervalo estudados.

Com relação às respostas de peroxidases (GPX) de CS, é possível observar que, curiosamente, ao longo do intervalo de 12-72 HAT, as atividades da enzima em tecido tratado por FAQ de 120°C foram menores do que nas plantas submetidas a 60°C, que mantiveram o nível de atividade das plantas controle (Figura 3C). De modo sensivelmente inverso, na cv. Bordô, os níveis de atividades GPX em plantas submetidas a 120°C aparecem maiores do que das plantas controle e tratadas a 60°C (exceto a 12 HAT), aparentemente em um padrão dependente da maior dose de temperatura (Figura 3F). Considerando as atividades de polifenoloxidasas (PPO) em CS, no intervalo estudado, plantas expostas a 60°C e 120°C mostraram aumento significativo em relação ao controle, principalmente após 24 HAT (Figura 4A). Em Bordô, aumentos nas atividades de PPO foram ainda mais evidentes, com respostas proporcionais aos níveis de temperatura do fluxo de calor aplicado sobre as folhas e sustentadas ao longo do intervalo 12-72 HAT (Figura 4C).

Aqui, é conveniente lembrar que, enquanto CHI e GLU são enzimas que degradam diretamente a parede da hifa do patógeno, GPX e PPO estão associadas à biossíntese de lignina e o reforço da parede celular vegetal (CAVALCANTI et al., 2007).

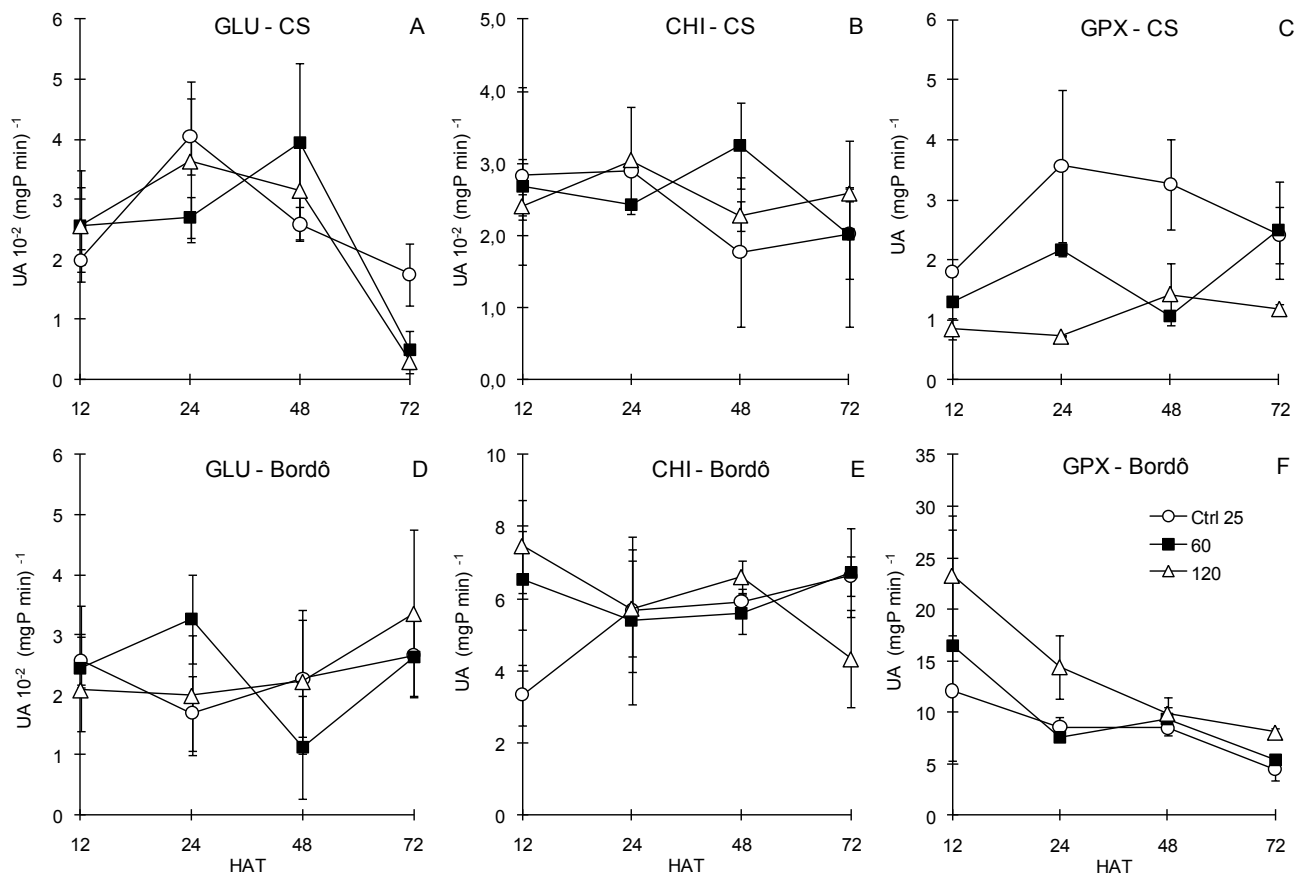


Fig. 3. Atividades de β -1,3-glucanases (GLU), quitinasas (CHI) e peroxidases (GPX) em folhas de videira cvs. C. sauvignon e Bordô, em rebrotas de 40 dias. Tratamentos de fluxo de ar quente foram aplicados 60°C (■) e 120°C (△) por 0,5 s, e plantas controle 25°C (Ctrl, ○) não tratadas. Respostas enzimáticas foram avaliadas 12, 24, 48 e 72 horas após o tratamento térmico. Barras de erros indicam desvio-padrão da média.

Em dois estudos envolvendo plantas de melão e morangueiro, foram observados aumentos em atividades de GPX, acúmulo de AS (em morangueiro) e aumentos nos níveis de expressão de genes de GPX, CHI e GLU, associados a 30-50% de proteção de plântulas expostas a 50°C durante 20s, com um efeito negativo, mas não significativo ($P < 0,05$) sobre *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides* (WIDIASTUTI et al., 2010; 2013). Ambos os estudos contaram com um controle positivo (2-benzisothiazol-3(2H)-one 1,1-dioxide, BIT) que induziu SAR, mas não promoveu proteção de plantas. Os autores concluíram que mecanismos complementares de IR podem estar atuando no atraso do progresso da doença. A despeito dessas evidências acima para choques térmicos de 20 s, trabalhos evidenciando SAR ativada por qualquer tipo choque térmico (e tempos de exposição) são escassos, e centralizados em culturas muito sensíveis a perturbações associadas à SAR, como curcubitáceas e *Arabidopsis*.

No texto introdutório do presente trabalho, foi reenquadrada a participação do FAQ como um agente de estresse de pré-condicionamento (*priming*) celular, e não um indutor de resistência *per se*. Assim, para dependência de um 2º estresse (infecção; estresse biótico), vêm sendo evidenciadas participações cada vez mais importantes de hormônios vegetais, como ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ), etileno e ácido abscísico (ABA), nos processos celulares de seleção de resposta de defesa a múltiplos estresses, pela expressão muito particular de um conjunto de genes. E tais respostas a múltiplos estresses podem ser mutuamente aditivas (aumento da defesa) ou antagônicas, em função de tempos de exposição, natureza física e severidade dos estresses envolvidos (ATKINSON; URWIN, 2012). Por exemplo, em arroz, a resistência a *Magnaporthe grisea* é mediado por um balanço muito delicado entre níveis de ABA e AS. O ABA antagoniza defesas baseadas em JA e etileno (necrotróficos), por meio da repressão irreversível

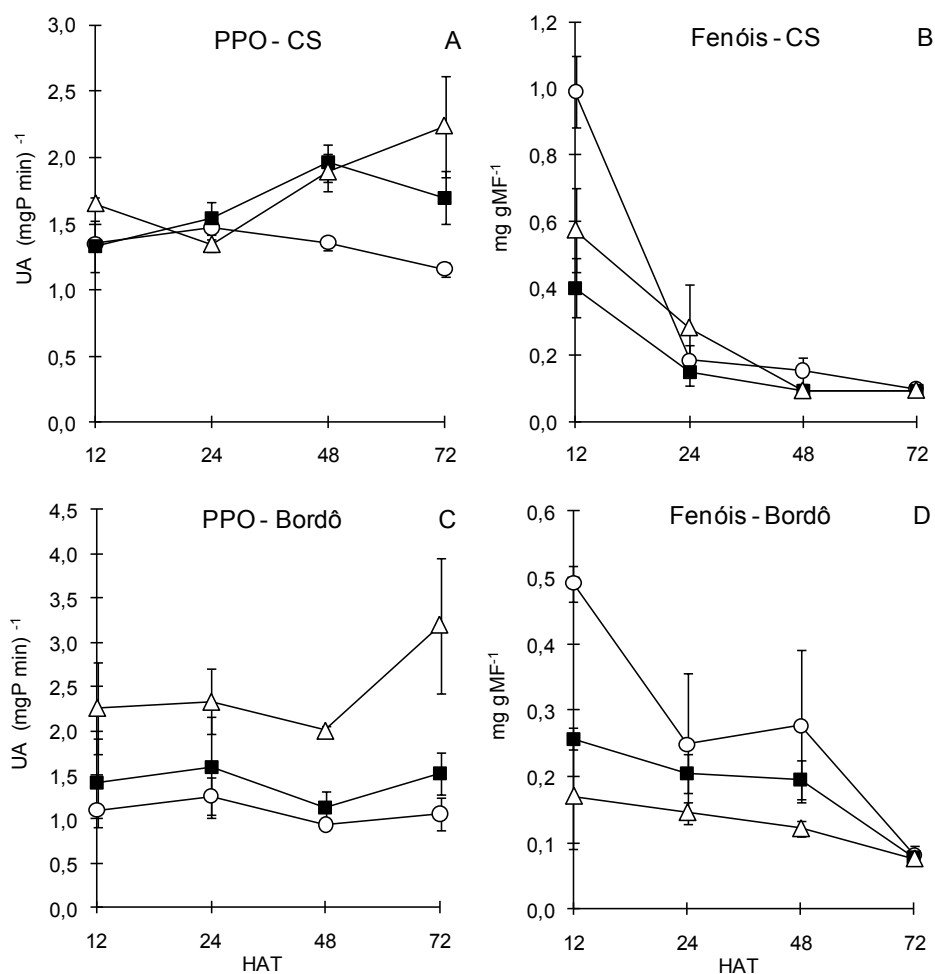


Fig. 4. Atividades de polifenoloxidases (PPO) e conteúdo de fenóis hidrossolúveis totais em folhas de videira cvs. C. Sauvignon e Bordô, em rebrotas de 40 dias. Tratamentos de fluxo de ar quente foram aplicados 60°C (-■-) e 120°C (-△-) por 0,5 s, e plantas controle 25°C (Ctrl,-○-) não tratadas. Respostas foram avaliadas 12, 24, 48 e 72 horas após o tratamento térmico. Barras de erros indicam desvio-padrão da média.

de genes associados a esta defesa, como o *PDF1.2*. E, no sentido “oposto”, tratamento com etileno pode ativar *ABI1* e *ABI2*, que são dois reguladores negativos da sinalização por ABA (ASSELBERGH et al., 2008).

Talvez para constatar um papel hormonal induzido por FAQ no *priming* de defesa, Domingues (2013) conduziu um experimento de campo em Petrolina-PE, envolvendo um parreiral em sistema latada da cv. Festival, para comparação de dois esquemas iguais de controle químico (QUI), diferindo em um deles apenas pela inserção das aplicações do tratamento TPC, (QUI + TPC). As amostras foliares foram coletadas diariamente e devidamente armazenadas para análise de hormônios. Nesse estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre concentração dos hormônios ABA, AJ e AS, considerando as amostras diárias, em folhas submetidas a tratamentos QUI e QUI + TPC durante

quase 40 dias. De um modo geral, foi observada sensível queda nos teores de ABA ao longo dos dias nos dois tratamentos, sendo que nas plantas expostas ao TPC, essa queda ocorreu de um modo pouco menos acentuado. Com relação aos teores de AJ e AS entre os dois tratamentos, os perfis de respostas foram os mesmos ao longo das aplicações (DOMINGUES, 2013).

A despeito dos relatos de ABA na inibição da sinalização de defesa, esse hormônio também pode ter um papel positivo na proteção de plantas, considerando patógenos que dependam sobretudo do estômato para penetração no tecido hospedeiro. Um modelo proposto por Atkinson; Urwin (2012) baseado em Ton et al. (2009) sugere que: i) ABA causa fechamento estomático, dificultando a penetração de patógenos. Nesse ponto, ABA antagoniza AS, AJ e etileno para poupar energia, já que a participação dos últimos na defesa ainda não é

necessária; ii) Em um 2º momento, são mobilizadas defesas de pós-invasão envolvendo enrijecimento de parede celular e calose, um processo influenciado por ABA; iii) ABA sai de cena e PAMPs induzem repostas típicas de defesa locais e a longas distâncias baseadas em AS (SAR) ou AJ e etileno.

De fato, um estudo mostrou que *Plasmopara viticola* depende do estômato para penetrar e esporular, sugerindo uma atuação do pseudofungo sobre as células guardas (ALLÈGRE et al., 2006). Foi verificado que, em folhas infectadas, a presença do patógeno sob as cavidades mantém os estômatos de folhas de videira abertos, mesmo no escuro ou sob restrição hídrica severa, aumentando muito a sensibilidade da planta à seca (mas não ao calor). Os autores verificaram um indício de recuperação do fechamento estomático por aplicação exógena de ABA, sendo possível a participação de uma substância produzida pelo oomiceto que inibe o fechamento estomático, podendo ter um papel semelhante à fusicocina ou coronatina, interferindo em algum ponto da sinalização de ABA, fluxos iônicos, geração de espécies ativas de oxigênio ou cascatas de quinase/fosfatase (DESIKAN et al., 2004; ALLÈGRE et al., 2006).

Mesmo assim, de uma forma ou de outra, Domingues (2003) não evidenciou alterações de ABA (nem de AS e AJ) em folhas de videira, sob aplicação suplementar de FAQ do TPC. Tampouco no presente trabalho, foram observadas respostas robustas de SAR.

Em ambiente controlado (casa de vegetação), tanto em CS quanto em Bordô foi observada queda na concentração de fenóis hidrossolúveis no período 12-72 HAT, tanto nas plantas tratadas (ainda mais proeminente em CS), quanto no grupo controle (Figura 4B, 4D). Em Bordô, o decréscimo nos teores de fenóis totais pareceu seguir um padrão inverso da dose de calor do FAQ, com a maior redução associada ao tratamento com 120°C (Figura 4D). Com relação aos teores de derivados do ácido tioglicólico (lignina), houve uma resposta não significativa ($P > 0,05$) de aumento nas plantas de CS submetidas aos dois níveis de fluxo térmico, com relação ao controle, 72 HAT (Figura 5). Plantas cv. Bordô, expostas ao tratamento de 120°C, mostraram um indício de acúmulo de lignina, com relação ao grupo controle, e às plantas de 60°C. No entanto, em ambas cultivares, diferenças significativas ($P > 0,05$) não foram encontradas, em 72 HAT (Figura 5).

Também em ambiente de casa de vegetação, foram conduzidos ensaios visando ao monitoramento do progresso do míldio (Figura 6) durante aproximadamente um mês de acompanhamento. Três tratamentos de FAQ foram aplicados sobre as folhas de rebrotas da cv. CS, de 45-60 dias, antes da inoculação, e um tratamento, após. O objetivo do tratamento FAQ a 120°C, aplicado a cada 2 dias após a inoculação com *P. viticola*, foi o de atribuir um fator 'curativo' ao FAQ simulando o tratamento TPC. Os tratamentos de FAQ aplicados antes da inoculação investigaram a capacidade 'protetora', essencialmente buscando por ativar respostas de defesa, ou IR, para

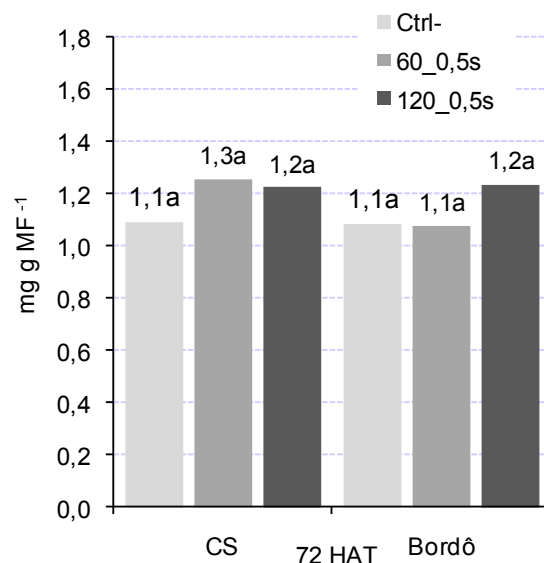


Fig. 5. Teores de lignina em folhas de videira, CS e Bordô, 72 HAT, submetidas a níveis de temperatura do fluxo de calor 25 (Ctrl-), 60 e 120°C por 0,5 s. Não há diferenças significativas entre as médias, dentro de cada cultivar avaliada, de acordo com o teste de Tukey ($P > 0,05$). A lignina é um polímero polifenólico que participa do reforço da parede celular e pode dificultar a entrada de patógenos.

atrasar o progresso da doença. Esses tratamentos 'protetores' foram FAQ a 60°C, 5x; 120°C, 5x e 120°C, 10x, todos em pré-inoculação. O tratamento 'curativo' (também visando mirar o calor no patógeno) foi representado por plantas submetidas ao FAQ de 120°C, pós-inoculação, aplicado a cada dois dias, sendo que plantas controle (Ctrl-) foram compostas por parcelas não tratadas por FAQ e inoculadas. Desse ensaio, foram observadas proteções de planta marcadamente reduzidas em folhas, variando entre 14,1 a 25,2%, valores que, mesmo sem um estudo adequado de perdas, permitiriam níveis alarmantes de risco econômico associado à incidência de míldio, em condições de campo (Figura 6). Aliás, resultados

comentados logo abaixo, em dois vinhedos comerciais, refletem os discretos níveis de controle da doença obtidos por tratamentos com FAQ, principalmente na fase vegetativa das rebrotas (Figura 8A, 8B), seguindo o que foi observado em condições controladas.

Em condições de casa de vegetação, nenhum tratamento baseado no FAQ produziu diferenças significativas em avaliações realizadas a cada dia, entre o controle negativo e o respectivo tratamento FAQ ($P > 0,05$, de acordo com o teste t de Student), a 8, 14, 19, 23 e 27 dias após inoculação (DAI) (Figura 6). Os baixos percentuais de proteção obtidos em casa de vegetação foram, por

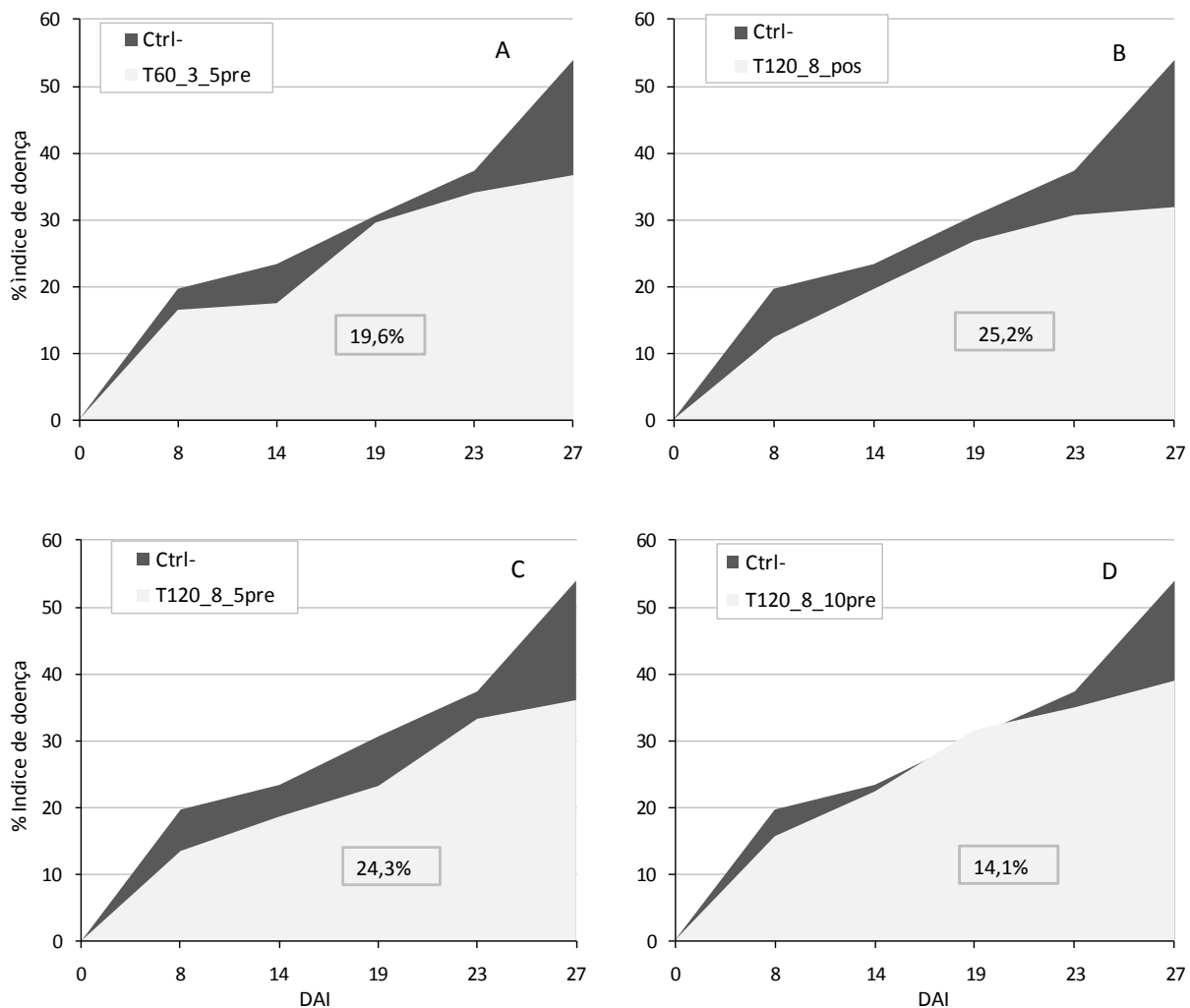


Fig. 6. Proteção de planta usando-se fluxo de ar quente (FAQ) no controle do míldio, por 0,5 s: A. Ar quente a 60°C ($\Delta T = 3^\circ C$), 5x pré-inoculação, B. Ar quente a 120°C ($\Delta T = 8^\circ C$), pós-inoculação a cada dois dias, C. Ar quente a 120°C ($\Delta T = 8^\circ C$), 5x pré-inoculação, D. Ar quente a 120°C ($\Delta T = 8^\circ C$), 10x pré-inoculação. Avaliações foram realizadas em videira (rebrotas de 45-60 dias) cv. Cabernet Sauvignon inoculadas com uma suspensão de esporângios (5×10^4 esp. mL⁻¹) de *P. viticola*, aos 8, 14, 19, 23 e 27 dias após a inoculação (DAÍ). Percentuais de proteção (valores % nas caixas) foram obtidos a partir dos valores de AACPD de cada tratamento e não mostraram diferenças com relação ao controle (Ctrl-, 0,0%), pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). Dentro dos dias de avaliação, não foram observadas diferenças significativas, de acordo com o teste t (Student) a um nível de significância de 5%.

consequente, um reflexo de áreas abaixo da curva de progresso do míldio (AACPD) que mostram um desenvolvimento de doença similar em plantas não tratadas (Ctrl-) e plantas tratadas por FAQ, as quais não diferem significativamente ($P > 0,05$) entre si e o controle não tratado (Ctrl-) (Figura 7).

No campo, durante a safra 2013-2014, foram avaliadas rebrotas de plantas de dois vinhedos 'Chardonnay' e 'Pinot-Noir' com relação à incidência e severidade de míldio em partes vegetativas e reprodutivas. Nos vinhedos, parcelas de plantas foram selecionadas para receber um esquema de pulverizações para o controle químico do míldio (QUI) ao tempo em que outras plantas receberam os mesmos tratamentos químicos, porém com menor frequência de aplicações, e com um calendário suplementar de aplicações de FAQ proveniente de equipamentos TPC (TPC + QUI) (Figura 8). Neste experimento, foi verificado que as aplicações suplementares de TPC (TPC + QUI) puderam manter a severidade do míldio no mesmo patamar de doença apresentado por plantas tratadas com o esquema químico usual (QUI) nas partes vegetativas (folhas) de 'Chardonnay' (Figura 8A). A mesma resposta não foi observada no vinhedo 'Pinot-Noir', onde se verificou um aumento nos índices de doenças nas folhas das plantas protegidas como esquema

químico mais aplicações suplementares de FAQ (TPC + QUI), com relação ao esquema de proteção química usual (QUI), embora sem diferenças significativas ($P > 0,05$) em termos de AACPD sobre as avaliações realizadas (Figura 8B). Vale lembrar que 'Chardonnay' e Pinot Noir' possuem fenótipos equivalentes de sensibilidade ao míldio.

Com relação à sanidade dos cachos, foi verificada, em plantas submetidas a aplicações suplementares de FAQ (TPC + QUI), uma redução na severidade de lesões derivadas do ataque de *P. viticola*, principalmente durante as fases fenológicas de desenvolvimento de inflorescência (míldio larvado, chumbinho e grão preto), em comparação com as plantas submetidas ao tratamento químico usual (QUI). Isso, tanto para as cvs. Pinot-Noir e Chardonnay, sendo que nesta última, houve redução significativa ($P < 0,05$) na severidade de míldio em cachos (Figura 8C e 8D). Talvez, essas sejam as únicas evidências, em todo o estudo, que indiquem uma participação mais robusta do tratamento FAQ (do TPC) em um esquema de controle do míldio em videira, no campo. Contudo, somente uma pesquisa mais específica a partir daí poderia evidenciar qual seria o mecanismo biológico atuando na redução da severidade do míldio justamente no cacho, como o reflexo do tratamento FAQ.

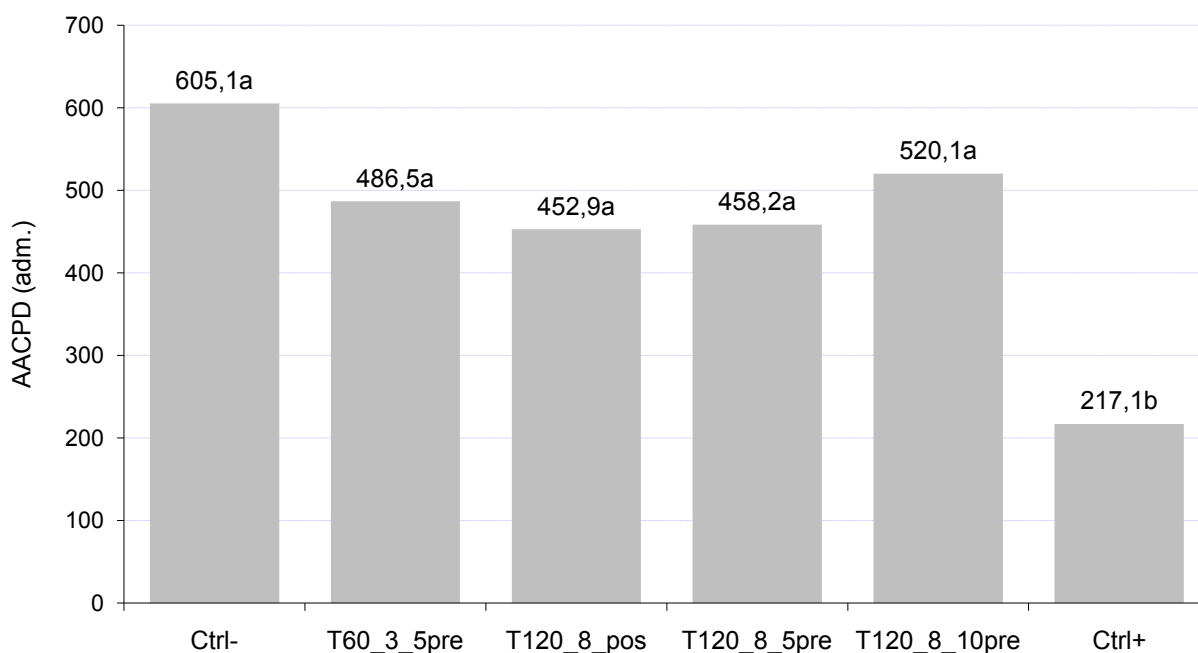


Fig. 7. Áreas abaixo da curva de progresso do míldio em plantas de videira, cv. Cabernet Sauvignon, após 20 DAI e 6 avaliações. As AACPD foram obtidas de acordo com a equação de Campbell; Madden (1990), sobre um Índice de doença calculado a partir da metodologia de Czermainsky (1999). As plantas testemunhas (Ctrl-) foram deixadas sem tratamento e inoculadas com uma suspensão 5×10^4 esp. mL⁻¹. O controle positivo (Ctrl+) foi formado por parcelas tratadas com Ridomil Gold MZ (3 mL L⁻¹), em aplicação única, dois dias antes da inoculação. Colunas com as mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

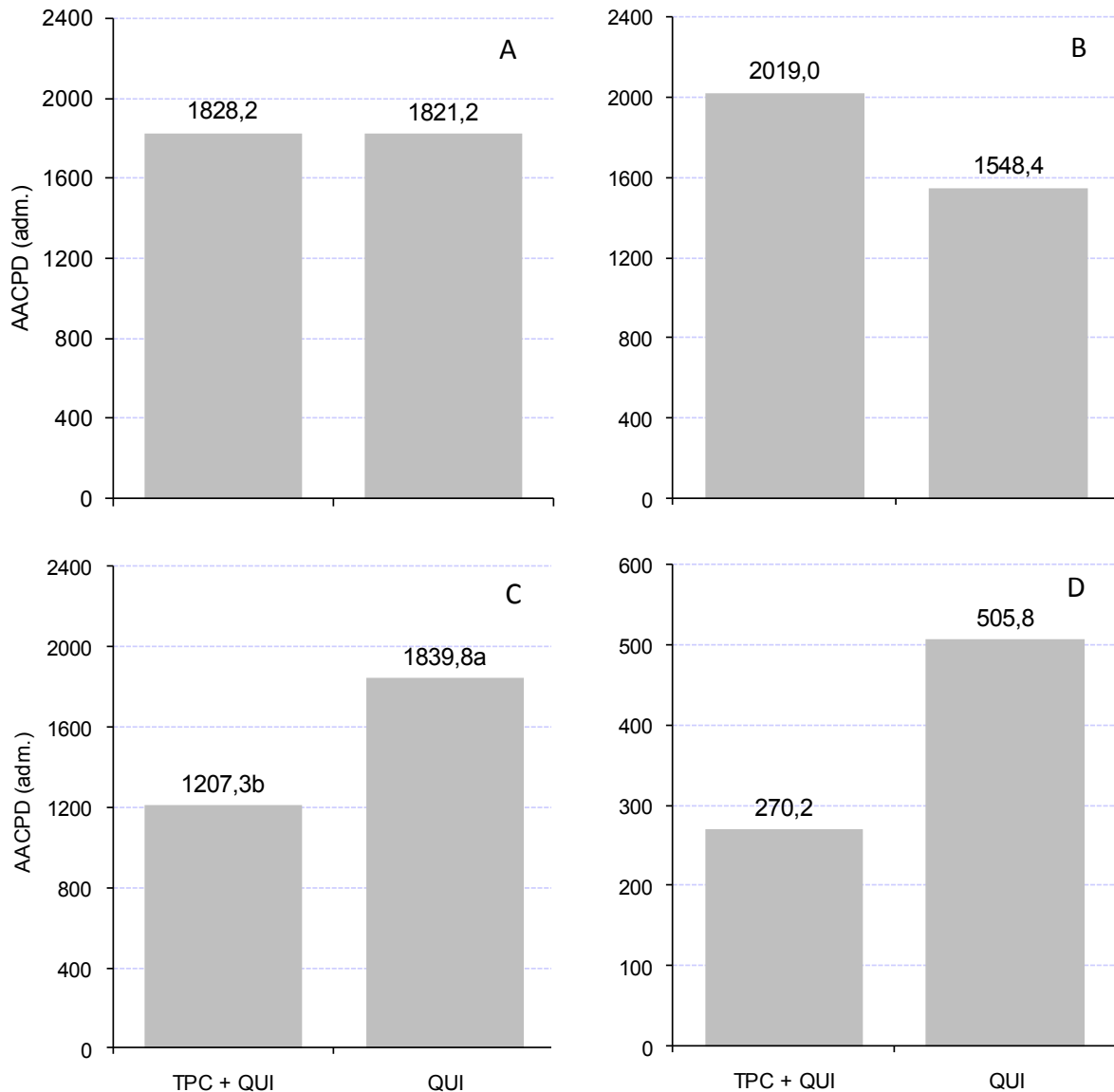


Fig 8. Áreas abaixo da curva de progresso da doença (AACPD para o míldio) em folhas (A e B) e cachos (C e D) de videira, cvs. Chardonnay (A, C) e Pinot Noir (B, D), após quatro avaliações durante a safra 2013-2014 em vinhedo situado em Pinto Bandeira-RS. Plantas de ambas cultivares foram submetidas ao mesmo calendário de proteção química contra o míldio, com (TPC + QUI) e sem aplicação de TPC (QUI). As AACPD foram obtidas de acordo com a equação de Campbell e Madden (1990), sobre um índice de doença calculado a partir da metodologia de Czermainisky (1999) a partir de escalas gráficas. Valores nas colunas em (A) não diferem significativamente, de acordo com o testes F ($P = 0,98$), em (B), de acordo com os testes F ($P = 0,089$) e t de Student ($P = 0,241$), e em (D), de acordo com os testes F ($P = 0,176$) e t de Student ($P = 0,266$). Médias em (C) diferem significativamente, de acordo com o teste F ($P = 0,0059$).

Uma hipótese poderia ser o “efeito limpeza”, observado nos testes envolvendo imposição de FAQ capaz de eliminar estruturas maduras e ativas do patógeno sobre o limbo foliar (Figura 1A, 1B). Um fenômeno semelhante poderia estar ocorrendo nas estruturas da caliptra, durante os tratamentos FAQ do TPC à época do desenvolvimento floral. Muito embora o inóculo ressuspendido ao ar pela passagem do TPC esteja ativo e viável a dispersar epidemia, o fato da promoção da retirada de esporângios, porventura depositados em almofadas florais e estigmas nas caliptras, poderia atrapalhar

a penetração do patógeno bem num momento crucial para o desenvolvimento de lesões de míldio na baga do cacho.

Entretanto, como já comentado, estudos mais específicos devem ser conduzidos para verificação da hipótese biológica acima, bem como demais impactos que o FAQ possa impor ao ciclo de parasitismo de *P. viticola* em cachos, para justificar adequadamente a redução de severidade observada nas estruturas reprodutivas da videira, em vinhedos ‘Pinot-Noir’ e ‘Chardonnay’ na estação de 2013-2014.

Conclusões

- O fluxo de ar quente não inativa e nem mata esporângios de *P. vitícola*. Ao contrário, promove aumento na atividade de lançamento de zoósporos ativos;
- Por inspeção visual, aplicações de fluxo de ar quente parecem suspender para o ar estruturas reprodutivas maduras e ativas de *P. vitícola*, reduzindo inóculo na superfície do tecido foliar, mas promovendo sua dispersão;
- O fluxo de ar quente não induz respostas robustas em atividades de β -1,3-glucanases (GLU) e quitinases (CHI), PR-Proteínas associadas à resistência sistêmica adquirida (SAR), extraídas de células foliares de 'Cabernet Sauvignon' e 'Bordô'. O fluxo de ar quente promove sensíveis alterações nas atividades de peroxidases de monolignóis (GPX) e, principalmente, em polifenoloxidasas (PPO) de 'Bordô', mas não promove acúmulo significativo de lignina, a 72 HAT. A biossíntese de lignina seria o principal papel para as enzimas GPX e PPO na defesa da videira contra patógenos.
- Na visão dos autores, há evidências circunstanciais suficientes para indicar que o fluxo de ar quente não induz respostas associadas à resistência sistêmica adquirida (SAR), nas cvs. Cabernet Sauvignon e Bordô. Ou, no máximo, que essas respostas de indução de resistência seriam bastante discretas e descoordenadas;
- Diferentes combinações de temperatura de fluxo de ar quente e número de aplicações não reduzem significativamente incidência e severidade do míldio das estruturas vegetativas (folhas), em ambiente controlado (casa de vegetação) e em condições de campo;
- Aplicações de FAQ por equipamento TPC, suplementando um esquema de controle químico, promove redução de lesões de míldio nos cachos, a partir de aplicações na floração. O mecanismo biológico dessa redução permanece a ser investigado.

Agradecimentos

À Vinícola Cave Geisse Ltda., via Cooperação Técnica (SAIC/AJU no 21700.13/0034-3), pela concessão de vinhedos para experimentos e contínua parceria;

Aos laboratórios de Pós-Colheita, LACEM e de Microbiologia da Embrapa Uva e Vinho, e aos seus supervisores, pelo irrestrito apoio científico.

Ao CNPq e à Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará (UFC), pela anuência e concessão da transferência institucional dos equipamentos associados a projetos coordenados pelo primeiro autor, da UFC para Embrapa Uva e Vinho, conforme DOU N° 81 de 29 de abril de 2011, que tornou possível a realização dessa pesquisa.

Referências

- ALBUQUERQUE, C. Tempo quente nas videiras. **Cultivar**, 07 ago. 2013. Disponível em <<http://www.grupocultivar.com.br/site/content/noticias/?q=37305#37305>>. Acesso em: 03 jun. 2014.
- ALLÈGRE, M.; DAIRE, X.; HÉLOIR, M-C.; TROUVELOT, S.; MERCIER, L.; ADRIAN, M.; PUGIN, A. Stomatal deregulation in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. **New Phytologist**, v. 173, p. 832–840, 2007.
- ASSELBERGH, B.; DE VIEESSCHAUWER, D.; HOFTE, M. Global switches and fine-tuning – ABA modulates plant pathogen defense. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, p. 709–719, 2008.
- ATKINSON, N. J.; URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 10, p. 3523-3544, 2012.
- AZEVEDO, L. A. S. **Manual de quantificação de doenças de plantas**. São Paulo: Novartis Biociências, 1998.
- BARRA, F. M. L. **Use of a centrifugal fan to insert a layer of hot air into a cold air mass with no turbulence**. Int. 237/12.30A. U.S. n.US5934013. 25 Nov. 1997.

- BARRA, F. M. L. **Method for thermal pest control**. Int. 43/144. U.S. n.US7134239 B2. 26 Apr. 2002.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, p. 23–58, 2005.
- BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 379–406, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Wiley & Sons, 1990. 532 p.
- CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; CARVALHO, C. P. S.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. An aqueous suspension of *Crinipellis pernicios*a mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, v. 26, p. 729-738, 2007.
- CAVALCANTI, F. R.; BUENO, C. J.; ALMANÇA, M. A. K. **Declínio e morte de plantas de videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013. 40 p. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 82).
- 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). No prelo.
- 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. Documentos, 88). No prelo.
- CONRATH, U. Molecular aspects of defence priming. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 10, p. 524-531, 2011.
- 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.
- DESIKAN, R.; CHEUNG, M. K.; BRIGHT, J.; HENSON, D.; HANCOCK, J. T.; NEILL, S. J. Hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 205–212, 2004.
- DOMINGUES, B. A. **Ácido salicílico, abscísico e jasmônico em videiras submetidas ou não à aplicação da tecnologia TPC (Thermal Pest Control)**. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luís de Queiróz, Piracicaba, SP.
- EBERT, L. C.; SCHLOSSER, J. F.; FERRER, P. G. S.; FRANTZ, U. G.; FARIAS, M. S. Percepções e expectativas sobre a tecnologia *Thermal Pest Control* na vitivinicultura brasileira. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, v. 5, p. 34-40, 2013a.
- EBERT, L. C.; SCHLOSSER, J. F.; FERRER, P. G. S.; FRANTZ, U. G.; FARIAS, M. S. Controle a fogo. **Cultivar - Máquinas**, v. 132, p. 42-45, 2013b.
- FISHER, M.; DAWSON, A. **Thermal plant treatment and a machine to apply the treatment**. Int. A01G13/08. U.S. WO2013147962A1. 22 Mar. 2013.
- GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F.; NICOLAS, J. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 215, n. 1, p. 59-65, 1993.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. Vinícolas aplicam nova tecnologia sem uso de agrotóxicos e pesticidas. **Informativo Saca Rolhas**, v. 2, n. 4, p. 15, 2011.
- KANZAKI, H.; SAITOH, H.; ITO, A.; FUJISAWA, S.; KAMOUN, S.; KATOU, S.; YOSHIOKA, H. TERAUCHI, R. Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*.

Molecular Plant Pathology, v. 4, n. 5, p. 383–391, 2003.

LEAR, B.; LIDER, L. A. Eradication of root-knot nematodes from grapevine rootings by hot water. **Plant Disease Reporter**, v. 43, p. 314-317, 1959.

LIU, Y.; BURCH-SMITH, T.; SCHIFF, M.; FENG, S.; DINESH-KUMAR, S. P. Molecular chaperone hsp90 associates with resistance protein n and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 2101–2108, 2004.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, p. 551-565, 2002.

MONTEIRO, J. E. B. A.; FINGER, G.; DULLIUS, M.; CAVALCANTI, F. R. **Thermal Pest Control (TPC) I: caracterização do tratamento de fluxo de ar quente em vinhedo**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico 158). No prelo.

MONTIES, B. Lignins. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Ed.). **Methods in plant biochemistry**. New York: Academic Press, 1989. v. 1, p. 113-158.

NEGA, E.; ULRICH, R.; WERNER, S.; JOHN, M. Hot water treatment of vegetable seed - an alternative seed treatment method to control seed borne pathogens in organic farming. **Journal for Plant Diseases and Plant Protection**, v. 110, p. 220-234, 2003.

NIKS, R. E.; MARCEL, T. C. Nonhost and basal resistance: how to explain specificity? **New Phytologist**, v. 182, p. 817–828, 2009.

PASTORA, V.; LUNA, E.; MAUCH-MANI, B.; TON, J.; FLOR, V. Primed plants do not forget. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 46– 56, 2013.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 7, p. 1565-1571, 1990.

SUKANYA, S. L.; SPRING, O. Influence of temperature and ultra-violet light on viability and infectivity of *Peronospora tabacina* sporangia. **Crop Protection**, v. 51, p. 14-18, 2013.

TON, J.; FLORS, V.; MAUCH-MANI, B. The multifaceted role of ABA in disease resistance. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 310–317, 2009.

TURECHEK, W. W.; PERES, N. A. Heat treatment effects on strawberry plant survival and angular leaf spot, caused by *Xanthomonas fragariae*, in nursery production. **Plant Disease**, v. 93, p. 299- 308, 2009.

UCHANSJI, M.; SKIRVIN, R. M.; NORTON, M. A. The use of in vitro thermotherapy to obtain Turnip mosaic virus-free horseradish plants. **Acta Horticulturae**, v. 631, p. 175-179, 2004.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 13, n. 1, p. 43-50, 1991.

VERHAGE, A.; VAN WEES, S. C. M.; PIETERSE, C. M. J. Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say? **Plant Physiology**, v. 154, p. 536–540, 2010.

VINCENT, C.; PANNETON, B.; FLEURAT-LESSARD, F. **Physical control methods in plant protection**. Berlin: Springer-Verlag; Paris: INRA, 2001. 329 p.

YANG, X.; GALLEGLY, M. E.; HONG, C. A high-temperature tolerant species in clade 9 of the genus *Phytophthora*: *P. hydrogena* sp. nov. **Mycologia**, v. 106, n. 1, p. 57-65, 2014.

WIDIASTUTI, A.; YOSHINO, M.; SAITO, H.; MAEJIMA, K.; ZHOU, S.; ODANI, H.; NARISAWA, K.; HASEGAWA, M.; NITTA, Y.; SATO, T. Heat shock-induced resistance in strawberry against crown rot fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 84, p. 86-91, 2013

WIDIASTUTI, A.; YOSHINO, M.; HARUFUMI, S.; MAEJIMA, K.; ZHOU, S.; ODANI, H.; HASEGAWA, M.; NITTA, Y.; SATO, T. Induction of disease resistance against *Botrytis cinerea* by heat shock treatment in melon (*Cucumis melo* L.). **Physiological**

and Molecular Plant Pathology, v. 75, p. 157-162, 2011.

WIRTH, S. J.; WOLF, G. A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 12, n. 3/4, p. 197-205, 1990.

**Circular
Técnica, 100**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Uva e Vinho
Rua Livramento, 515 - Caixa Postal 130
95700-000 Bento Gonçalves, RS
Fone: (0xx) 54 3455-8000
Fax: (0xx) 54 3451-2792
<https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/>
1ª edição
1ª impressão (2014): 500 exemplares

**Comitê de
Publicações**

Presidente: *César Luis Girardi*
Secretária-Executiva: *Sandra de Souza Sebben*
Membros: *Adeliano Cargnin, Alexandre Hoffmann, Ana Beatriz da Costa Czermainski, Henrique Pessoa dos Santos, João Caetano Fioravanço, João Henrique Ribeiro Figueredo, Jorge Tonietto, Luísa Veras de Sandes Guimarães e Viviane Maria Zanella Bello Fialho*

Expediente

Editoração gráfica: *Alessandra Russi*