

CIRCULAR TÉCNICA

157

Bento Gonçalves, RS
Abril, 2021

Indução de resistência não deve ser o único mecanismo de defesa associado a um controle biológico eficiente para o míldio da videira

Fábio Rossi Cavalcanti



Indução de resistência não deve ser o único mecanismo de defesa associado a um controle biológico eficiente para o míldio da videira¹

O míldio da videira é causado pelo oomiceto *Plasmopara viticola* (Berk. & Curtis) Berlese & De Toni. Esta doença ainda é considerada uma das maiores ameaças à videira no mundo, sendo particularmente destrutiva na Europa e na metade oriental dos Estados Unidos, em regiões amenas e úmidas. O míldio pode afetar todas as estruturas do dossel, como folhas, inflorescências e frutos (El-Sharkawy et al., 2018). Em casos extremos pode desfolhar a videira até perdas totais de produção (Cavalcanti et al., 2020).

No ciclo da doença, o patógeno coloniza os tecidos e produz esporângios que são as estruturas de propagação e dispersão espacial. Uma vez depositado sobre a superfície do tecido suscetível, cada esporângio pode liberar zoósporos biflagelados que são capazes de se mover e penetrar até aberturas naturais (estômatos) para desencadear a infecção. Após a penetração, um tubo germinativo é gerado e atinge a cavidade subestomática, onde uma vesícula e hifas primárias são formadas (Yin et al., 2017). Manchas de óleo (sintomas) e pó branco (sinais do oomiceto) podem ser facilmente evidenciadas a olho nu, e caracterizam a presença da doença na parte superior e inferior da folha da videira respectivamente (La Torre et al., 2018).

O míldio é controlado principalmente por esquemas de pulverização de substâncias que protegem a planta e erradicam o patógeno (Gessler et al., 2011). A calda bordalesa (sulfato de cobre + óxido / hidróxido de cálcio) aparece como o primeiro protetor na história da Fitopatologia, e ainda hoje é amplamente usada na viticultura para o controle do míldio (Agrios, 2005). Outras formas de cobre podem ser encontradas em várias substâncias protetoras, como por exemplo, oxicloreto de cálcio e octanoato de cobre. As substâncias a base de cobre são muito importantes na viticultura orgânica em

¹ Fábio Rossi Cavalcanti, engenheiro agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS

várias regiões de produção do mundo sendo, ainda, o veículo mais confiável para o controle do míldio neste sistema (Selim, 2013).

Apesar de sua eficácia, as substâncias a base de cobre têm sido cada vez mais criticadas por causa de seu potencial de danos ambientais. Talvez a mais urgente delas seja a questão da sua acumulação nos solos das vinhas, especialmente nas áreas de cultivo tradicionais e mais antigas. Como o cobre no solo não é degradado e tem taxas insignificantes de lixiviação, escoamento ou sorção de raiz, este metal pesado acaba se acumulando indefinidamente como um potencial contaminante do solo causando efeitos tóxicos em plantas, microorganismos e organismos do solo e das águas de nascentes, bem como saúde animal e humana (La Torre et al., 2018). Segundo Schafer Junior et al. (2003), valores muito altos e tóxicos de cobre (acima de 100 mg de CuSO_4 por kg de solo) foram evidenciados no estado do Rio Grande do Sul. Esses níveis tóxicos foram interpretados como uma consequência direta da aplicação continuada de fungicidas a base de cobre em áreas de vinhedos. Assim, no Brasil, foi estabelecido que a quantidade máxima de cobre a ser aplicada em qualquer de suas formas não pode ultrapassar 6 kg ha por ano, na viticultura orgânica (Ministério..., 2014). No mundo, em países onde não há proibição, a tolerância para aplicações de cobre varia entre 0,3 e 6 kg ha por ano, para viticultura orgânica, convencional e para o manejo integrado de pragas e doenças (MIPD) (La Torre et al., 2018).

As estratégias de redução do cobre utilizadas no controle do míldio se destacam em várias frentes. Uma delas é a substituição por extratos biológicos e formulações naturais em calendários de pulverização. Muitos desses extratos foram revisados por Dagostin et al. (2011). As substâncias listadas na revisão seriam capazes de produzir controle (biológico) direto sobre as estruturas do patógeno e/ou induzir resistência das plantas a fim de diminuir o progresso do míldio. Estudos envolvendo agentes de controle biológico (*Biological Control Agents* - BCAs) têm sido cada vez mais considerados na proteção de vinhedos ao longo de estratégias de MIP, principalmente com o gênero *Trichoderma* e bactérias endofíticas *Bacillus* spp (Romanazzi et al., 2016; Cavalcanti et al., 2020). Além disso, estudos para caracterizar bem os mecanismos biológicos que defendam plantas de doenças precisam ser conduzidos para o entendimento detalhado do mecanismo e da eficiência de tais substâncias de controle. Assim, com sorte, recomendações técnicas baseadas em BCAs

possam um dia rivalizar com os produtos químicos convencionais, produzindo convencimento para conversão de mais agricultores à viticultura orgânica.

Substâncias alternativas podem induzir resistência de planta (IR), entregando elicitores ou moléculas capazes de ser reconhecidas por receptores intracelulares e/ou de superfície celular e produzindo cascatas de transdução de sinal, a fim de desreprimir a expressão de genes relacionados à defesa (Cavalcanti et al., 2006; Cavalcanti et al., 2014). Essas respostas de defesa coordenadas podem promover a aclimação celular em torno dos locais de infecção, produzindo defesas químicas (fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese - PRPs) e físicas (Cavalcanti et al., 2011). Muitas PRPs manifestam atividade antifúngica direta ou outro envolvimento em processos de defesa celular. Por exemplo, peroxidases (GPX, EC. 1.11.1.7) e polifenoloxidasas (PPO, EC 1.10.3.1) podem desempenhar um papel no fortalecimento da parede da célula hospedeira (deposições de lignina) e β -1,3-glucanases (GLU, EC 3.2.1.39) e quitinases (CHI, 3.2.1.14) são relatadas por degradar camadas de células fúngicas em resposta a um evento de parasitismo (Cavalcanti et al., 2007; Gupta et al., 2013; Cavalcanti et al., 2014). Assim, as alternativas de pulverização em sistemas de viticultura orgânica devem passar por substâncias que possuam algum mecanismo antagônico para prejudicar os ciclos de vida do patógeno (El-Sharkawy et al., 2018).

As plantas têm potencial biológico para responder ao ataque do patógeno, mesmo aquelas consideradas suscetíveis a uma determinada doença. Por um momento, os microrganismos patogênicos apresentam capacidade de não serem percebidos pela planta, ao mesmo tempo em que mobilizam rapidamente ferramentas de ataque, determinantes de patogenicidade (por exemplo, enzimas como celobiohidrolases e poligalacturonases) e fatores de virulência (toxinas como *AAL-toxin* e fumonisinas), eficazes para digerir as barreiras constitutivas de tecido vegetal e construir seu local de parasitismo (Mendgen et al., 1996; Cavalcanti et al., 2014). De forma conservada, as plantas superiores têm a capacidade de responder a estímulos químicos produzindo defesas. Compostos sintéticos, como ácido salicílico (SA), ácido 2,6-dicloro-isonicotínico (INA), ésteres de ácido S-metil-benzo (1,2,3)-tiadiazol-7-carbotióico (BTH), entre outros, são capazes de induzir uma resposta coordenada de resistência sistêmica adquirida (*Systemic Acquired Resistance* - SAR) na célula vegetal próxima (local) ou distante (sistêmica)

dos pontos de contato com a substância, ou ainda à adesão e penetração de um patógeno (Walters et al., 2013). Uma resposta SAR é caracterizada principalmente pela expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (*PR-proteins*) (Cavalcanti et al., 2007).

Substâncias à base de ácido fosforoso e fosfito (fosfonato) também são aplicadas no controle de *P. viticola* em vinhedos. Esses produtos são catalogados como fertilizantes foliares no Brasil, mas funcionam como uma proteção contra o míldio e podridão dos cachos da videira por um mecanismo misto (não completamente elucidado) sobre o patógeno e por indução de resistência das plantas (Pereira et al., 2012; Pinto et al., 2012; Cavalcanti et al., 2014). Paralelamente aos fosfitos, a quitosana é um polímero derivado da desacetilação da N-acetil-glucosamina da quitina encontrada nas paredes celulares de fungos verdadeiros e no exoesqueleto de insetos e crustáceos. Além de sua ação antimicrobiana, a quitosana é um composto relatado por desempenhar um papel na ativação das respostas de defesa da planta, provavelmente porque é reconhecida por receptores celulares associados à resistência parcial (Kurita, 2006; Malerba; Cerana, 2016). Outros padrões de moléculas que podem ser transportados por misturas de BCAs podem emular fragmentos de moléculas liberadas durante as interações planta-patógeno que podem ser reconhecidas por receptores de padrão molecular associado a micróbios (Microbe-Associated Molecular Pattern - MAMPs), desencadeando resistências de plantas (Henry et al., 2012).

Neste trabalho, foi testada a hipótese de que mecanismos de indução de resistência de planta (IR) desencadeados por BCAs (*B. amyloliquefaciens* e *Trichoderma*), quitosana e um bioestimulante à base de aminoácidos (BS) são capazes de atrasar ou mesmo prejudicar significativamente o progresso do míldio, mas não o suficiente para igualar o desempenho do cobre. Para verificar os mecanismos de IR, as atividades de guaiacol peroxidases (GPX), polifenoloxidases (difenolases, PPO), β -1,3-glucanases (GLU) e quitinases (CHI) foram registradas em um intervalo de tempo após as exposições do elicitor, em paralelo às determinações do teor de lignina das folhas 72 horas após os tratamentos. Além disso, esporângios de *Plasmopara viticola* foram expostos a elicitores (diretamente ou nas folhas) e analisados a posteriori para evidenciar o nível de lesão na estrutura do patógeno.

O objetivo do presente estudo foi compreender o papel da IR e sua atuação na proteção da videira contra *P. viticola*, e sua eficácia relativa no atraso do progresso do míldio.

Material e Métodos

Ensaio experimentais, tratamentos e inoculações

Os ensaios em casa de vegetação foram realizados entre setembro de 2017 e fevereiro de 2018, na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Uva e Vinho (29°9'53,01"S; 51°31'33,68"W), localizada em Bento Gonçalves/RS.

O material vegetal foi definido como mudas de 'Cabernet Sauvignon' de três anos com rebrotas (15 folhas em média) de 45 dias. O delineamento experimental foi montado em blocos casualizados (DBC) com três parcelas por tratamento, sendo cada parcela mantida em gaiola individualizada (bloco experimental). Cada parcela experimental foi preparada com cinco mudas plantadas em vasos de 2 L com substrato solo esterilizado: areia: vermiculita (2:1:1). A estrutura da gaiola consistiu por uma grade de madeira envolta por um filme plástico transparente, com um umidificador ultrassônico frio conectado 24 horas em seu interior para garantir percentual de umidade (> 90% UR) favorável à infecção.

Os tratamentos testados em casa de vegetação foram:

1. Suspensão de *Trichoderma asperellum* (2 g/L);
2. Suspensão de *Trichoderma asperellum* (4 g/L);
3. Suspensão de *Trichoderma harzianum* (2 g/L);
4. Suspensão de *Trichoderma harzianum* (4 g/L);
5. Suspensão de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa D-747 (2,5 g/L);
6. Quitosana solúvel (3,6 mL/L);

7. Fosfito de potássio (27% P_2O_5 e 27% K_2O , 2 mL/L);
8. Aminoácido e bioestimulante de fitoalexinas (BS, 1 mL/L);
9. Indutor de resistência, Benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotióico (0,2 g/L BTH);
10. Controle positivo - Calda bordalesa (Ctrl+, CB1010, 1 kg $CuSO_4$ e 1 kg CaO por 100 L de água);
11. Controle negativo - água destilada (Ctrl-).

Os compostos experimentados foram pulverizados semanalmente, durante quatro (4) semanas, nas copas/folhas das mudas até o ponto de escorrimento. Dois dias antes da primeira pulverização dos tratamentos, as plantas foram inoculadas por pulverização com suspensão de esporângios de *Plasmopora viticola* obtidos de folhas apresentando mancha de óleo (sintoma típico) e pulverulência, encontradas em vinhedos desprotegidos. As folhas sintomáticas foram enxaguadas com água destilada até obter-se uma suspensão de 10^5 esporângios/mL em câmara de Neubauer. Os sintomas da doença foram avaliados em 7, 10, 12, 14, 17, 20 e 26 dias após a inoculação de *P. viticola* (DAI), a fim de classificar as lesões visuais em uma escala de doença de 0-4, conforme descrito adiante. Em cada muda foram avaliadas 15 folhas, totalizando 75 folhas por repetição (uma por bloco) e 225 por tratamento.

Em relação às condições de casa de vegetação, as plântulas foram mantidas em um ciclo de temperatura média de 28 °C dia/24 °C noite e fotoperíodo de 12 h, a 350–500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidade máxima de fluxo de fótons, medidas ao nível da planta por um IRGA (*IR-Gas Analyser*) - analisador de fotossíntese e trocas gasosas no infravermelho.

Quantificação de doença

Durante os meses de novembro e dezembro de 2017 e janeiro de 2018, o progresso e a densidade dos sintomas (manchas de óleo) e sinais (pulverulência na parte abaxial da folha) de míldio foram monitorados na estufa, após os tratamentos. As avaliações dos sintomas/sinais foram registradas por meio da escala gráfica de Azevedo (1998), dividida em

cinco (5) níveis de doença, abrangendo de 0 a 100% de severidade. As avaliações foram baseadas em inspeção visual por avaliador humano, cujas leituras foram validadas por software (Ampese et al., 2017). Os dados foram submetidos a uma transformação angular $\omega = \arcsin (ID^{1/2})$, na qual foram executados testes de normalidade (Shapiro-Wilk), ANOVA e inferência por Tukey a 5% de probabilidade. Os valores do índice de doença (ID%) foram definidos como a intensidade do míldio (Czermainski, 1999). As áreas sob a Curva de Progresso da Doença (AACPD) foram calculadas de acordo com a equação:

$$AACPD = \sum [(Y_i + Y_{i+1})/2] (t_{i+1} - t_i)$$

onde 'Y' é o ID% e 't' é tempo (dias) (Campbell; Madden, 1990). As porcentagens de proteção vegetal foram estimadas por $[1 - (x/y)]$, onde 'x' relaciona a AACPD das plantas tratadas e 'y' a AACPD das plantas pulverizadas com água (Ctrl-) (Cavalcanti et al., 2007). Os ensaios foram repetidos duas vezes.

Ensaio de viabilidade do esporângio

Esporângios frescos (sadios) de *P. viticola* foram obtidos de folhas apresentando sintomas de míldio para investigar a viabilidade dos esporângios e a liberação de zoósporos após exposição por 15 h aos BCAs e elicitores testados. Em um primeiro ensaio, as folhas manchadas de óleo foram enxaguadas com água destilada para chegar à suspensão de 2×10^5 esporângios/mL. Uma alíquota de 80 μ L da suspensão foi transferida para lâminas escavadas cujas cavidades foram marcadas com quatro quadrantes na base, com auxílio de caneta. Oitenta μ L de cada substância testada foram adicionados às cavidades com o dobro das concentrações experimentadas. Após uma diluição 1:2 para obtenção de um volume final de 160 μ L por cavidade, as concentrações finais da suspensão de esporângios e tratamentos estudados foram, respectivamente, de 1×10^5 esporângios/mL e a concentração de trabalho da substância.

Os tratamentos (um por cavidade quadriculada) e esporângios foram homogeneizados suavemente com micropipeta, cavidades cobertas por lamínula e incubadas por 15 horas em câmara úmida e 25 °C (BOD).

Os tratamentos estudados foram:

1. Suspensão de *Trichoderma asperellum* (4 g/L);
2. Suspensão de *Trichoderma harzianum* (4 g/L);
3. Suspensão de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa D-747 (0,5 g/L);
4. Suspensão de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa D-747 (2,5 g/L);
5. Fosfito de potássio (27% P₂O₅ e 27% K₂O, 2 mL/L);
6. Quitosana solúvel (0,6 mL/L);
7. Quitosana solúvel (3,6 mL/L);
8. Aminoácido e bioestimulante de fitoalexinas (BS, 1 mL/L);
9. Indutor de resistência, Benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotióico (0,2 g/L BTH);
10. Controle positivo - Calda bordalesa (Ctrl+, CB1010, 1 kg CuSO₄ e 1 kg CaO por 100 L de água);
11. Controle positivo (Ctrl+, [Metalaxyl-M + Mancozeb]² 3 mL/L);
12. Controle negativo - água destilada (Ctrl-).

O controle negativo consistiu de esporângios expostos à água destilada. Após o tempo de exposição planejado, 50 esporângios foram avaliados por quadrante e contados (C - cheios e V - vazios) totalizando 200, por cavidade. Os dados foram interpretados como percentagem do controle negativo (Ctrl-), ou seja: (esporângios vazios sob tratamento/esporângios vazios de Ctrl-) x 100, 15 h após a exposição à substância (HAT - Horas Após Tratamento).

Aproveitando as mesmas preparações acima descritas, zoósporos lançados dos esporângios também foram avaliados em aumento de 400x, em termos de sua motilidade. A atividade de zoósporos a 15 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 mobilidade, ou imóveis.

² Produto comercial registrado no MAPA/Agrofit, como PRODUTO FORMULADO sob nº 09599.

Ensaio de qualidade do esporângio

Para avaliar a qualidade do inóculo de *P. viticola*, esporângios foram obtidos de folhas infectadas com míldio do próprio experimento, submetidas aos tratamentos e controles, e coletadas ao final das avaliações em casa de vegetação (26 DAI).

Neste ensaio foram selecionados os tratamentos:

1. *Bacillus amyloliquefaciens* (Bac2,5, 2,5 g/L);
2. Bioestimulante de aminoácidos (BS, 1 mL/L);
3. BTH (0,2 g/L);
4. Controle positivo - Calda bordalesa (CB1010, 1 kg CuSO₄ e 1kg CaO por 100 L de água);
5. Controle negativo, água destilada (Ctrl-).

Folhas sintomáticas com limbos de área superficial aproximada foram selecionadas e, com um volume fixo de água destilada (4 mL), tiveram seus esporângios cuidadosamente ressuspensos e coletados. Pequenas correções nas áreas superficiais foram feitas mediante fator de correção baseado em razão linear com base na área do limbo foliar do grupo controle (Ctrl-). Os esporângios intactos (sadios), danificados e totais (sadios + danificados) de cada parcela experimental foram avaliados e contados em câmaras de Neubauer. A contagem foi registrada imediatamente após a coleta.

Ensaio para coleta de material vegetal e determinações bioquímicas

Para obtenção de material foliar para determinações bioquímicas, mudas com rebrotas de 45 dias de 'Cabernet Sauvignon' de três anos foram tratadas com:

1. Suspensão de *Trichoderma harzianum* (4 g/L);
2. Quitosana solúvel (3,6 mL/L);

3. Suspensão de *Bacillus amyloliquefaciens* (2,5 g/L);
4. Bioestimulante de aminoácidos (BS, 1 mL/L) e
5. Benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotióico (0,2 g/L BTH);
6. Controle negativo - água destilada (Ctrl-).

O desenho experimental seguiu como descrito em “Ensaio experimentais, tratamentos e inoculações”, sendo que neste ensaio “destrutivo”, a parcela experimental foi fixada em uma planta por repetição. Em casa de vegetação, folhas foram pulverizadas com os tratamentos e água destilada até o ponto de escorrimento. As folhas foram colhidas 12, 24, 48 e 72 h após as pulverizações (HAP). Após a colheita, os tecidos foliares foram limpos com papel absorvente asséptico, pesados, rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -20 °C para determinações analíticas.

As amostras coletadas foram homogeneizadas por 2 min em um almofariz e pistilo em diluição 1:3 (p/v) com tampão fosfato de potássio 100 mM gelado, pH 7,2, contendo EDTA 0,1 mM. Após filtração em gaze estéril, o material fresco foi centrifugado a 13.800 x g por 13 min a 4 °C. O extrato bruto obtido do sobrenadante foi utilizado para determinações enzimáticas. Para avaliar as atividades relativas das enzimas, a proteína solúvel (mgP/mL) dos extratos brutos foi determinada previamente usando albumina de soro bovino 0,3 M (BSA) como padrão para curva de diluição (Bradford, 1976).

Para estudar as respostas celulares relacionadas à indução de resistência, alíquotas (100 µL) dos extratos brutos (sobrenadante) foram utilizadas em misturas enzimáticas de 2,0 mL para peroxidases de monolignol (GPX), com guaiacol 20 mM e H₂O₂ 30 mM. Com o mesmo volume final (2,0 mL), as polifenoloxidasas (PPO) foram medidas com pirogalol 30 mM como substrato. As atividades de ambas as oxidases foram registradas por 10 minutos em espectrofotômetro. As atividades de GPXs foram lidas a 480 nm e PPOs a 410 nm (Cavalcanti et al., 2007). Uma unidade relativa de atividade (UA) de ambas as oxidases foi definida como a variação da absorbância no respectivo comprimento de onda da enzima por um miligrama de proteína solúvel por minuto (UA mgP/min). As atividades das quitinases (CHI) e β-1,3-glucanases (GLU) foram determinadas por um método de placa de 96 poços ajustado aos tecidos da folha da videira (Cavalcanti et al. 2007).

Para medir as atividades de CHI, uma quitina substituída marcada com remazol Brilliant Violet 5R (CM-Chitin-RBV) foi usada como substrato. Analogamente, curdlan carboximetilado (CM-Curdlan-RBB) foi aplicado para medir as atividades de β -1,3-glucanases. Em uma microplaca de 96 poços, 70 μ L do extrato bruto filtrado foram adicionados em cada poço e a reação foi iniciada pela adição de 60 μ L aquoso de CM – Chitina – RBV (2 g/L) + 130 ml de PBS 100 mM, pH 7,2, ou 60 μ L CM – Curdlan – RBB (4 g/L) + 130 ml de tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, para CHI e GLU respectivamente, cada enzima em sua placa. As reações foram interrompidas pela adição de 50 μ L de HCl 0,5 M após 80 min (para CHI) ou 120 min (para GLU) incubado a 35 °C. As microplacas de cada enzima foram então resfriadas em contato com gelo por 10 min e centrifugadas por 10 min a 1.450 x g. Esta etapa precipitou o substrato não degradado. Alíquotas de 210 μ L de sobrenadantes foram transferidas para novas placas para leituras de absorvância, a 492 nm para os ensaios CHI e 620 nm para GLU. Uma unidade para atividade de CHI (ou GLU) foi definida como a variação de uma unidade de absorvância a 492 (ou 620 nm) por miligrama de proteína solúvel por minuto (UA mgP/min). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Subamostragens das folhas tratadas e coletadas foram selecionadas para extração de lignina descrita por Monties (1989), com pequenas modificações. Alíquotas de 0,2 mg de material fresco foram pulverizadas com nitrogênio líquido e expostas a 85% de acetona (7 mL) por 48 horas de incubação. As amostras foram então centrifugadas a 7.500 x g por 15 min a 7 °C. O sobrenadante da clorofila foi descartado, o precipitado seco ao ar por 24 h e ressuspenso em 5 mL de ácido tioglicólico (TGA) em HCl 2 M (1:10, v/v) por 4 h a 25 °C. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo de 20 mL, onde 200 μ L de HCl 5 M foram adicionados aos tubos imersos em gelo por 4 h. Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifugação (7.500 x g, 30 min, 7 °C) com os pellets sendo homogeneizados em 5 mL de NaOH 0,5 M e lidos a 280 nm em espectrofotômetro de UV. Para quantificar a lignina solúvel em ácido (derivados de TGA), foi preparada uma curva padrão variando de 10-100 mg/mL de éter 2-hidroxipropil. Os dados foram expressos em microgramas por mililitro. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Análise estatística

Estatísticas descritivas e exploratórias, testes de normalidade, homocedasticidade, ANOVA, testes diversos, incluindo t, F e Tukey foram feitos a 5% de significância mediante método organizado por um script em linguagem R (Michel; Cavalcanti, 2020).

Resultados

Viabilidade e qualidade das atividades de esporângios e zoósporos de *P. viticola* após exposições a BCAs e elicitores, para proteção da videira contra o míldio

Dois ensaios in vitro foram realizados neste estudo com o objetivo de examinar os efeitos das substâncias estudadas sobre as estruturas de dispersão do patógeno: esporângios e zoósporos liberados. No primeiro ensaio, esporângios frescos foram coletados de folhas pulverulentas de 'Cabernet Sauvignon' desprotegidas e foram experimentados posteriormente com fungicidas e elicitores biológicos, ao longo de 15 horas. Aqui, verificou-se que, exceto pelos tratamentos com *Trichoderma* (*T. harzianum* e *T. asperellum*) que não diferiram ($P > 0,05$) dos controles de água (Ctrl-), todas as substâncias testadas responderam com um nível intermediário de inibição da viabilidade do esporângio para liberar zoósporos para o meio aquoso (Figura 1). Em relação aos tratamentos com *Trichoderma*, observou-se que eles também não puderam impedir suas atividades de zoósporos, sendo evidenciada uma atividade intermediária (**) de zoósporos expostos a esses tratamentos de BCA, ao microscópio óptico. Neste ensaio, foi evidenciado que quitosana (na dose de 3,6 mL/L), fosfito, *Bacillus amyloliquefaciens* (2,5 g/L), o bioestimulante (BS) e BTH apresentaram níveis de diminuição da viabilidade de seus esporângios variando 35 a 65% (não diferente, de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância) em comparação com controles de água (Ctrl-). No entanto, a quitosana não cancelou as atividades de zoósporo (Figura 1). Essas substâncias não promoveram diferenças ($P > 0,05$) entre si e a mistura Bordeaux (CB1010) em relação à viabilidade de esporângios frescos. Por outro lado, tanto o BTH (um indutor de defesa vegetal aclamado)

quanto o bioestimulante (BS) foram capazes de reduzir a viabilidade dos esporângios pela metade e interromper a atividade do zoósporo (Figura 1).

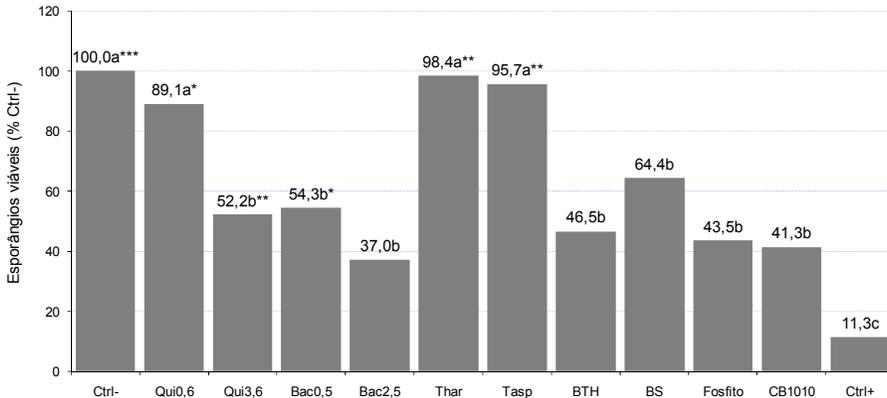


Figura 1. Viabilidade de esporângios sadios (frescos) de *P. viticola* e a liberação de zoósporos em meio aquoso, 15 HAT. Os tratamentos foram: 1) *Trichoderma asperellum* (Tasp, 4 g/L); 2) *Trichoderma harzianum* (Thar, 4 g/L); 3) *Bacillus amyloliquefaciens* (Bac0,5, 0,5 g/L e Bac2,5, 2,5 g/L); 4) fosfito de potássio (Fosfito, 2 mL/L); 5) quitosana (Qui0,6, 0,6 mL/L, e Qui3,6, 3,6 mL/L); 6) bioestimulante de aminoácidos (BS, 1 mL/L) e 6) BTH (0,2 g/L). Os controles positivos foram calda bordalesa (CB1010) e Metalaxyl-M + Mancozeb (Ctrl+, 3 mL/L). O controle negativo, água destilada (Ctrl-). Os dados são apresentados como porcentagem (%) do controle de água e ANOVA e o teste de Tukey com significância de 5%. Os asteriscos indicam (***) alta atividade, (**) atividade intermediária, (*) baixa e () nenhuma atividade de zoósporos liberados, 15 HAT.

No segundo ensaio in vitro, o objetivo foi verificar a qualidade do inóculo secundário surgido de plantas tratadas. O critério de escolha dos tratamentos obedeceu aos diferentes modos de ação quanto à proteção contra a doença. Foi observado que os tratamentos com *B. amyloliquefaciens*, CB1010 e BTH não reduziram significativamente ($P > 0,05$) a média dos esporângios totais em volume final de 4 mL de água, quando comparados com Ctrl- (Figura 2). Porém, nesses tratamentos, foi evidenciado um incremento de esporângios defeituosos: secos, enrugados e pequenos. O tratamento com BTH não manteve ($P < 0,05$) o nível de esporângios sadios quando comparado ao controle negativo (Ctrl-) (Figura 2). Por outro lado, as plântulas tratadas com o bioestimulante (BS) puderam apresentar uma queda forte e significativa (P

< 0,05) tanto nos esporângios totais quanto nos esporângios sadios coletados de suas folhas tratadas (Figura 2).

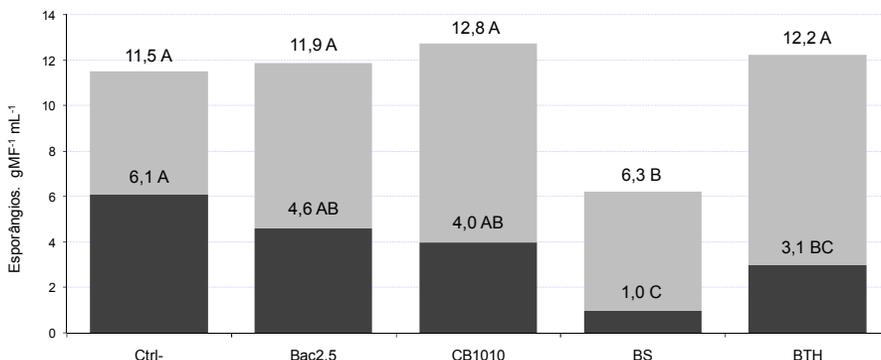


Figura 2. . Qualidade de esporângios de *P. viticola* obtidos de folhas tratadas e não tratadas (Ctrl-), 26 DAI. Os tratamentos neste foram: 1) *Bacillus amyloliquefaciens* (Bac2,5, 2,5 g/L); 2) bioestimulante de aminoácidos (BS, 1mL/L); 3) BTH (0,2 g/L). O controle positivo foi calda bordalesa (CB1010) e o controle negativo, água destilada (Ctrl-). As colunas escuras representam a média dos esporângios intactos (sadios) contados na câmara de Neubauer de 4 quadrantes. As colunas cinza representam a média do total de esporângios (sadios + danificados) ressuspensos e contados imediatamente após a lavagem. Em Ctrl-, os esporângios foram expostos a água destilada. Médias seguidas com as mesmas letras não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ($P > 0,05$).

Efeitos de BCAs e eliciadores no progresso do míldio da videira em casa de vegetação

Nesta pesquisa, os primeiros sintomas de míldio da videira no controle negativo (Ctrl-) foram observados aproximadamente 7 DAI. Observou-se que os níveis da doença atingiram 60% da máxima severidade, com folhas apresentando manchas de óleo e/ou frutificação de *P. viticola* (Figura 3). As avaliações revelaram que todas as curvas da doença aumentaram de forma constante em todos os tratamentos dentro de 26 DAI, exceto por *Bacillus amyloliquefaciens* (2,5 g/L) e pelo bioestimulante (BS) que atingiram seus picos por volta de 17 DAI e não progrediram daí em diante até o final de o intervalo de tempo (Figura 3). Plantas tratadas com *Trichoderma asperellum*

(2 g/L e 4 g/L), *Trichoderma harzianum* (2 g/L e 4 g/L), quitosana e BTH não revelaram proteções acima de 31%. Parcelas pulverizadas com fosfito de potássio, *Bacillus amyloliquefaciens* e o bioestimulante responderam com proteções mais altas, variando entre 44-68%. Tais tratamentos puderam estabilizar o progresso do míldio e prejudicar a dispersão da doença de 14 DAI em diante. O resultado mais robusto de proteção da videira contra *P. viticola* foi conferido pelo bioestimulante (BS) que atingiu 84% do desempenho do CB1010 (Ctrl+). Como esperado, nenhum dos BCAs ou elicitores testados conferiu proteção total em videiras desafiadas por *P. viticola* em condições de casa de vegetação.

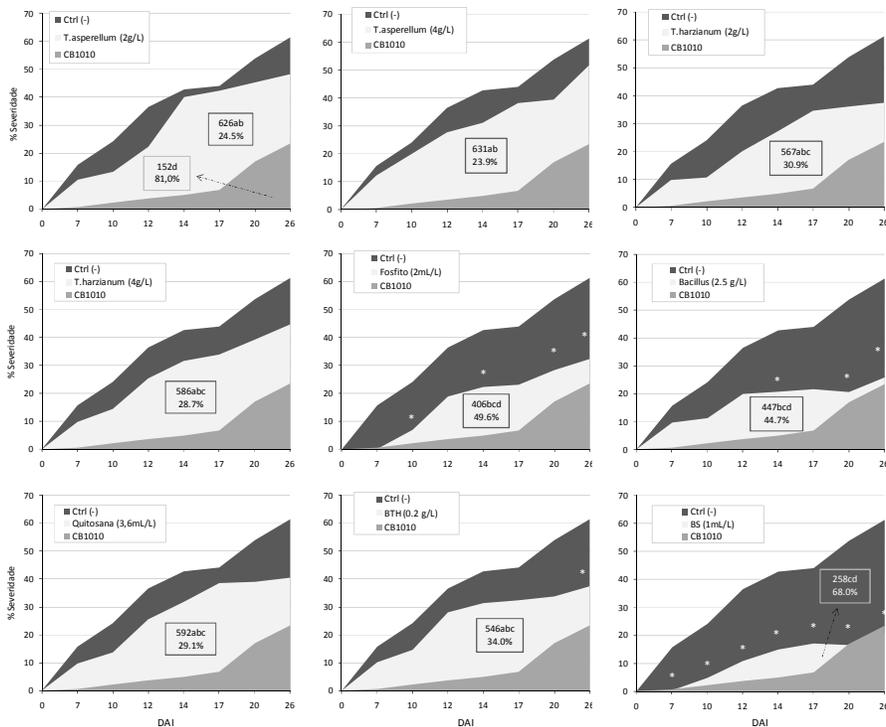


Figura 3. Ensaios de casa de vegetação para avaliação do progresso do míldio, AACPD e % de proteção (valores dentro das caixas) em folhas de videira, cv. Cabernet Sauvignon. Os tratamentos estão indicados nas legendas internas a cada gráfico. Os asteriscos dentro de cada dia de avaliação representam valores diferentes entre o tratamento e o Ctrl-, de acordo com o teste t (Student) a um nível de significância de 5%.

Efeitos dos BCAs e elicitores nas atividades enzimáticas e na deposição de lignina nas folhas da videira

Análises de enzimas relacionadas a respostas celulares de defesa foram realizadas em amostras de folhas expostas a BCAs e elicitores. A abordagem foi feita para saber se as substâncias poderiam induzir respostas de defesa da planta localmente no tecido da videira (Figura 4 e Figura 5), após o contato e absorção pela folha. Quatro enzimas relacionadas à patogênese (três proteínas PR e polifenoloxidasas) foram monitoradas em folhas de 'Cabernet Sauvignon' entre 12-72 horas após pulverizações (HAP) de BCAs e substâncias elicitoras.

Peroxidasas de guaiacol (GPX) extraídas de folhas expostas às substâncias estudadas responderam com reduções em suas atividades 24 HAP quando comparadas com os respectivos controles de água (Ctrl-) (Figura 4, primeira coluna), estes quase constantes durante o intervalo de estudo. A quitosana pareceu induzir a queda nas atividades do GPX somente após 24 HAP. Em relação a essa enzima, o tratamento com bioestimulante (1 mL/L) pareceu ser a única substância capaz de produzir aumentos significativos ($P < 0,05$) nas atividades de GPX dentro do intervalo experimental. Por exemplo, às 12 HAP as folhas de videira tratadas com o bioestimulante (BS) responderam com um valor cerca de sete (7) vezes maior que seu respectivo controle, caindo logo em seguida para um nível duas vezes maior (Figura 4 BS). Por outro lado, folhas de videira expostas a BTH mostraram reduções sustentadas e significativas ($P < 0,05$) nas atividades de GPX em todo o intervalo de tempo 12-72 HAP (BTH, Figura 4).

Com relação às polifenoloxidasas (PPO), foram observadas poucas modificações nas atividades das folhas tratadas com *Trichoderma* e quitosana (elicitor) quando comparadas ao controle negativo (Ctrl-), em 12-72 HAP (Figura 4 2ª coluna). As PPOs experimentaram aumentos apenas quando as folhas foram pulverizadas com dois elicitores testados (BTH e BS) e *Bacillus*, começando em 12 HAP até o final do intervalo de 12-72 HAP. Mas, diferentemente dos elicitores, o *Bacillus amyloliquefaciens* induziu diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamento e água (Ctrl-) apenas em 72 HAP. Em relação ao tratamento de BS, também houve uma resposta notável da atividade de PPO logo aos 12 HAP, com valores de atividade de

PPO chegando a cerca de duas vezes, quando comparados aos observados no controle negativo (Ctrl-) ao mesmo tempo. No BS, as atividades de PPO permaneceram significativamente ($P < 0,05$) maiores que os controles durante o período experimental, exceto em 24 HAP. Em folhas pulverizadas com BTH, foi observado que as atividades de PPO experimentaram aumentos significativos ($P < 0,05$) em 12 e 24 HAP com seus valores caindo logo depois, para os níveis alcançados pelo controle negativo (Ctrl-) (Figura 4).

Neste ensaio, somente quando as folhas da videira foram pulverizadas com *T. harzianum* (4 g/L) e BTH foi possível evidenciar aumentos nas atividades das β -1,3-glucanases (GLU) (Figura 4, 3ª coluna). Em *T. harzianum*, foram observados aumentos das atividades de GLU para um valor que se manteve superior ao de seus respectivos controles (Ctrl-) até o final do período experimental. No entanto, este tratamento com BCA induziu apenas um aumento significativo ($P < 0,05$), em 48 HAP. Em relação às folhas tratadas com BTH, observou-se um forte aumento da atividade de GLU a partir de 24 HAP seguido de queda em suas atividades, que se mantiveram elevadas a partir da linha de resposta do Ctrl- até o final do período experimental. Com relação ao tratamento com quitosana, foi evidenciada uma queda nas atividades de GLU entre 12-72 HAP. De fato, foi surpreendente que a atividade de GLU em folhas expostas à quitosana tenha caído cerca de três vezes em 12 HAP, permanecendo abaixo de seu controle (Ctrl-) para 24-72 HAP. Apesar de algumas respostas contrastantes em 24 e 72 HAP, outros tratamentos (*B. amyloliquefaciens* e BS) não pareceram induzir quaisquer modificações significativas nas atividades de GLU de folhas de videira que possam caracterizar um padrão de resposta enzimática no intervalo 12-72 HAP.

Além disso, folhas pulverizadas com BS (1 mL/L) não pareceram responder com um padrão enzimático típico, também no que diz respeito à atividade de quitinases (CHI). Isso pode ser assumido uma vez que não houve uma resposta enzimática que pudesse ser mantida significativamente diferente das evidenciadas pelo controle negativo (Ctrl-) avaliado em 24 HAP pelo menos, dentro do intervalo experimental. Por outro lado, plantas pulverizadas com *T. harzianum*, *B. amyloliquefaciens* e BTH evidenciaram aumentos notáveis em suas atividades CHI ao longo do tempo experimental. As folhas pulverizadas com *T. harzianum* mostraram um forte incremento na atividade

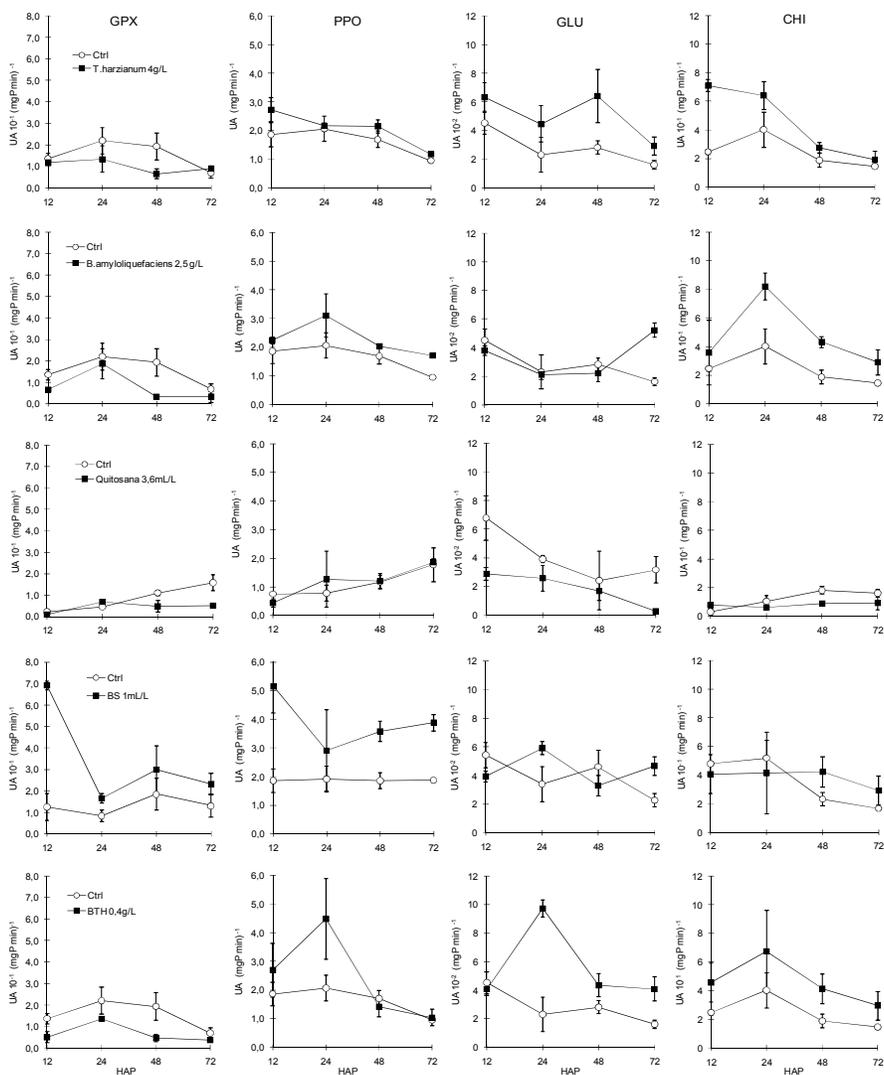


Figura 4. Atividades de guaiacol peroxidases (GPX), polifenol oxidases (PPO), β -1,3-glucanases (GLU) e quitinases (CHI) em folhas de 'Cabernet Sauvignon' após pulverizações com controles de água destilada (Ctrl-, -o-), BCAs e elicitores (-■-), legendados à esquerda. As respostas enzimáticas evidenciadas nas folhas pulverizadas por cada substância são exibidas em cada linha. As respostas enzimáticas associadas a uma enzima relacionada à defesa são exibidas em cada coluna, com cada enzima sendo intitulada no topo. As amostras foram coletadas 12, 24, 48 e 72 h após as pulverizações (HAP) para extração de proteínas solúveis e determinações enzimáticas. As barras de erro indicam o desvio padrão da média.

de CHI logo aos 12 HAP, seguida por uma redução da atividade aos 48 HAP em diante. As plantas pulverizadas com *B. amyloliquefaciens* e BTH responderam com valores de atividade de CHI em torno de duas vezes maiores do que Ctrl-, permanecendo quase constante a 72 HAP. Quando as folhas foram pulverizadas com a suspensão de quitosana, as atividades de CHI responderam com ligeira diminuição logo em 24 HAP. Na verdade, em relação às plântulas tratadas com quitosana, as três PR-proteínas e a PPO experimentaram baixas atividades e poucas modificações quando comparadas com o controle negativo (Ctrl-), considerando o intervalo de tempo 12-72 HAP (Figura 4, 2ª linha).

Com relação aos teores de lignina (derivados marrons de TGA) nas folhas 72 HAP após a exposição aos BCAs e eliciadores escolhidos, não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos e o controle negativo (Figura 5). No entanto, puderam ser evidenciados níveis

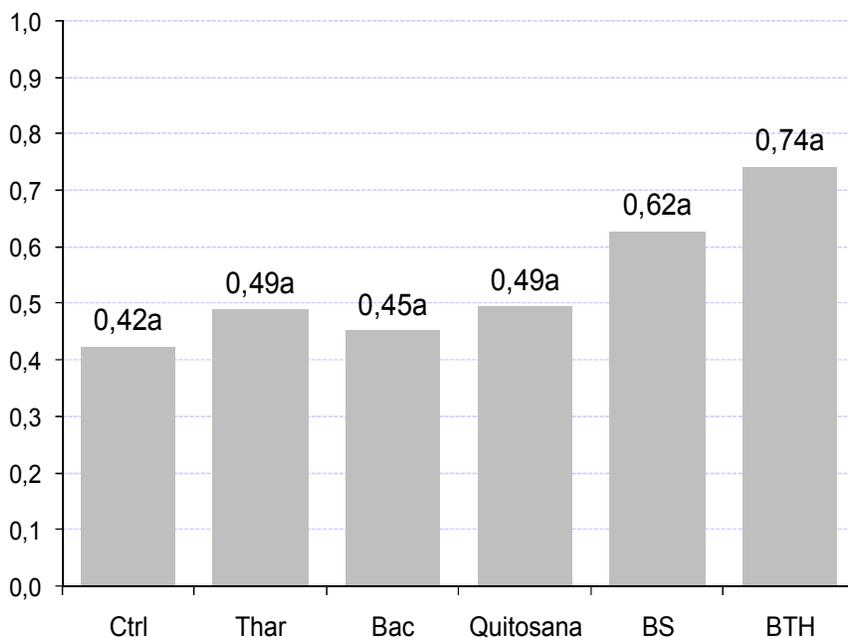


Figura 5. Conteúdo de lignina (derivados de TGA, mg/g FW – massa fresca) extraído de folhas de videira (cv. Cabernet Sauvignon), 72 horas após pulverizações (HAP) com BCAs e eliciadores. As plântulas controle (Ctrl-) foram pulverizadas com água destilada. Médias seguidas com as mesmas letras não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ($P > 0,05$).

contrastantes nas quantidades de lignina encontradas nas folhas tratadas, a 72 HAP. Como esperado, os eliciadores testados (BTH, BS e quitosana) responderam com os maiores teores de lignina quando comparados aos BCAs e aos controles de água, mesmo sem significância abaixo de 5% ($P = 0,194$; $LSD = 0,436$; $SE = 0,092$).

Discussão

Neste trabalho, foram realizados experimentos em casa de vegetação para levantamento de doenças e amostragens de material vegetal, a fim de evidenciar quais mecanismos parciais poderiam afetar o progresso do míldio nas folhas da videira, após pulverizações com BCAs e eliciadores. Tais substâncias foram escolhidas em função de relatórios gerais de sua aceitação e manuseio para a viticultura orgânica, da forma mais ampla possível (Dagostin et al., 2011; Delaunois et al., 2014).

Basicamente, três hipóteses foram consideradas neste estudo: i) as substâncias testadas seriam capazes de lesar os esporângios (estruturas do patógeno) diretamente no ponto de parar de lançar seus zoósporos e/ou mesmo inativar os zoósporos liberados; ii) se a resistência local da planta (IR) induzida por BCAs, quitosana, fosfito e outros elicitores seria suficiente para reduzir significativamente o progresso do míldio; iii) tais substâncias teriam efeitos em ambos os mecanismos biológicos de redução das taxas de evolução da doença.

As respostas de defesa de plantas mediadas por BCAs, extratos totais e eliciadores têm demonstrado proteger a videira contra doenças causadas por *Botrytis cinerea*, *P. viticola* e *Erysiphe necator* (Godard et al., 2009; Perazzolli et al., 2012; Pereira, et al., 2012; Cavalcanti et al., 2014). Esses relatos são baseados precisamente na observação de atrasos na evolução da doença com a detecção de incrementos em marcadores de IR, como fitoalexinas estilbenos (resveratrol, Δ -viniferina, ϵ -viniferina etc), aumento da atividade de proteína PR e deposições de lignina na parede celular etc.

No presente estudo, o bioestimulante (BS, 1mL/L) pareceu conferir proteção segura em videiras 'Cabernet Sauvignon' contra o míldio, atingindo 68% de proteção e 84% de desempenho da calda bordalesa (Ctrl+) (Figura 3).

Observou-se que as proteções de BS foram evidenciadas com redução significativa ($P < 0,05$) na viabilidade dos esporângios e inibição das atividades do zoósporo, 18 DAP (Figura 1). Além disso, o BS induziu a única queda altamente significativa ($P < 0,01$) no inóculo secundário (próximo a 50% de Ctrl-) entre os tratamentos experimentados, 26 DAP. Assim, há um forte indicativo de que a mistura de BS poderia atrasar o ciclo do patógeno (colonização) no tecido do hospedeiro. Tais evidências podem ser interpretadas como um tipo muito eficiente de indução de resistência conferida pela substância. Recentemente, foi relatado que as substâncias de aminoácidos e fitoalexinas podem servir como bioestimulantes para o crescimento de plantas e proteção contra doenças (Popko et al., 2018)

O BS pulverizado nas folhas induziu aumentos significativos ($P < 0,05$) nas atividades de GPX e PPO logo em 12 HAP, duas vezes e meia do que aqueles revelados pelos controles de água (Figura 4). No entanto, essa substância não alterou significativamente as atividades de CHI e GLU. Na verdade, quitinases e β -1,3-glucanases são proteínas PR com tendência a degradar a parede celular de hifas de fungos patogênicos verdadeiros como uma resposta de defesa contra processos de parasitismo (Gupta et al., 2013). Mesmo que a BS pudesse aumentar as atividades de ambas as enzimas, provavelmente as mesmas teriam pouco rendimento na hidrólise das paredes celulares do oomiceto, uma vez que esses são constituídos principalmente por celulose e, em menor escala, por quitina ou β -1,3-glucanos (Werner et al., 2002).

Enquanto BS não alterou as atividades de CHI e GLU, mesmo sendo capaz de induzir aumentos nos níveis de GPX, PPO e lignina (não significativo, $P > 0,05$), o tratamento à base de *Trichoderma harzianum* (4 g/L) pôde induzir aumentos relevantes nas atividades de CHI e GLU por 12-24 HAP pelo menos (Figura 4). No entanto, folhas tratadas com *T. harzianum* pareceram não aumentar as atividades de GPX (houve redução aqui) e PPO, o que pode estar relacionado a incrementos muito baixos de lignina em plântulas expostas a esse BCA, apenas alguns pontos maiores (0,49 mg/g) do que as apresentadas por Ctrl- (0,45 mg/g) e quitosana (0,49 mg/g) (Figura 5). De fato, quando as folhas de 'Cabernet Sauvignon' foram expostas a *T. asperellum* e *T. harzianum* (duas doses cada), elas pareceram trazer proteção muito baixa para as plântulas desafiadas pelo míldio (Figura 3). Seus níveis de proteção não ultrapassaram 31% (o que é considerado um perfil baixo) também porque

eles não conseguiram inibir a viabilidade dos esporângios e a atividade dos zoósporos (Figura 1).

Da mesma forma, a quitosana experimentada produziu discreto atraso na curva de progresso da doença, atingindo apenas 29,1% de proteção (Figura 3). As folhas expostas à quitosana produziram respostas muito discretas relacionadas à SAR, uma vez que não modificaram o PPO e diminuíram levemente as atividades de GPX, CHI e GLU em 12-72 HAP (Figura 4). Da mesma forma que o *Trichoderma*, foi observado um aumento muito baixo da lignina foliar quando comparado ao Ctrl- (Figura 5). No entanto, a suspensão de quitosana foi capaz de reduzir significativamente ($P < 0,05$) a viabilidade dos esporângios e a atividade dos zoósporos, mas apenas na dose de 3,6 mL/L (Figura 1). Segundo Malerba e Cerrana (2016), a quitosana aparece como um biopolímero “natural, seguro e barato” reconvertido a partir da quitina e evidenciado principalmente em exoesqueleto de artrópodes e fungos verdadeiros. A quitina bruta é embebida em NaOH 40-50% (p/v) para remover os grupos acetil da N-acetil-D-glucosamina em β -1,4-D-glucosamina. A quitosana é conhecida como a segunda fonte de carbono depois da biomassa lignocelulósica (Kurita, 2006). Foi relatado que, embora a quitosana hidrolisada e menos acetilada tenha melhores efeitos para a inibição direta do crescimento do patógeno, aquelas hidrolisadas e parcialmente acetiladas são adequadas para desencadear SAR para proteger as plantas contra patógenos (Xu et al., 2007; Falcón et al., 2007). Portanto, foi sugerido aqui que a quitosana utilizada em sua forma comercial (3,6 mL/L) pode ser menos acetilada e degradada (cadeias de tamanho curto), uma vez que atuou como inibidor da viabilidade dos esporângios, neste estudo (Figura 1).

No Brasil, o fosfito de potássio tem sido utilizado para proteção de vinhedos contra o míldio, como parte dos esforços mundiais de substituição dos fungicidas de cobre (Pereira et al., 2012; Cabús et al., 2017). Em condições de casa de vegetação, as plântulas tratadas com fosfito de potássio e *Bacillus amyloliquefaciens* puderam reduzir significativamente ($P < 0,05$) a área sob o progresso do míldio (AACPD), com percentual de proteção atingindo 49,6 e 44,7%, respectivamente (Figura 3). Foi evidenciada inibição da viabilidade dos esporângios e da atividade dos zoósporos por ambas as substâncias, mas apenas com *B. amyloliquefaciens* 2,5 g/L (Figura 1). Tais inibições podem não esclarecer parcialmente como o *Bacillus* poderia reduzir os AACPD, uma

vez que não demonstrou respostas claras nas enzimas SAR, em termos de RI. Realmente, as folhas de plantas tratadas com *Bacillus* não mostraram incrementos de novo de lignina (Figura 5) e apresentaram ligeiros aumentos nas atividades de PPO, apesar de respostas pronunciadas de CHI em 12-72 HAP (Figura 4). No entanto, CHI parece desempenhar um papel menor em microrganismos celulósicos, como discutido acima.

Em relação ao fosfito, foi relatado que a substância pode ativar respostas SAR com aumentos nas atividades da proteína PR relacionadas à proteção de videiras 'Merlot' contra o míldio (Cavalcanti et al., 2014).

Como controle positivo, plantas pulverizadas com BTH mostraram uma proteção relativamente baixa e inesperada (34%, Figura 3), mesmo sendo capazes de ativar SAR, conforme respostas aumentadas de PPO, CHI e GLU (Figura 4) e pronunciada (embora não significativa, $P > 0,05$) síntese **de novo** de lignina (Figura 5). Surpreendentemente, os tratamentos com BTH também evidenciaram um papel discreto na inibição da viabilidade dos esporângios e da atividade dos zoósporos (Figuras 1 e 2). Apesar disso, nunca foram evidenciadas proteções contra o míldio que ultrapassassem 46% nas parcelas tratadas com BTH, em relação a outros ensaios experimentais (Cavalcanti et al., 2011; Walters et al., 2013; Delaunois et al., 2014).

Considerações finais

O controle alternativo do míldio visando à redução do cobre ou outros agrotóxicos deve passar pela indução de respostas celulares de defesa da planta (por exemplo, lignificação), mas sem abrir mão da inibição direta sobre as estruturas do patógeno. As proteções baseadas nessas duas forças acabarão por conferir atrasos significativos no progresso do míldio da videira.

Uma substância comercial à base de aminoácidos e polifenóis poderia impor um mecanismo de defesa muito eficiente, que pareceu ir além da inibição direta do patógeno associada à ativação da RI local. Em plântulas tratadas com BS, um mecanismo foi capaz de diminuir a produção líquida de inóculo secundário, causando um forte comprometimento nas relações patógeno-hospedeiro do míldio (Figura 2). De fato, foi evidenciado um relativo alto nível

Indução de resistência não deve ser o único mecanismo de defesa associado a um controle biológico eficiente para o míldio da videira **25**

de proteção (68%), contudo não diferente ($P > 0,05$) daqueles revelados pelas mudas protegidas com a mistura de Bordeaux (CB1010) (Figura 3).

No entanto, mais estudos e esclarecimentos são necessários para investigar quais outros mecanismos poderiam levar a uma redução significativa na produção de inóculo secundário, a fim de entender como os produtos orgânicos poderiam alcançar melhores desempenhos para proteger os vinhedos contra o míldio e outras doenças, em níveis potencialmente competitivos alcançados por veículos de controle químico.

Referências

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. Burlington, MA: Elsevier Academic Press, 2005. V. 5.

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

AMPESE, L. C.; LOBATO, A. C.; 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, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2017. p. 56. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/162552/1/Anais-15IC-2017-56.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2020.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, May 1976. DOI 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

CABÚS, A.; PELLINI, M.; ZANZOTTI, R.; DEVIGILI, L.; MAINE, R.; GIOVANNINI, O.; MATTEDI, L.; MESCALCHIN, E. Efficacy of reduced copper dosages against *Plasmopara viticola* in organic agriculture. **Crop Protection**, v. 96, p. 103-108, May 2017. DOI 10.1016/j.cropro.2017.02.002.

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.; LIMA, J. P. M. S.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. Activities of antioxidant enzymes and photosynthetic responses in tomato pre-treated by plant activators and inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 68, n. 4-6, p. 198-208, April/June 2006. DOI 10.1016/j.pmp.2006.11.001.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; CARVALHO, C. P. S.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. An aqueous suspension of *Crinipellis perniciosa* mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, v. 27, n. 5, p. 729-738, May 2007. DOI 10.1016/j.cropro.2006.06.012.

CAVALCANTI, F. R.; BUFFON, V.; SILVA, G. A. da; CZERMAINSKI, A. B. C.. Unbalance between peroxidase and polyphenol oxidase activities during an elicitor-induced lignification

in grapevine 'Merlot'. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 44., 2011, Bento Gonçalves. **Anais...** Tropical Plant Pathology, v. 36, p. 502, 2011.

CAVALCANTI, F. R.; PEREIRA, V. F.; RIBEIRO JUNIOR, P. M. **Aspectos da indução de resistência em plantas de videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 88). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/106017/1/Documentos-88.pdf>. Acesso em: 17 dez. 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). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/215459/1/CIRCULAR-TECNICA-149-PUBLICA-229-BIOLOGICOS-versao-2020-08-19.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2020.

CZERMAINSKI, A. B. C. **Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de avaliação de doenças de plantas**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 34, n. 9, p. 1545-1555, 1999. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/AI-SEDE/16480/1/pab97_443.pdf. Acesso em: 17 dez. 2020.

DAGOSTIN, S.; SCHARER, H.-J.; PERTOT, I.; TAMM, L. Are there alternatives to copper for controlling grapevine downy mildew in organic viticulture. **Crop Protection**, v. 30, n. 7, p. 776-788, June 2011. DOI 10.1016/j.cropro.2011.02.031 .

DELAUNOIS, B.; FARACE, G.; JEANDET, P.; CLÉMENT, C.; BAILLIEU, F.; DOREY, S.; CORDELIER, S. Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 21, n.7, p. 4837-4846, April 2014. DOI 10.1007/s11356-013-1841-4.

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, n. 3, p. 33-42, 2018. DOI 10.1007/s42161-018-0007-0.

FALCÓN, A. B.; CABRERA, J. C.; COSTALES, D.; RAMÍREZ, M. A.; CABRERA, G.; TOLEDO, V.; MARTINEZ-TELLES, M. A. The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 103–112, Dec 2007. DOI 10.1007/s11274-007-9445-0.

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 <https://www.jstor.org/stable/26458675>.

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

GUPTA, P.; RAVI, I.; SHARMA, V. Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. **Journal of Plant Interactions**, v.8 n. 2, p. 155-161, 2013. DOI 10.1080/17429145.2012.679705.

Indução de resistência não deve ser o único mecanismo de defesa associado a um controle biológico eficiente para o míldio da videira 27

HENRY, G.; THONART, P.; ONGENA, M. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 16, n. 2, p. 257-268, 2012.

KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 203–226, May/June 2006. DOI 10.1007/s10126-005-0097-5.

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

MALERBA, M.; CERANA, R. Chitosan effects on plant systems. *International Journal of Molecular Science*, v. 17, n. 7, p. 996, 1-15, June 2016. DOI 10.3390/ijms17070996.

MENDGEN, K.; HAHN, M.; DEISING, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 367-386, Sept. 1996. DOI 10.1146/annurev.phyto.34.1.367.

MICHEL, A.M.; CAVALCANTI, F. R. **Agentes de controle biológico aplicados no substrato promovem proteção equivalente à pulverização de copa contra o míldio, em casa de vegetação**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2020. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica 154). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1127883/1/CirTec-154-2020.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2021.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (Brasil). Instrução Normativa nº 17, de 18 de junho de 2014. Estabelecer o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção. **Diário Oficial da União**, seção 1, n. 116, p. 32, 20 jun. 2014.

MONTIES, B. Lignins. In: DEY, P. M., HARBORNE, J. B. (Eds.). **Methods in Plant Biochemistry**. New York, USA: Academic Press, 1989. V. 1, p. 113–158.

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

PEREIRA, V. F.; RESENDE, M. L. V. de; RIBEIRO JUNIOR, P.M.; REGINA, M. de A.; MOTA, R. V. da; VITORINO, L. R. R. Fosfito de potássio no controle do míldio da videira e características físico-químicas de uvas Merlot. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 11, p. 1581-1588, nov. 2012.

PINTO, K. M. S.; NASCIMENTO, L. C. do; GOMES, E. C. de S.; SILVA, H. F. da MIRANDA, J. dos R. Efficiency of resistance elicitors in the management of grapevine downy mildew *Plasmopara viticola*: epidemiological, biochemical and economic aspects. *European Journal Plant Pathology*, v. 134, p. 745-754, Sept.2012. DOI 10.1007/s10658-012-0050-1.

POPKO, M.; MICHALAK, I.; WILK, R.; GRAMZA, M.; CHOKNACKA, K.; GORÉCKI, H. Effect of the new plant growth biostimulants based on amino acids on yield and grain quality of winter wheat. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 470, 1-15, 2018. DOI 10.3390/molecules23020470.

ROMANAZZI, G.; MANCINI, V.; FELIZIANI, E.; SERVILI, A.; ENDESHAW, S.; NERI, D. Impact of alternative fungicides on grape downy mildew control and vine growth and development. **Plant Disease**, v. 100, n. 4, p. 739-748, Feb. 2016. DOI 10.1094/PDIS-05-15-0564-RE.

SCHAFER JUNIOR, A.; MELO, G. W. de; CÉSARO, A. de. Influência do excesso de cobre em dois tipos de solo sobre o porta-erxerto Paulsen 1103 em casa de vegetação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 10.; SEMINÁRIOS CYTED: INFLUÊNCIA DA TECNOLOGIA VITÍCOLA E VINÍCOLA NA COR DOS VINHOS, 1., 2003, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p. 175. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 40). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/63448/1/Anais-XCBVE.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2020.

SELIM, M. **Elicitation of grapevine defense responses against *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew.** 2013. 246p. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) - Justus Liebig University Giessen, Faculdade de Ciências Naturais.

XU, J.; ZHAO, X.; HAN, X.; DU, Y. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 87, n. 3, p. 220-228, 2007. DOI [stpb.2006.07.013](https://doi.org/10.1016/j.stpb.2006.07.013).

YIN, X.; LIU, R-Q.; SU, H.; GUO, Y-R.; WANG, Z-J.; DU, W.; LI, M-J.; ZHANG, X.; WANG, Y-J.; LIU, G-T.; XU, Y. Pathogen development and host responses to *Plasmopara viticola* in resistant and susceptible grapevines: an ultrastructural study. **Horticulture Research**, v. 4, p. 17033, Aug. 2017. DOI [0.1038/hortres.2017.33](https://doi.org/10.1038/hortres.2017.33).

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 5, p. 1263-1280, Feb. 2013. DOI [10.1093/jxb/ert026](https://doi.org/10.1093/jxb/ert026).

WERNER, S.; STEINER, U.; BECHER, R.; KORTEKAMP, A.; ZYPRIAN, E.; DEISING, H. B. Chitin synthesis during in planta growth and asexual propagation of the cellulosic oomycete and obligate biotrophic grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, n. 2, p. 169-173, March 2002. DOI [10.1111/j.1574-6968.2002.tb11077.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11077.x).

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 (2021)



Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente

Adeliano Cargnin

Secretário-Executivo

Edgardo Aquiles Prado Perez

Membros

João Henrique Ribeiro Figueredo, Jorge

Tonietto, Klecius Ellera Gomes, Luciana

Mendonça Prado, Nubia Poliana Vargas

Gerhardt, Rochelle Martins Alvorcem, Viviane

Maria Zanella Bello Fialho

Supervisão editorial

Klecius Ellera Gomes

Revisão de texto

Edgardo Aquiles Prado Perez

Normalização bibliográfica

Rochelle Martins Alvorcem CRB10/1810

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração Eletrônica

Cristiane Turchet e

Edgardo Aquiles Prado Perez

Foto da capa

Fábio Rossi Cavalcanti