



**ESTRATÉGIAS DE MANEJO PARA PROTEÇÃO DE RAMOS FERIDOS
DE VIDEIRA 'NIÁGARA ROSADA' À AÇÃO DO FUNGO
*Neofusicoccum parvum***

NATHALIE OTOYA MARTINEZ

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

**Estratégias de manejo para proteção de ramos feridos de videira ‘Niágara Rosada’ à
ação do fungo *Neofusicoccum parvum***

Nathalie Otoyá Martínez

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios,
para obtenção do título de Mestre em Sanidade,
Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e
Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Dr. Luis Garrigós Leite

Co-orientador: Dr. César Júnior Bueno

São Paulo

2019

Eu **Nathalie Otoy Martinez**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: Nathalie Otoy Martinez Data / /

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Otoy-Martinez, Nathalie.

Estratégias de manejo para proteção de ramos feridos de videira 'Niágara Rosada' à ação do fungo *Neofusicoccum parvum*. / Nathalie Otoy Martinez.

- São Paulo, 2019.

42 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2019D.NM012

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Luís Garrigós Leite.

Versão do título para o inglês: Management strategies for pruning wounds protection of 'Niágara Rosada' grapevine branches against the fungus *Neofusicoccum parvum*.

1. *Trichoderma* 2. *Photorhabdus* 3. *Xenorhabdus* 4. Morte descendente 5. *Vitis vinifera* I. Otoy-Martinez, Nathalie II. Leite, Luís Garrigós III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2019/012

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Nathalie Otoy Martinez

Título: Estratégias de manejo para proteção de ramos feridos de videira ‘Niágara Rosada’ à ação do fungo *Neofusicoccum parvum*

Orientador: Dr. Luis Garrigós Leite

Co-orientador: Dr. César Júnior Bueno

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovada em: 28/ 05/ 2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luis Garrigós Leite

Instituição: Instituto Biológico/CAPSA

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dra. Margarida Fumiko Ito

Instituição: Instituto Agronômico de Campinas (IAC) –

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Instituição: Instituto Biológico/CAPSA

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Luis Garrigós Leite** (IB/CAPSA) pelo apoio, confiança, orientação e ensinamentos desde o estágio.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. César Júnior Bueno** (IB/CAPSA) pelos ensinamentos e guia nas técnicas de fitopatologia, e principalmente pela dedicação, disponibilidade e apoio no desenvolvimento de todas as etapas do trabalho.

À **Dra. Julie Chacon Orozco**, que esteve presente em todas as etapas deste trabalho, pelos ensinamentos sobre bactérias simbiontes de nematoides entomopatogênicos, pela amizade incondicional, e por ser a minha inspiração como profissional.

Ao **Instituto Biológico** e aos docentes do programa de Pós-graduação pela oportunidade e ensinamentos.

Agradeço à **CAPES** pelo apoio financeiro.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Harakava** (IB – São Paulo) pela ajuda e auxílio nos testes moleculares.

Ao **Prof. Dr. Carlos Padovani** (UNESP – Botucatu SP) pela ajuda na análise estatística do experimento *in vivo*.

Aos meus colegas e amigos do **Laboratório de Controle Biológico** (IB/CAPSA), especialmente Érika, Lizandra e Julie, pela ajuda nos experimentos.

Aos meus amigos **Rafaelly, Julie, Fernando, Sarita, Fabiana, Érika, Harielly, Vinícius** e **Aline** pelo carinho, companhia, risadas, comidas, aventuras, e apoio incondicional. Vocês me fizeram sentir sempre abraçada e se tornaram a minha família no Brasil.

A minha **família** pelo apoio em todos os momentos da minha vida pessoal e acadêmica.

À minha mãe **Neyla Martinez Renals**, a quem dedico em especial este trabalho, por ter sido sempre a minha inspiração, melhor amiga e exemplo de vida e resiliência. Por cada conselho, ensinamento, incentivo e amor incondicional, inclusive na distância.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

OTOYA-MARTINEZ, Nathalie. **Estratégias de manejo para proteção de ramos feridos de videira ‘Niágara Rosada’ à ação do fungo *Neofusicoccum parvum***. 2019. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 2019.

Neofusicoccum parvum é um dos agentes causais da morte descendente em videira, provocando o declínio da planta como resultado da colonização vascular dos. Sua transmissão ocorre através das feridas causadas nas podas anuais dos ramos, ou na enxertia. Atualmente, não se faz nenhum tipo de proteção nas feridas de poda para controlar a doença, principalmente no estado de São Paulo. Este estudo teve por objetivo avaliar diferentes métodos de proteção das feridas de poda, em ramos de videira contra a ação do fungo *N. parvum*. Para isso, o patógeno *N. parvum* foi isolado e identificado morfológica e molecularmente e foi realizado o teste de patogenicidade, em ramos verdes de videira ‘Niágara Rosada’, para completar os postulados de Koch. Posteriormente, foi selecionado um isolado de *Trichoderma* para controlar *N. parvum*, através do teste de pareamento de culturas, *in vitro*. Paralelamente, foi selecionado um isolado de bactéria simbiote de nematoide entomopatogênico (NEP), mediante um teste de inibição *in vitro*, incorporando os metabólitos, nas concentrações de 10 e 33% v/v em meio BDA, para controlar *N. parvum*. Após, foi verificado *in vivo* a eficiência do isolado de *Trichoderma* selecionado; do produto comercial à base de *Trichoderma* (Quality®), do fungicida tebuconazole diluído em tinta látex; da tinta látex; de metabólitos secundários (MS) de bactéria simbiote de NEP, veiculados em Goma Xantana 4% e de Goma Xantana 4%, na proteção de feridas em ramos verdes de videira ‘Niágara Rosada’, depois inoculados com o fungo *N. parvum*. O patógeno isolado apresentou características morfológicas e moleculares da espécie *Neofusicoccum parvum*. Além disso, o isolado se mostrou patogênico aos ramos inoculados, com uma porcentagem de incidência de 92,5%. Todos os isolados de *Trichoderma* avaliados apresentaram potencial antagônico a *N. parvum*, aos 14 dias, destacando-se o isolado *T. asperellum* IB 01/13, que atingiu uma nota de antagonismo de 1,5 já na avaliação aos 7 dias. Os MS dos isolados de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* avaliados, especialmente do gênero *Xenorhabdus*, foram eficazes na inibição do crescimento micelial de *N. parvum* (inibição com valores acima de 70%), destacando-se os MS do isolado *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 11, com 33% v/v, que inibiu 90,88% *in vitro*, o crescimento micelial de *N. parvum*. O ensaio *in vivo* demonstrou a eficácia dos tratamentos *T. asperellum* IB 01/13, *T. asperellum* Quality®,

tebuconazole, tinta látex e MS de *X. szentirmaii* PAM 11 a 33% v/v na proteção de ramos feridos de videira à ação do fungo *N. parvum*. Concluiu-se que os agentes de biocontrole *T. asperellum* IB 01/13, os MS de *X. szentirmaii* PAM 11 e o produto Quality[®] têm potencial para serem utilizados, como métodos de proteção de ferida de ramos de videira, contra a infecção do patógeno *N. parvum*.

Palavras-chave: controle biológico, *Trichoderma*, *Photorhabdus*, *Xenorhabdus*, declínio, morte descendente, *Vitis vinifera*.

ABSTRACT

OTOYA-MARTINEZ, Nathalie. **Management strategies for pruning wounds protection of ‘Niágara Rosada’ grapevine branches against the fungus *Neofusicoccum parvum***. 2019. Dissertation (Master in Health, Food Safety and Environmental Agrobusiness) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 2019.

Neofusicoccum parvum is one of the causal agents of Botryosphaeria dieback disease in grapevine, causing the decline of the plant due to vascular colonization. It is transmitted through wounds in the annual pruning of the branches, or in the grafting. Currently, no one does any protection in pruning wounds to control dieback disease in São Paulo’s state. The aim of this study was to evaluate different methods of pruning wounds protection, in grapevine branches against the fungus *N. parvum*. Firstly, *N. parvum* was isolated, and it was made molecular and morphological identification, also the pathogenicity test was performed on ‘Niágara Rosada’ grapevine green branches, to complete the Koch postulates. After that, a strain of *Trichoderma* was selected to control *N. parvum* through the culture pairing test *in vitro*. In parallel, a symbiotic bacteria of entomopathogenic nematode (EPN) strain was selected through *in vitro* inhibition test by incorporating the metabolites at 10 and 33% v/v in PDA medium for the control of *N. parvum*. Finally, the efficiency of: the selected *Trichoderma* strain, the commercial product based on *Trichoderma* (Quality®), the fungicide tebuconazole diluted in latex paint, latex paint, secondary metabolites (SM) of EPN symbiotic bacteria with 4% xanthan gum and 4% xanthan gum, was verified *in vivo* to protect wounds of ‘Niágara Rosada’ grapevine green branches which were then inoculated with *N. parvum*. The isolated pathogen showed morphological and molecular characteristics of *N. parvum*. In addition, the strain was pathogenic to the inoculated branches, with a 92,5% incidence rate. All the *Trichoderma* strains were antagonistic to *N. parvum*, at 14 days, specially the strain *T. asperellum* IB 01/13 which reached an antagonistic score of 1,5 in the evaluation at 7 days. The SM of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* strains, specially the genus *Xenorhabdus*, were effective in mycelial growth inhibition of *N. parvum* (inhibition rates above 70%), specially the SM of the *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 11 strain with 33% v/v which inhibited *in vitro* the mycelial growth of *N. parvum* by 90,88%. The *in vivo* assay demonstrated the efficacy of the treatments: *T. asperellum* IB 01/13, *T. asperellum* (Quality®), tebuconazole, latex paint and SM of *X. szentirmaii* PAM 11 33% v/v in the protection of wounded grapevine branches against *N. parvum*. It was concluded that the biocontrol agents *T. asperellum* IB 01/13, SM of *X. szentirmaii* PAM 11 and

the product Quality® have the potential to be used as methods of pruning wounds protection of grapevine against *N. parvum* infection.

Key words: biological control, *Trichoderma*, *Photorhabdus*, *Xenorhabdus*, decline, dieback, *Vitis vinifera*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A) Corte transversal de caule de videira ‘Niágara Rosada’ apresentando o sintoma em forma de “V”, da doença morte descendente, em estado de desenvolvimento avançado. Fonte: Laboratório de Fitopatologia. (B) Picnídios de *Neofusicoccum parvum* produzidos na superfície de um ramo de videira. Fonte: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/879547/1/CTE91.pdf>..... 13
- Figura 2.** Segmento do ramo de 7 cm, contido numa placa de Petri de vidro com dois lâminas de vidro, sobre dois discos de papel de filtro umedecidos com água destilada. Detalhe de uma parcela experimental do teste de patogenicidade de *Neofusicoccum parvum*, em ramo de videira ‘Niágara Rosada’. A seta indica o extremo de inoculação. 16
- Figura 3.** Teste de pareamento de culturas em meio BDA, contendo um disco de micélio de *Neofusicoccum parvum* (esquerda) e um disco de micélio de *Trichoderma* sp. (direita). 18
- Figura 4.** Escala de notas segundo Bell, Wells e Markham (1982) para avaliar o nível do antagonismo dos isolados de *Trichoderma* sobre *Neofusicoccum parvum* de videira. Sendo 1 se o antagonista cresce por toda a placa de Petri, 2 se o antagonista cresce sobre 3/4 da placa, 3 se o antagonista e patógeno crescem até a metade da placa, 4 se o patógeno cresce sobre 3/4 da placa e 5 se o patógeno cresce por toda a placa de Petri. 18
- Figura 5.** Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança, mostrando a relação entre o isolado de *Neofusicoccum parvum*, obtido no presente estudo, com espécies de *Neofusicoccum* depositadas no GenBank-NCBI. As sequências utilizadas foram: (A) *Internal Transcribed Spacer* (ITS) e (B) β -tubulina (BT). Número de acesso das sequencias no GenBank consta entre parêntese e ao lado do nome dos isolados. Os valores de “bootstrap” para 1.000 repetições estão indicados junto aos ramos da árvore. 24
- Figura 6.** Teste de Patogenicidade de *Neofusicoccum parvum* em ramo de videira ‘Niágara Rosada’ (A) Após 21 dias da inoculação, com presença de micélio e picnídios. (B) Picnídios em acículas de pinheiro. (C) Esporos. 25
- Figura 7.** Porcentagem de inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Neofusicoccum parvum* em meio BDA com filtrados das bactérias *Xenorhabdus* (X) e *Photorhabdus* (P), a 10 e 33% v/v. ¹As letras representam as comparações entre os isolados bacterianos através do teste de Tukey com 1% de probabilidade. CV(%) = 5,72. Os dados referem-se as médias de dois ensaios. 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de uvas no Brasil, em toneladas (t).	5
Tabela 2 - Área plantada de uva no Brasil, em hectares.....	5
Tabela 3 - Isolados de <i>Trichoderma</i> obtidos da coleção Micoteca “Mário Barreto Figueiredo” utilizados neste estudo	17
Tabela 4 - Códigos e procedência dos isolados de nematoides entomopatogênicos (NEPs) e suas bactérias simbiontes.....	19
Tabela 5 – Medianas das notas para determinar o nível de antagonismo, <i>in vitro</i> , de <i>Trichoderma</i> spp. ao patógeno <i>Neofusicoccum parvum</i>	26
Tabela 6 - Tratamentos preventivos em ramos verdes da videira ‘Niágara Rosada’ à ação do fungo <i>Neofusicoccum parvum</i>	!Error! Marcador no definido.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Geral.....	3
2.2. Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Viticultura	4
3.2. Doença morte descendente em videira	6
3.3. Medidas de controle da doença morte descendente da videira.....	8
3.3.1. Controle químico da morte descendente da videira	8
3.3.2. Controle Biológico da morte descendente da videira.....	8
3.4. <i>Trichoderma</i> spp. no controle da morte descendente da videira	9
3.5. Bactérias simbiotes dos nematoides entomopatogênicos	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Isolamento do patógeno <i>Neofusicoccum parvum</i> da videira	13
4.2. Confirmação da identidade ao nível de espécie, do isolado de <i>Neofusicoccum parvum</i> , por testes moleculares.....	14
4.3. Patogenicidade do isolado de <i>Neofusicoccum parvum</i> em videira ‘Niágara Rosada’	15
4.4. Teste de pareamento de culturas <i>in vitro</i> de diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> contra <i>Neofusicoccum parvum</i>	17
4.5. Inibição do crescimento de <i>Neofusicoccum parvum</i> , em meio BDA com metabólitos secundários de diferentes isolados de bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos	19
4.6. Aplicação de <i>Trichoderma asperellum</i> IB 01/13, metabólitos de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 11, Quality®, tebuconazole e tinta látex, em ramos de videira ‘Niágara Rosada’ visando a inibição do crescimento de <i>Neofusicoccum parvum</i>	20
4.6.1. Preparo de <i>Trichoderma asperellum</i> IB 01/13	20
4.6.2. Preparo de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 11 em Goma Xantana	21
4.6.3. Preparo do <i>T. asperellum</i> Quality®	21
4.6.4. Preparo do fungicida tebuconazole.....	21
4.6.5. Preparo do inóculo de <i>Neofusicoccum parvum</i>	22
4.6.6. Aplicação dos tratamentos e avaliação	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23

5.1. Isolamento e confirmação da identidade ao nível de espécie do isolado de <i>Neofusicoccum parvum</i> por testes moleculares	23
5.2. Patogenicidade do isolado de <i>Neofusicoccum parvum</i> em videira ‘Niágara Rosada’ 25	
5.3. Teste de pareamento de culturas <i>in vitro</i> de diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> contra <i>Neofusicoccum parvum</i>	25
5.4. Inibição do crescimento de <i>Neofusicoccum parvum</i> , em meio BDA com metabólitos secundários de diferentes isolados de bactérias simbiontes de NEPs.....	27
5.5. Aplicação de <i>Trichoderma asperellum</i> IB 01/13, metabólitos de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 11, Quality®, tebuconazole e tinta látex, em ramos de videira ‘Niágara Rosada’ visando a inibição do crescimento de <i>Neofusicoccum parvum</i>	29
6. CONCLUSÕES.....	33
7. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

A viticultura brasileira está num momento de transformação e evolução, adquirindo cada vez mais importância para a sustentabilidade da pequena propriedade. É relevante no desenvolvimento de algumas regiões produtoras de uvas uma vez que gera empregos (MELLO, 2015). No Brasil, o cultivo de videira é voltado para produção de sucos, fermentados (vinho) e derivados, consumo *in natura*, uva passa, e turismo rural (CONDE et al., 2007; SOUZA et al., 2010; BACK et al., 2013).

Em área de 75.481 ha, a produção brasileira de uva é destinada principalmente para o mercado interno, sendo que cerca de 60% da colheita é vendida localmente, enquanto 40% restante é exportada. Os principais mercados para exportação são Europa, América do Norte, Oriente Médio e Ásia. Como a temporada atinge a maior produção na segunda metade do ano, há produtores em áreas subtropicais sem repouso hibernal definido (PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2014), comprometidos com a realização de duas colheitas por ano, o que pode gerar um aumento futuro na área plantada com videira (AGRIMUNDO, 2016).

Apesar da relevância, a cultura da videira no Brasil ainda enfrenta diversos problemas, com destaque para a incidência de doenças fúngicas (SÔNEGO et al., 2005). Dentre essas, vêm merecendo especial atenção doenças do tronco, como a morte ou podridão-descendente causada por fungos como *Lasiodiplodia theobromae* e *Neofusicoccum parvum*, pertencentes à família Botryosphaeriaceae (PHILLIPS et al., 2013), sendo que este último foi reportado como uma das espécies mais virulentas (ARMENGOL et al., 2013). A incidência desta doença vem aumentando em função da negligência de algumas medidas de manejo, principalmente a não proteção dos locais feridos após as práticas de enxerto ou poda, e a não eliminação do material de poda infectado (ÚRBEZ-TORRES, 2011).

O controle eficaz da morte descendente deve ser baseado em medidas que evitem a predisposição da planta aos patógenos, ou que desfavoreçam a multiplicação dos fungos na área de cultivo (BATISTA et al., 2010). Pitt, Savocchia e Wunderlich (2012) sugeriram como estratégias de manejo, a adoção de medidas que interrompam o ciclo da doença e permitam a recuperação das plantas afetadas até alcançarem o estado de plena produção. A interrupção da doença pode ocorrer pela aplicação de fungicidas químicos ou de agentes de controle biológico que impeçam novas infecções, ou pela remoção das fontes de inóculo. A recuperação de plantas afetadas pode ser alcançada pela poda dos ramos infectados 10 cm abaixo dos sintomas vasculares visíveis. Assim, para o controle de fungos da família Botryosphaeriaceae,

recomenda-se o uso combinado do controle químico, biológico e práticas culturais (ÚRBEZ-TORRES, 2011).

Com relação ao controle químico efetuado pela aplicação de fungicidas nas feridas de poda (PITT; SAVOCCHIA; WUNDERLICH, 2012), já foi comprovada a sensibilidade *in vitro* do fungo a princípios ativos como benomyl, tebuconazole, iprodiona e myclobutanil (LATORRE et al., 2013; TORRES et al., 2013). Observando-se que o fungicida benomyl foi retirado do mercado, devido à proibição de seu uso.

Dentre os agentes de controle biológico de doenças fúngicas destacam-se as espécies do gênero *Trichoderma*, que estão entre as mais conhecidas e empregadas mundialmente, podendo controlar diversos fitopatógenos, tanto de solo quanto da parte aérea (KEXIANG et al., 2002; CHEN et al., 2003). Podem ser usadas para tratar ferimentos na planta, com bons resultados de proteção, pois podem ser tolerantes a diversos fungicidas, herbicidas, inseticidas e fitohormônios (SARKAR; NARAYANAN; DIVAKARAN, 2010; AKINBODE; IKOTUN, 2011; TAPWAL et al., 2012).

O uso de bactérias vem sendo menos estudado, mas merece ser melhor explorado devido à descoberta de diversas espécies com potencial para o controle de fungos. Haidar e colaboradores (2016) demonstraram que a bactéria *Pantoea agglomerans* pode inibir a necrose causada por *N. parvum* no talo de videira. Da mesma forma as bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos, *Photorhabdus* spp. e *Xenorhabdus* spp. têm sido estudadas pela sua capacidade da inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos (CHEN; DUNPHY; WEBSTER, 1994; NG; WEBSTER, 1997; LEGUÍZAMO et al., 2014) através da produção de metabólitos secundários como antimicrobianos, toxinas e exoenzimas (LEWIS et al., 2006; BODE, 2009). Contudo, não há relatos da inibição de crescimento do fungo *N. parvum*.

Segundo Sônego e colaboradores (2005), para qualquer que seja o produto aplicado, químico ou biológico, a proteção contra os fungos associados à doença morte descendente deve durar pelo menos 20 dias após a poda, pois a planta apresenta a maior suscetibilidade aos patógenos nas primeiras duas semanas após a poda, ocorrendo total cicatrização após 4 semanas.

No Brasil, o controle biológico tem sido pouco estudado como medida de controle de *N. parvum*, merecendo especial atenção devido aos benefícios que proporciona, principalmente ambiental, toxicológico e social. No estado de São Paulo, as feridas de poda das videiras não recebem nenhum tipo de proteção e, conseqüentemente, os ramos da videira ‘Niágara Rosada’ têm apresentado alta incidência da doença morte descendente. Sendo assim, pesquisas que envolvam controle biológico desta doença devem ser realizadas, complementando ou

substituindo os produtos químicos, no intuito de alcançar diferentes formas de manejo dessa importante doença em videira.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar diferentes métodos de proteção das feridas de poda em ramos de videira contra a ação do fungo *Neofusicoccum parvum*.

2.2. Específicos

- Isolar e identificar o agente causal da morte descendente de videira, *Neofusicoccum parvum*;
- Selecionar um isolado de *Trichoderma* da coleção Micoteca ‘Mario Barreto Figueiredo’ (MMBF) do Instituto Biológico de São Paulo, para o controle de *N. parvum*, por meio do teste de pareamento de culturas *in vitro*;
- Selecionar um isolado de bactéria simbiote de nematoide entomopatogênico (NEP), da Coleção de Bactérias Entomopatogênicas do laboratório ULR do Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisas em Proteção de Plantas e Saúde Animal do Instituto Biológico (CAPSA), para o controle de *N. parvum* através do teste de inibição *in vitro*;
- Avaliar a eficiência, *in vivo*, do isolado do fungo *Trichoderma* IB01/13 e *T. asperellum* Quality[®], dos metabólitos secundários de bactéria simbiote de NEPs *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 11 e do fungicida tebuconazole, na proteção de ramos feridos de videira ‘Niágara Rosada’ contra a ação do fungo *N. parvum*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Viticultura

A videira, *Vitis* spp. L., pertencente à família Vitaceae (POMMER, 2003), é uma das frutíferas mais cultivadas no mundo, com uma produção de aproximadamente 75 milhões de toneladas por ano (OIV, 2017). Dentre as várias espécies de videira, as que apresentam grande importância econômica na agricultura são *Vitis labrusca*, de origem americana e *Vitis vinifera*, de origem europeia. A primeira, denominada também de uva rústica, é mais resistente quanto à suscetibilidade às doenças e a segunda, também conhecida como uva fina, é altamente sensível às doenças fúngicas e conseqüentemente muito exigente em tratamentos culturais. Além disso, é responsável por 90% dos vinhos fabricados no mundo. Ambas espécies são utilizadas tanto na produção de vinho, quanto para consumo “in natura” (LEÃO, 2004; GIOVANNINI, 1999).

A China é o maior produtor de uva do mundo com uma produção de 13.160.788 toneladas (t) em 2017, seguido da Itália, Estados Unidos, França e a Espanha. O Brasil encontra-se no 12º lugar (FAO, 2019), com uma produção de 1.912.034 t de uva, com área plantada de 75.774 hectares (ha) em 2017. A maior parte da produção concentra-se nos estados do Rio Grande do Sul, representando 62,77% do total de área plantada com videiras no País, e que em 2018 chegou a uma produção de 822.689 t com área plantada de 47.383 ha, recuperando-se da queda de produção, gerada pelos câmbios climáticos ocorridos em 2016; seguido dos estados de Pernambuco com 423.382 t e 8.976 ha, e São Paulo com 128.327 t e 7.233 ha (Tabelas 1 e 2) (IBGE, 2019; Mello, 2018).

Recentemente, no Brasil, a viticultura tem se desenvolvido em regiões mais quentes, como o Nordeste, concentrada principalmente nos sertões dos estados da Bahia e de Pernambuco. O Nordeste contribuiu com uma produção de 501.833 t de uva, em uma área plantada de 11.291 ha no ano de 2018 (Tabelas 1 e 2) (IBGE, 2019). Nesta região, a cultura da videira é desenvolvida através da viticultura tropical irrigada, que vem ganhando cada vez mais importância e a produção é voltada tanto para uvas de mesa, quanto para vinhos (DA SILVA; CORREIA, 2004).

Tabela 1 - Produção de uvas no Brasil, em toneladas (t).

Estado/Ano	2015	2016	2017	2018
Rondônia	197	201	187	187
Piauí	168	240	240	51
Ceará	940	760	708	422
Paraíba	2.196	2.636	2.620	2600
Pernambuco	237.367	242.967	621.170	423.382
Bahia	77.408	77.322	56.504	75.378
Minas Gerais	12.615	11.224	13.685	15.763
Espírito Santo	2.327	2.509	3.468	3.090
Rio de Janeiro	101	258	302	170
São Paulo	142.631	140.613	133.261	128.327
Paraná	69.035	52.749	53.345	54.000
Santa Catarina	69.118	33.267	65.196	61.256
Rio Grande do Sul	876.215	413.735	956.887	822.689
Mato Grosso do Sul	105	97	78	72
Mato Grosso	981	1.351	1.002	1.297
Goiás	4.008	3.729	1.650	2.121
Distrito Federal	1.890	1.386	1.700	1.425
Brasil	1.497.302	985.074	1.912.034	1.592.242

Fonte: IBGE (2019)

Tabela 2 - Área plantada de uva no Brasil, em hectares.

Estado/Ano	2015	2016	2017	2018
Rondônia	27	27	25	25
Piauí	7	10	10	8
Ceará	38	36	36	23
Paraíba	122	132	132	130
Pernambuco	6.814	6.974	8.437	8.976
Bahia	2.861	2.858	1.961	2.154
Minas Gerais	856	830	895	1.212
Espírito Santo	148	154	196	250
Rio de Janeiro	7	16	17	22
São Paulo	7.803	7.699	7.348	7.233
Paraná	4.465	4.212	3.664	3.600
Santa Catarina	4.846	4.737	4.426	4.257
Rio Grande do Sul	49.739	49.226	48.397	47.383
Mato Grosso do Sul	13	8	8	8
Mato Grosso	51	56	50	53
Goiás	150	146	71	89
Distrito Federal	79	63	68	57
Brasil	78.026	77.187	75.774	75.481

Fonte: IBGE (2019)

A viticultura no estado de São Paulo, com uma produção de 128.327 t e área plantada de 7.233 ha em 2018, é voltada para o cultivo de uvas comuns de mesa, predominando a variedade ‘Niágara Rosada’, uma das mais cultivadas para consumo *in natura* no País (SOUSA, 1996; QUEIROZ-VOLTAN et al., 2011). Essa uva é resultado de uma mutação somática ocorrida na uva Niágara Branca (*Vitis labrusca* L. x *Vitis vinifera* L.) em 1933, em Louveira, São Paulo, prevalecendo sobre a forma original (SOUSA, 1996). A produção dessa variedade de uva está concentrada nas regiões leste e sudoeste do estado, abarcando os municípios de Jundiaí, Vinhedo, Louveira, Indaiatuba, Sorocaba, Porto Feliz e São Miguel do Arcanjo e também em Jales, região norte do estado (IBGE, 2019).

A enxertia é o principal método de desenvolvimento do cultivo da videira e consiste na união de parte do ramo da copa (enxerto) a uma planta de porta-enxerto enraizado e é determinada pela compatibilidade ou afinidade entre o porta-enxerto e o enxerto, que apresentam a predisposição de permanecerem juntos. Os porta-enxertos (cavalo) não têm valor comercial, pois produzem cachos com bagas pequenas, ou não produzem frutos; porém são vigorosos e com sistema radicular resistente às pragas e doenças, e situações adversas do solo, e transmitem o seu vigor e resistência às variedades que serão enxertadas (copas) (LEÃO, 2004; REGLA; MONTEIRO, 2013).

As podas anuais são realizadas quando a temperatura do ar diminui e são necessárias em regiões tropicais onde as temperaturas mínimas raramente baixam dos 10°C, objetivando controlar os ciclos vegetativos da videira. As podas da videira podem ser madura, que é realizada quando os ramos já estão lignificados, ou poda verde, que consiste em todas as operações de retirada de partes verdes da planta (MAIA, 2003).

3.2. Doença morte descendente em videira

A morte descendente ou podridão-descendente da videira é uma doença fúngica que ocorre na parte aérea da planta e vai descendo pelo sistema vascular em direção às raízes. Os seus agentes causais são *Botryosphaeria* spp. (Anamorfos: *Neofusicoccum* spp. e *Lasiodiplodia theobromae*) ou *Eutypa lata* (Anamorfo: *Libertella blepharis*) (BERTSCH et al., 2013; BRUEZ et al., 2013). *Neofusicoccum parvum* (Teleomorfo: *Botryosphaeria parva*) tem demonstrado ser um agente muito virulento na planta (LAUVEAU et al., 2009; ÚRBEZ-TORRES; GUBLER, 2009) e em videira está associado com a necrose externa da madeira.

Esta doença pode causar o declínio da planta como resultado da colonização vascular e/ou da produção de toxinas e os seus sintomas são: retardamento da brotação na primavera, encurtamento dos entrenós, deformação e descoloração dos ramos, folhas menores do que o normal, deformadas e cloróticas com pequenas necroses nas margens, podendo murchar e cair; redução drástica do vigor, super-brotamento, seca de ramos e morte da planta. Esses danos podem causar uma redução drástica da produtividade, pela frutificação irregular e a diminuição do número de bagas produzidas nas plantas. Além dos sintomas descritos, a morte descendente causa o apodrecimento interno dos ramos e do tronco, que pode ser observado como áreas necrosadas em forma de “V” no tecido vascular, em corte transversal (GARRIDO; GAVA, 2014).

A infecção inicia-se pelos picniósporos, formados nos picnídios, que são a estrutura reprodutiva do fungo e localizam-se na superfície dos ramos. Os esporos são liberados na primavera, disseminados pela chuva e vento e transportados até as superfícies recém podadas ou enxertadas, por onde ocorre a penetração. A germinação ocorre dentro dos vasos, a 2 mm ou mais da superfície ferida, onde o micélio prolifera-se lentamente (GARRIDO; GAVA, 2014).

A suscetibilidade dos tecidos feridos é alta nas duas primeiras semanas após a poda, enquanto a planta realiza o processo de cicatrização. A doença desenvolve-se lentamente e nenhum sintoma é observado no primeiro e segundo ciclo de crescimento após a infecção. Após o terceiro ou quarto ciclo, ou seja, de 2 a 4 anos após a infecção, podem ocorrer cancos e podem passar vários anos até os ramos e o tronco apodrecerem (GARRIDO; GAVA, 2014).

Os peritécios e picnídios nos restos culturais do vinhedo são a principal fonte de inóculo desse patógeno. O diagnóstico pode ser feito através do isolamento dos agentes causais, *Eutypa lata* ou *Botryosphaeria* spp., pois os sintomas são indistinguíveis e o diagnóstico visual é insuficiente, ou seja, não é possível diferenciar qual é o patógeno segundo os sintomas observados. Os fungos podem ter micélio branco e cirros alaranjados, no caso de *E. lata*, ou micélio escuro e cirros de coloração amarelada, no caso de *Botryosphaeria* spp. (GARRIDO; GAVA, 2014). Os esporos de *Botryosphaeria* spp. dependem da espécie. Os picniosporos de *N. parvum* (teleomorfo: *B. parva*) são elipsoidais a fusóides, asseptados, hialinos e frequentemente com um apículo em cada extremidade (PHILLIPS et al., 2013). Já os esporos de *E. lata* são produzidos em peritécios (VAN NIEKERK et al., 2010) e caracterizam-se por serem cilíndricos, curvados e subhialinos, mas em massa aparecem de cor castanha dourada (MUNKVOLD, 2001).

3.3. Medidas de controle da doença morte descendente da videira

Quanto mais rápida a cicatrização dos ferimentos em ramos de videira, menor é o risco de infecção, pois a doença morte descendente ocorre pelo corte da poda, ou outros ferimentos. A suscetibilidade diminui cerca de 2 a 4 semanas após a poda e os ferimentos de um mês são resistentes à entrada de patógenos. O declínio agrava-se quando a videira está em estresse de qualquer natureza (SÔNEGO et al., 2005).

Para o manejo dessa doença recomenda-se, como medidas de controle cultural, a utilização de material sadio, retirar e destruir o material podado, evitar realizar as podas durante períodos chuvosos, desinfestar as ferramentas de poda, eliminar os esporões que não brotaram e podar as plantas infectadas bem abaixo dos cancrios ou da área necrosada, até encontrar tecido sadio (SÔNEGO et al., 2005).

3.3.1. Controle químico da morte descendente da videira

A indústria química não tem desenvolvido um produto eficaz contra esta infecção na videira (HAIDAR et al., 2016), porém, para o manejo de doenças de videira em geral, recomenda-se a proteção dos ferimentos com fungicida orgânico, ou com pasta bordalesa e a pulverização das plantas, durante o período de repouso e estresse hídrico, com os produtos indicados, ou com calda bordalesa (SÔNEGO et al., 2005).

Até o ano de 2001, o controle químico era realizado com arsênico sódico, porém este princípio ativo foi proibido na Europa, devido a sua toxicidade para o meio ambiente e para os seres humanos (HAIDAR et al., 2016). Torres e colaboradores (2013) fizeram a avaliação, *in vitro*, de fungicidas inibidores da demetilação, comumente usados em videira na esporulação e no crescimento micelial de várias espécies de *Diplodia* e de *Neofusicoccum* e observaram que os princípios ativos tebuconazole e myclobutanil, os que já são registrados no manejo de outros patógenos de videira, como *Erysiphe necator* e *Botrytis cinérea*, inibiam em 90% o crescimento micelial dos patógenos de videira avaliados, dentre eles *N. parvum*, a concentrações de 0,3 a 1,1 mg/L e 0,4 a 2,2 mg/L, respectivamente.

3.3.2. Controle Biológico da morte descendente da videira

O controle biológico caracteriza-se pela redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, pelo uso de um ou mais organismos. Pode ocorrer naturalmente ou através da manipulação do ambiente ou do

hospedeiro, ou pela introdução em massa de um ou mais organismos antagonistas (COOK; BAKER, 1983), ou seja, resulta da interação entre o patógeno, o hospedeiro e o antagonista (BETTIOL, 1991).

O papel dos agentes biocontroladores vem se tornando cada vez mais crucial para a agricultura, em alguns casos complementando ou substituindo os agroquímicos (TEMPLETON; HEINY, 1989; WHIPPS; LUMSDEN, 2001). Dentre os vários microrganismos com papel antagonista, destacam-se os fungos, devido à facilidade de identificação e de crescimento em meios artificiais (COPPING; MENN, 2000).

Existem poucos estudos referentes ao manejo da morte descendente. Haidar e colaboradores (2016) avaliaram o efeito antagonista de 46 linhagens bacterianas contra *Botrytis cinerea* e *N. parvum* de videira e observaram que *Bacillus ginsengihumi* reduziu a podridão causada por *B. cinerea* nas feridas e nos discos foliares, e que a necrose causada por *N. parvum* no talo foi inibida pela bactéria *Pantoea agglomerans*. Entretanto, esses mesmos autores reportaram que, mesmo com os estudos desenvolvidos com bactérias como biocontroladoras de *N. parvum*, ainda não existe produto comercial no mercado. Por conseguinte, não existem alternativas de controle biológico para essa doença.

Em outro estudo, Daraignes e colaboradores (2018) demonstraram que *Pythium oligandrum*, um oomycete habitante da rizosfera da videira conhecido pela sua habilidade de controlar microrganismos fitopatogênicos, tem potencial para o controle dos patógenos de videira *N. parvum* e *Phaemoniella chlamydospora*, pois a necrose causada em plantas de videira diminuiu 62,4% e 39,5%, respectivamente, após um ano de inoculação. Os mesmos autores, ao compararem a capacidade inibitória das bactérias *P. agglomerans* e *Bacillus pumilus* com *P. oligandrum*, verificaram que *P. oligandrum* é mais eficaz para o controle de *N. parvum*, pois a inibição foi menor que 40%.

3.4. *Trichoderma* spp. no controle da morte descendente da videira

O gênero *Trichoderma* (Anamorfo: *Hypocrea*), pertence ao filo Ascomycota (AGRIOS, 1997), sendo um fungo filamentosso ubíquo com capacidade de colonizar material celulósico e de usar praticamente todos os tipos de solos ricos em matéria orgânica, como substrato, o que torna seu isolamento fácil. Pode ter hábito saprófito ou micoparásita (ROIGER; JEFERS; CALDWELL, 1991; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010), tanto para patógenos de parte aérea,

quanto para fungos fitopatogênicos habitantes do solo, que são os mais difíceis de serem controlados devido à produção de estruturas de resistência, que lhes permitem sobreviver no solo por longos períodos.

Os mecanismos de parasitismo podem ser indiretos, como produção de metabólitos antifúngicos e competição por espaço e nutrientes; ou direto, como o micoparasitismo (LARANJEIRA et al., 1996; AIT-LAHSEN et al., 2001).

O fungo *Trichoderma* é um dos agentes de controle biológico mais conhecidos e empregados mundialmente no controle de doenças fúngicas e a sua ação depende principalmente de fatores abióticos, como temperatura (20 a 30°C) e quantidade de matéria orgânica do solo (HARMAN, 1991). O uso de *Trichoderma* spp. pode trazer benefícios para a planta, tais como a promoção do crescimento vegetal, mediante o aumento da disponibilidade de nutrientes e o auxílio na produção de hormônios de crescimento (LARANJEIRA et al., 1996; AIT-LAHSEN et al., 2001).

As vantagens da utilização de *Trichoderma* spp. no manejo de fungos fitopatogênicos são a facilidade de obtenção de linhagens a partir do solo, de plantas e de madeira em decomposição, o rápido crescimento com abundante esporulação, e a capacidade de colonização de diversos tipos de substratos (INCH et al., 2011; MELO, 1996).

Trichoderma spp. tem se mostrado bastante eficientes no controle de fungos fitopatogênicos, como *Armillaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Verticillium* sp., *Endothia* sp., *Phytophthora* sp., *Rhizopus* sp., *Diaporthe* sp., *Fusicladium* sp., *Botrytis* sp., *Poria monticola*, dentre outros (MELO, 1998). Há relatos de proteção de feridas de poda de árvores contra a ação de fungos e da capacidade de penetrar no interior da madeira, protegendo as plantas (HARVEY; HUNT, 2006).

No Brasil, e especialmente no estado de São Paulo, são aplicados produtos com *Trichoderma*, como princípio ativo, para o controle de doenças comuns na cultura da videira, como oídio e fusariose, através de pulverização (TAVARES, 2004), porém não há relatos da sua utilização na proteção de feridas de poda de ramos.

3.5. Bactérias simbiotas dos nematoides entomopatogênicos

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) pertencentes às famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae são parasitas obrigatórios de uma ampla variedade de espécies de insetos praga, especialmente pragas que habitam no solo durante alguma etapa do seu ciclo de vida. Atualmente, os NEPs estão recebendo especial atenção como importantes agentes de controle biológico (LORTKIPANIDZE et al., 2016). Os NEPs têm associação simbiótica com uma bactéria, causadora da morte do inseto hospedeiro. O gênero *Heterorhabditis* tem simbiose com bactérias do gênero *Photorhabdus* e o gênero *Steinernema* com *Xenorhabdus*; ambas bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae (BODE, 2009).

Sendo parasitas obrigatórios de insetos, os NEPs desenvolvem todo o seu ciclo de vida dentro do inseto hospedeiro, embora tenha o estágio juvenil, que apresenta a capacidade de sobreviver fora do inseto hospedeiro, denominado de Juvenil Infetante (JI). Os JIs são juvenis de terceiro estágio, muitas vezes ainda envolvidos pela cutícula do estágio anterior; fecham a cavidade bucal e o ânus, e saem do hospedeiro ao esgotar o alimento, na procura de um novo inseto do solo. Neste estágio, levam, no seu interior, células da bactéria simbiote, formando assim o complexo Nematóide-Bactéria. Na associação, os nematoides oferecem proteção à bactéria fora do corpo do inseto, e a bactéria, por sua vez, disponibiliza os nutrientes para os nematoides (ALVES, 1998).

O JI tem a capacidade de localizar o inseto hospedeiro, mediante a detecção de diversos produtos de excreção como o dióxido de carbono (CO₂). Uma vez o nematóide tenha ingressado no sistema digestivo do inseto, penetra no hemocele por ação mecânica e libera as bactérias simbiotas (GARCIA, 2005). No caso do gênero *Heterorhabditis*, as bactérias são regurgitadas (CICHE; ENSIGN, 2003), e no caso de *Steinernema*, são defecadas (WOUTS, 1991).

As bactérias, dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, são bacilos gram-negativos, providas de flagelos e anaeróbicas facultativas. Não apresentam estágios resistentes sob condições naturais, sendo encontradas somente nos JIs, ou nos corpos de insetos parasitados (ALVES, 1998). Uma vez liberadas, multiplicam-se rapidamente no interior do hospedeiro e colonizam mediante a produção de uma ampla gama de metabolitos secundários como antibióticos, exoenzimas e toxinas, causando assim a morte do inseto hospedeiro, em aproximadamente 48 horas. Ao mesmo tempo, promovem o crescimento e reprodução dos NEPs, pois disponibilizam os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento (LEWIS et al., 2006).

Segundo Bode (2009), durante o ciclo de vida, as bactérias simbiontes além de causar a morte do inseto hospedeiro, mediante a secreção de toxinas, também devem competir por alimento com outros microrganismos saprófitos do solo, da microbiota do intestino, ou da cutícula dos nematoides. Para isso, as bactérias produzem uma grande variedade de antimicrobianos, tais como xenocoumarinas, xenorhabdinas, bacteriocinas, dentre outros, capazes de inibir o crescimento de possíveis competidores, como outras bactérias, fungos filamentosos, leveduras e outros nematoides (KOPPENHÖFER, 2007).

Existem relatos da atividade antifúngica de *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp. frente a fungos fitopatogênicos como *Fusarium* spp. (LEGUÍZAMO et al., 2014), *Botrytis cinerea*, *Ceratocystis ulmi*, *C. dryocoetidis*, *Mucor pyriformis*, *Trichoderma pseudokingii*, *Pythium coloratum*, *P. ultimum* (CHEN; DUNPHY; WEBSTER, 1994) e *Phytophthora infestans* (NG; WEBSTER, 1997).

Shapiro-Ilan, Bock e Hotchkiss (2014) avaliaram a capacidade inibitória de *Photorhabdus luminescens* e *Xenorhabdus bovienii* e os seus filtrados nos fungos patógenos de noz-pecã, *Phytophthora cactorum* e *Fusicladium effusum*, e de pêssago *Armillaria tabescens*, e evidenciaram que as duas culturas bacterianas em meio líquido inibiram o crescimento somente de *P. cactorum*. Porém, ao testar os filtrados, metabólitos secundários (MS), *P. luminescens* inibiu o desenvolvimento dos três fungos avaliados e *X. bovienii* só inibiu o crescimento de *P. cactorum* e o de *F. effusum*.

Em outro estudo, Hazir e colaboradores (2017) avaliaram a eficácia *in vitro* das interações de fungicidas combinados com ácido transcinâmico (TCA), um metabólito antifúngico produzido por *P. luminescens*, e com MS de *X. szentirmaii*, contra os fitopatógenos *Monilinia fructicola*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium oxysporum*, e encontraram que o TCA e os MS de *X. szentirmaii* podem atuar como sinergistas para melhorar a eficácia de fungicidas como Abound® (Azoxystrobin), Serenade® (*Bacillus subtilis*), Elast® (dodine), Regalia® (Extrato de *Reynoutria sachalinensis*), Prophyt® (fosfito de potássio) e PropiMax® (propiconazole).

Ainda não existe nenhum relato do potencial das bactérias simbiontes de NEPs para o controle do fungo *N. parvum* e proteção das feridas de poda de plantas de videira contra a ação de fungos de tronco, como o agente causal da morte descendente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no laboratório ULR do Controle Biológico e no laboratório de Fitopatologia, ambos localizados no Centro Avançado de Pesquisas em Proteção Plantas e Saúde Animal (CAPSA), Instituto Biológico, Campinas, São Paulo.

4.1. Isolamento do patógeno *Neofusicoccum parvum* da videira

O isolamento do fungo *N. parvum* foi realizado a partir de caules e ramos de videira, da variedade ‘Niágara Rosada’ apresentando os sintomas característicos causados pelo fungo, provenientes do município de Louveira, São Paulo.

Os principais sintomas considerados foram o apodrecimento interno dos ramos e do tronco observado em forma de “V”, em corte transversal, e a presença de picnídios na superfície dos ramos (Figura 1).

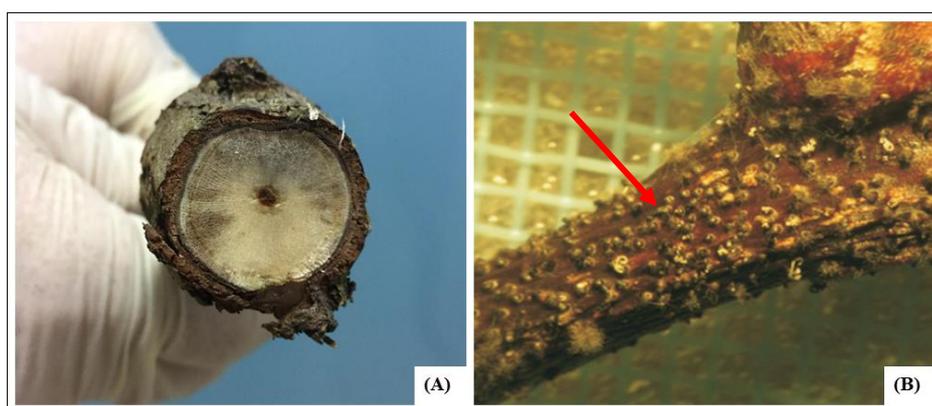


Figura 1. (A) Corte transversal de caule de videira ‘Niágara Rosada’ apresentando o sintoma em forma de “V”, da doença morte descendente, em estado de desenvolvimento avançado. Fonte: Laboratório de Fitopatologia. (B) Picnídios de *Neofusicoccum parvum* produzidos na superfície de um ramo de videira. Fonte: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/879547/1/CTE91.pdf>.

O isolamento de *N. parvum* foi realizado segundo a metodologia descrita por Van Niekerk e colaboradores (2004), com adaptações. Os segmentos de caule ou ramos, com os sintomas da doença, foram cortados em fragmentos de aproximadamente 2 cm. Em seguida, esses fragmentos foram lavados em água corrente e desinfestados superficialmente por 30 segundos em solução de álcool etílico a 70%, por 1 minuto em solução de hipoclorito de sódio a 1,5%, sendo posteriormente lavados em água destilada esterilizada e secos em papel filtro esterilizado.

Após a desinfestação, o material foi cortado em fragmentos menores (aproximadamente 2 mm) e plaqueados em placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Agar (BDA). Em cada placa foram colocados quatro fragmentos (em forma de vértices de um quadrado) e incubou-se em estufa tipo BOD, a 25°C, por 7 a 14 dias, sob fotoperíodo de 12 horas. As colônias escuras que surgiram foram repicadas para novas placas contendo meio de BDA. Após o crescimento, acículas de pinheiro autoclavadas foram colocadas sobre as colônias para induzir a produção de estruturas de reprodução, ou seja, os picnídios.

Após 30 dias de incubação, lâminas com picnídios rompidos foram preparadas para observação ao microscópio óptico da presença de picniósporos característicos de *N. parvum*. Assim, a colônia selecionada foi aquela que apresentou as características mencionadas como coloração escura, formação de picnídios, e produção de picniósporos característicos do fungo. O isolado do fungo foi cultivado em frasco contendo meio de BDA e, após seu crescimento, foi coberto com óleo mineral esterilizado e mantido a 4°C até sua utilização (BASKARATHEVAN et al., 2009).

4.2. Confirmação da identidade ao nível de espécie, do isolado de *Neofusicoccum parvum*, por testes moleculares

Para a identificação ao nível de espécie de *N. parvum*, primeiramente o fungo foi cultivado em meio de BDA a 25°C, por 14 dias, e posteriormente extraiu-se seu DNA, seguindo-se o método CTAB, descrito por Bruez e colaboradores (2014).

Foi realizada a reação em cadeia de polimerase (PCR) para a amplificação da região ITS do RNAr (*Internal Transcribed Spacer*), utilizando-se os *primers* ITS1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (REZGUI et al., 2018), e do gene que codifica a β -tubulina (BT), utilizando-se os *primers* TUB2 (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') e TUB4 (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') (SAKALIDIS; HARDY; BURGEES, 2011).

As reações foram efetuadas em termociclador PTC100 (MJ Research), conforme a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C/2 min; 40 ciclos de 94°C/30 s – 54°C/30 s – 72°C/60 s; extensão final a 72°C/4 min. Os produtos de PCR foram purificados por precipitação com polietilenoglicol, segundo protocolo descrito por Schmitz e Riesner (2006).

O sequenciamento foi realizado pelo método de terminação de cadeia, com o reagente BigDye 3.1 (Applied Biosystems), em sequenciador automático ABI3500 (Applied Biosystems) no laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo. Após o sequenciamento, foram obtidas sequências ITS e β -tubulina no GENBANK/NCBI de diferentes espécies de *Neofusicoccum* e editadas no programa BioEdit, junto com a sequência do isolado identificado no presente trabalho. Finalmente construiu-se uma árvore filogenética com essas sequências e utilizando *Diplodia seriata* como *alt group*, através do método de máxima verossimilhança, utilizando-se o programa MEGA 6.0.

4.3. Patogenicidade do isolado de *Neofusicoccum parvum* em videira ‘Niágara Rosada’

Para avaliar a patogenicidade de *N. parvum*, foram coletados ramos de plantas de videira ‘Niágara Rosada’, ainda verdes e saudáveis. Desses ramos, foram obtidos segmentos de 7 cm de comprimento cada que, posteriormente, foram desinfestados superficialmente por um minuto em solução de hipoclorito de sódio a 1,5%, lavados em água destilada esterilizada e após secos em papel de filtro. Cada repetição foi representada por um segmento do ramo, contido numa placa de Petri de vidro com dois lâminas de vidro, sobre dois discos de papel de filtro umedecidos com água destilada, sendo todo esse material esterilizado previamente (MARRASCHI, 2015).

O inóculo do isolado de *N. parvum* foi crescido em meio de cultura BDA, incubado em estufa BOD, a 25°C, durante 14 dias, com 12 horas de fotoperíodo (BESTER; CROUS; FOURIE, 2007).

Cada repetição consistiu em um segmento do ramo envolvido com algodão embebido em água destilada em uma das extremidades, com o fim de manter a umidade e a integridade do ramo. Em seguida, um disco do fungo *N. parvum* (0,7 cm de diâmetro) foi depositado na extremidade oposta, fixado com gaze umedecida em água destilada, e selado com parafilme (Figura 2). Posteriormente, os ramos foram depositados nas placas de Petri e incubados em estufa BOD, a 25°C, com 12 horas de fotoperíodo, por 21 dias. Foram estabelecidas 20 repetições com o patógeno e 20 controles sem o patógeno (MARRASCHI, 2015).



Figura 2. Segmento do ramo de 7 cm, contido numa placa de Petri de vidro com dois lâminas de vidro, sobre dois discos de papel de filtro umedecidos com água destilada. Detalhe de uma parcela experimental do teste de patogenicidade de *Neofusicoccum parvum*, em ramo de videira ‘Niágara Rosada’. A seta indica o extremo de inoculação.

Para avaliar a incidência de *N. parvum* nos ramos foram considerados quatro parâmetros: escurecimento, necrose, presença de micélio e produção de picnídios. Além disso, foi realizado o re-isolamento dos ramos de todos os tratamentos. Para tanto, retirou-se um fragmento de 2 cm da extremidade inoculada com *N. parvum*. Os 2 cm seguintes foram utilizados para isolamento indireto do fungo. Esses fragmentos foram desinfestados superficialmente e de maneira individualizada (Item 4.1). Em seguida, foram cortados fragmentos menores, de aproximadamente 5 mm, misturados e plaqueados aleatoriamente em meio de cultura BDA acrescido de antibiótico Oxitetraciclina a 0,05 g/L, colocando-se 4 fragmentos por placa de Petri. Foram preparadas quatro placas de Petri por ramo de cada tratamento. Cada placa de Petri assim preparada foi considerada como uma repetição. Essas placas de Petri foram incubadas em estufa tipo BOD, a 25°C, durante 14 dias, com 12 horas de fotoperíodo. Após crescimento de colônia característica do fungo, acículas de pinheiro foram colocadas sobre a colônia para induzir a formação de picnídios e posterior visualização dos picniósporos (AMPONSAH et al., 2008). Os dados foram expressos em porcentagem de incidência.

4.4. Teste de pareamento de culturas *in vitro* de diferentes isolados de *Trichoderma* contra *Neofusicoccum parvum*

O ensaio do antagonismo *in vitro* foi realizado de acordo com Bell, Wells e Markham (1982), Barros; Costa e Melo, (1987) e Silva (1997) utilizando-se oito isolados de *Trichoderma*, obtidos da coleção Micoteca “Mário Barreto Figueiredo” (MMBF) do Instituto Biológico de São Paulo SP (Tabela 3), e com o isolado de *Trichoderma asperellum* (Quality®), frente ao isolado de *N. parvum*.

Tabela 3 - Isolados de *Trichoderma* obtidos da coleção Micoteca “Mário Barreto Figueiredo” utilizados neste estudo

Espécie ¹	Código do IB	Código MMBF
<i>T. asperellum</i>	01/13	07/12
<i>T. asperelloides</i>	02/03	08/12
<i>T. harzianum</i>	08/07	17/12
<i>T. koningiopsis</i>	09/02	19/12
<i>T. harzianum</i>	26/10	48/12
<i>T. harzianum</i>	34/01	73/12
<i>T. harzianum</i>	46/08	93/12
<i>T. harzianum</i>	47/02	96/12
<i>T. asperellum</i>	Quality®	-

¹ Identificação molecular realizada na dissertação de Marraschi (2015).

MMBF: Micoteca “Mário Barreto Figueiredo”

IB: Instituto Biológico

Para o preparo dos inóculos de *Trichoderma* spp. e de *N. parvum*, os isolados foram cultivados em meio BDA e incubados em estufa tipo BOD a 25±1°C, por 14 dias e fotoperíodo de 12 horas, até apresentar colônias verdes, no caso de *Trichoderma* spp., ou cinza-preto, no caso de *N. parvum*, com 8,5 cm de diâmetro.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 9 tratamentos (isolados de *Trichoderma*) e 5 repetições, sendo cada repetição representada por uma placa. Em cada placa de Petri com meio de BDA foi colocado um disco de micélio de 0,5 cm do patógeno e um disco de micélio do microrganismo antagonista em lados opostos (Figura 3), com o objetivo de verificar o nível de antagonismo, através do desenvolvimento das colônias na placa. O experimento foi repetido duas vezes, integralmente.

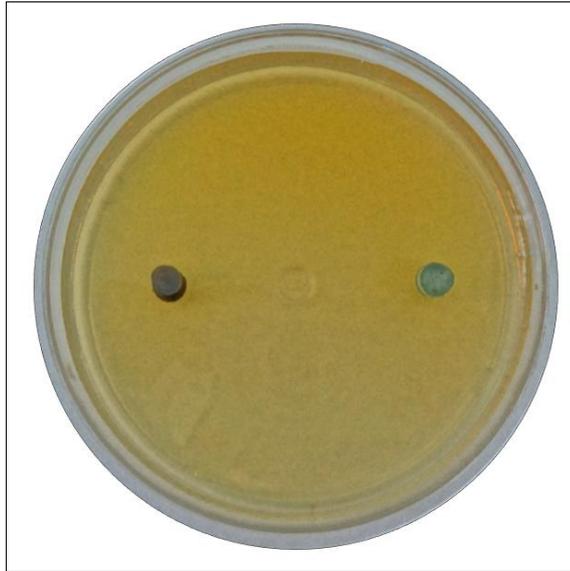


Figura 3. Teste de pareamento de culturas em meio BDA, contendo um disco de micélio de *Neofusicoccum parvum* (esquerda) e um disco de micélio de *Trichoderma* sp. (direita).

As placas foram mantidas em estufa tipo BOD, a 25°C, com 12 horas de fotoperíodo. As avaliações foram efetuadas aos 7 e aos 14 dias de incubação. Os critérios de avaliação seguiram a escala de notas proposta por Bell, Wells e Markham (1982): 1 (antagonista cresce por toda a placa de Petri), 2 (antagonista cresce sobre 3/4 da placa), 3 (antagonista e patógeno crescem até a metade da placa), 4 (patógeno cresce sobre 3/4 da placa) e 5 (patógeno cresce por toda a placa de Petri) (Figura 4).

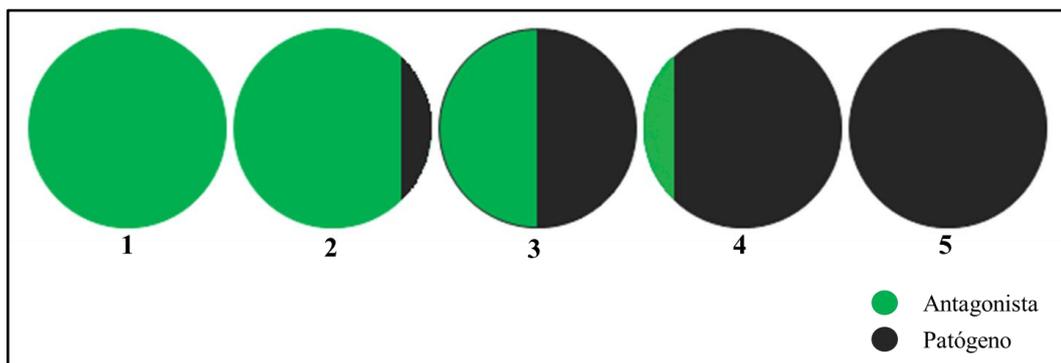


Figura 4. Escala de notas segundo Bell, Wells e Markham (1982) para avaliar o nível do antagonismo dos isolados de *Trichoderma* sobre *Neofusicoccum parvum* de videira. Sendo 1 se o antagonista cresce por toda a placa de Petri, 2 se o antagonista cresce sobre 3/4 da placa, 3 se o antagonista e patógeno crescem até a metade da placa, 4 se o patógeno cresce sobre 3/4 da placa e 5 se o patógeno cresce por toda a placa de Petri.

A análise estatística para a comparação dos isolados e das avaliações ao longo do tempo para cada isolado de *Trichoderma* foi realizada através do teste de múltiplas comparações de Dunn, com significância de 5%, pelo programa GraphPad InStat®.

4.5. Inibição do crescimento de *Neofusicoccum parvum*, em meio BDA com metabólitos secundários de diferentes isolados de bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos

Para avaliar a inibição do crescimento de *N. parvum*, em meio BDA com metabólitos secundários (MS) de bactérias simbiotes, de nematoides entomopatogênicos (NEPs), foram testados 12 isolados (Tabela 4) de bactérias simbiotes de NEPs, da Coleção de Bactérias Entomopatogênicas, do laboratório ULR do Controle Biológico, localizado no Centro Avançado de Pesquisas em Proteção Plantas e Saúde Animal, do Instituto Biológico, Campinas SP.

Tabela 4 - Códigos e procedência dos isolados de nematoides entomopatogênicos (NEPs) e suas bactérias simbiotes.

Isolado	NEP hospedeiro	Bactéria
IBCB n2	<i>Steinernema carpocapse</i>	<i>Xenorhabdus nematophila</i>
IBCB n6	<i>S. brazilense</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
PONTO 2C	<i>S. brazilense</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
IBCB n10	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
HB EN01	<i>H. bacteriophora</i>	<i>P. luminescens</i>
IBCB n47	<i>S. feltiae</i>	<i>X. bovienii</i>
PAM 11	<i>S. rarum</i>	<i>X. szentirmaii</i>
PAM 25	<i>S. rarum</i>	<i>X. szentirmaii</i>
CER 09	<i>S. puertoricense</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
CER 129	<i>S. puertoricense</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
CER 140	<i>S. puertoricense</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
CER 144	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Xenorhabdus</i> sp.

Fonte: Chacon-Orozco (2014)

O inóculo de *N. parvum* foi produzido pela repicagem do fungo em meio BDA e incubado em estufa BOD, a 25°C, durante 14 dias, com 12 horas de fotoperíodo. Quando o fungo apresentou a coloração escura característica, foram cortados discos de micélio com 0,7

cm de diâmetro (BESTER; CROUS; FOURIE, 2007), para a posterior inoculação em meio BDA acrescido de metabolitos secundários (MS).

Os MS das bactérias simbiotes foram obtidos de uma colônia em fase I em meio NBTA, multiplicada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo meio líquido Trypticase de Soja (Caseína 17 g/L, peptona de soja 3 g/L, cloreto de sódio 5 g/L, fosfato de dipotássio 2,5 g/L, dextrose 2,5 g/L) (TSB), incubados a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 6 dias, sob agitação de 150 rpm. Após esse período, a suspensão foi transferida para tubos Falcon[®] de 15 cm³ e centrifugada a 3800 rpm por 2 horas. O sobrenadante foi filtrado em filtro de celulose de 0,22 μm , para garantir a obtenção de metabolitos secundários livres de células bacterianas (HAZIR et al., 2016).

Os MS foram incorporados em meio BDA esterilizado, a 50°C , nas concentrações de 10% e 33%. Posteriormente o meio foi vertido em placas de Petri e repicado com discos de micélio de 5 mm de *N. parvum*, e incubado em estufa do tipo BOD a 25°C , no escuro, até que o fungo crescesse em toda a superfície do meio BDA sem adição de MS (HAZIR et al., 2016).

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial, 13 isolados (12 isolados bacterianos – metabolitos, *N. parvum* e controle), duas concentrações (10 e 33%) e 10 repetições. O experimento foi realizado duas vezes.

A avaliação foi realizada medindo-se o crescimento radial do fungo a cada 24 horas, e os resultados foram expressos em porcentagem de inibição micelial (HAZIR et al, 2016), em relação ao tratamento controle. Os dados do percentual de inibição micelial foram analisados estatisticamente, pelo teste de Tukey com 1% de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o Sisvar5.6[®].

4.6. Aplicação de *Trichoderma asperellum* IB 01/13, metabolitos de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 11, Quality[®], tebuconazole e tinta látex, em ramos de videira ‘Niágara Rosada’ visando a inibição do crescimento de *Neofusicoccum parvum*

4.6.1. Preparo de *Trichoderma asperellum* IB 01/13

Trichoderma asperellum IB 01/13, selecionado como o melhor organismo antagonista ao fungo *N. parvum* no item 4.4., foi produzido em arroz parboilizado, como sugere o método adaptado por Leite e colaboradores (2003). Foi utilizado um saco plástico autoclavável contendo 300 g de arroz parboilizado, previamente umedecido por 50 minutos em água

destilada. O saco foi fechado e autoclavado por 30 minutos a 1 atm, a 121°C. Após o resfriamento, o saco contendo o arroz foi inoculado com 10 mL de suspensão de esporos (1×10^6 esporos/mL) do antagonista, através de um corte de 1 cm. Posteriormente, os sacos foram fechados no local do corte, homogeneizados manualmente, e incubados em BOD, a 25°C, por 14 dias e com 12 horas de fotoperíodo (LEITE et al., 2003).

Após esse período, 1 g do conteúdo (arroz parboilizado mais esporos de *T. asperellum*) foi diluído em 9 mL de água destilada com 1% de Tween80[®], para realizar contagem de conídios em câmara de Neubauer e assim conhecer a concentração de esporos contida no saco. O restante foi triturado com 150 mL de água destilada autoclavada, num liquidificador industrial, até obter uma textura pastosa, na concentração de $7,02 \times 10^9$ esporos/mL (MARRASCHI, 2015).

4.6.2. Preparo de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 11 em Goma Xantana

Foi realizada a extração dos metabólitos secundários (MS) de *X. szentirmaii*, que apresentou a maior inibição do fungo *N. parvum*, selecionada no item 4.5. Após a filtração, o filtrado diluído a 33% foi misturado com Goma Xantana (4%), até obter consistência pastosa, para permitir a aderência da solução de metabólitos no ferimento do ramo da videira. Como controle foi utilizada Goma Xantana (4%) misturada com água destilada esterilizada.

4.6.3. Preparo do *T. asperellum* Quality[®]

Foi utilizado também o bioproduto Quality[®] (WG), que é um fungicida microbiológico composto por *Trichoderma asperellum* isolado SF 04, na concentração mínima de $1,0 \times 10^{10}$ UF/g.

Inicialmente, foi ajustada a concentração da suspensão de esporos, para padronizar com o isolado *T. asperellum* 01/13. Em seguida, 30 g de meio arroz parboilizado preparado como no item 4.6.1, foi triturado com 15 mL da suspensão de esporos ($4,6 \times 10^9$ esporos/mL – 3 g de produto diluídos em 15 mL de água) até obter uma mistura pastosa, com a finalidade de manter a aderência.

4.6.4. Preparo do fungicida tebuconazole

Foi utilizado o fungicida Folicur[®] (tebuconazole), que inibiu o crescimento *in vitro* de *N. parvum*, patógeno de videira (TORRES et al., 2013). O fungicida foi diluído em tinta látex para garantir sua aderência à ferida no ramo, sendo utilizada a concentração indicada pelo

fornecedor (1 mL /1 L de tinta) (DÍAZ; LATORRE, 2013). Também foi avaliada somente a tinta látex.

4.6.5. Preparo do inóculo de *Neofusicoccum parvum*

O inóculo do isolado de *N. parvum* foi repicado em meio de cultura BDA e incubado em estufa BOD, a 25°C, durante 14 dias, com 12 horas de fotoperíodo. Após, foram cortados discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro (BESTER; CROUS; FOURIE, 2007).

4.6.6. Aplicação dos tratamentos e avaliação

Os tratamentos preventivos foram aplicados em ramos verdes (7 cm de comprimento) de plantas adultas e sadias de videira ‘Niágara Rosada’, de acordo com o descrito no item 4.3 (Figura 2). Foram estabelecidas 6 repetições por tratamento. Como controles foram utilizados água destilada, goma xantana e tinta látex.

Os tratamentos em pasta (*X. szentirmaii* mais goma xantana, goma xantana, *T. asperellum* IB 01/13 (pasta de arroz) e *T. asperellum* - Quality® (pasta de arroz)) foram aplicados com o auxílio de uma espátula, enquanto que os tratamentos líquidos (Fungicida + tinta látex, tinta látex e água destilada) foram aplicados pela imersão do extremo dos ramos nos líquidos. A outra extremidade do ramo desinfestado (Item 4.1) foi envolvida com algodão estéril embebido em água destilada autoclavada, para manter o ramo vivo. Os ramos foram incubados em estufa tipo BOD, a 25°C, por 5 dias, sob fotoperíodo de 12 horas (MARASCHI, 2015).

O ensaio foi montado em delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 7 tratamentos e 6 repetições. O experimento foi conduzido integralmente duas vezes.

Após 5 dias da aplicação preventiva dos tratamentos, quando os ramos de videira ainda se apresentavam suscetíveis à doença, um disco de micélio do fungo (0,5 cm) foi colocado em gaze estéril umedecido com água destilada esterilizada, fixado no outro extremo do ramo previamente tratado e protegido com parafilme. Em seguida, foram levados à estufa BOD, a 25°C, com fotoperíodo 12 horas (MARRASCHI, 2015).

Após 21 dias da inoculação de *N. parvum* nos ramos, um segmento de 2 cm de comprimento foi retirado de cada ramo, de cada tratamento, a partir de uma distância de 1 cm do local de inoculação do fungo. Esse segmento foi usado para avaliar a eficiência dos tratamentos, ou seja, se impediram o fungo de penetrar no tecido da planta. Os segmentos de 2 cm foram então desinfestados superficialmente, mergulhados por 1 segundo em solução de

álcool a 70%, 1 minuto em hipoclorito de sódio a 1,5%, e água destilada autoclavada, sendo então secos em papel filtro esterilizado e cortados em frações de aproximadamente 2 mm. Essas frações menores foram plaqueadas em meio BDA + Oxitetraciclina, usando-se quatro frações/placa, sendo uma placa por repetição e 4 repetições por ramo (MARRASCHI, 2015).

Para a avaliação, foi contado o número de colônias desenvolvidas a partir de cada fração menor no meio de cultura, que apresentaram cor cinza escura, e que produziram picnídios e esporos característicos de *N. parvum*, em até 3 meses após a colocação de acículas de pinheiro. Os valores foram expressos em porcentagem. A análise estatística foi desenvolvida através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado com as comparações múltiplas de Dunn, considerando o nível de 5% de significância (ZAR, 2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento e confirmação da identidade ao nível de espécie do isolado de *Neofusicoccum parvum* por testes moleculares

O patógeno isolado dos ramos e caules de videira ‘Niágara Rosada’, com os sintomas típicos de morte descendente, como apodrecimento interno observado em forma de “V”, em corte transversal, e presença de picnídios na superfície dos ramos, caracterizava-se por ter micélio de cor cinza escuro, em meio de cultivo BDA, o reverso da placa apresentava-se negro. Ocorre também formação de picnídios em acículas de pinheiro, que ao serem rompidos liberavam esporos elipsoidais, hialinos e septados, características morfológicas de *Neofusicoccum parvum* (BERTSCH et al., 2013).

Os sequenciamentos da região ITS e do gene que codifica a β -tubulina indicaram que o fungo pertence à espécie *Neofusicoccum parvum*, confirmando a identificação efetuada por meio de caracterização morfocultural (Figuras 5A y 5B).

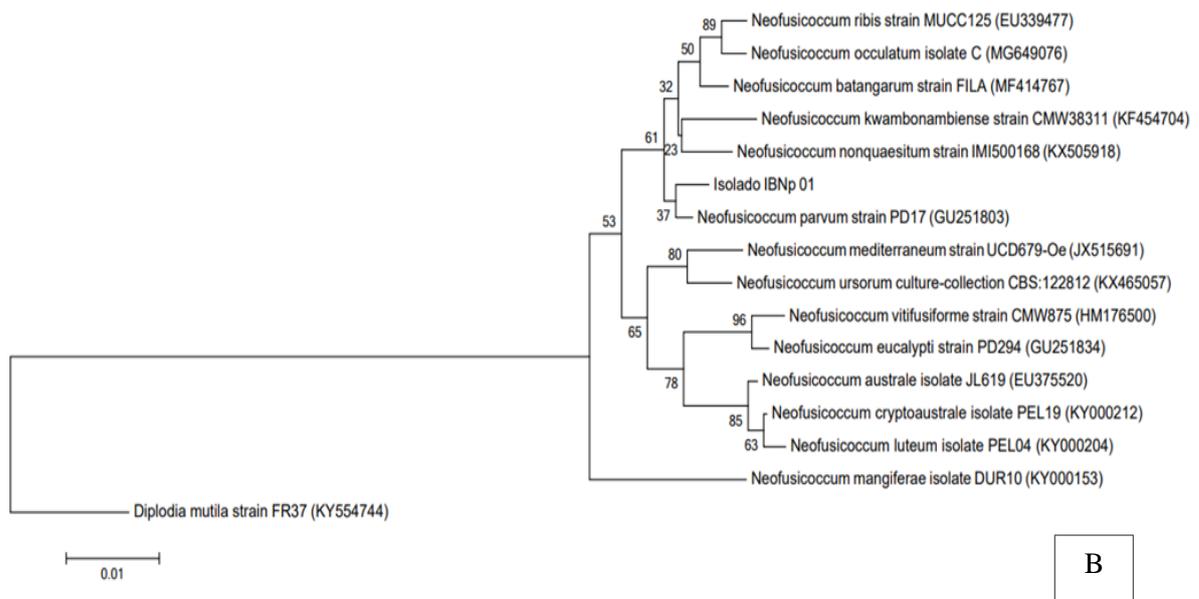
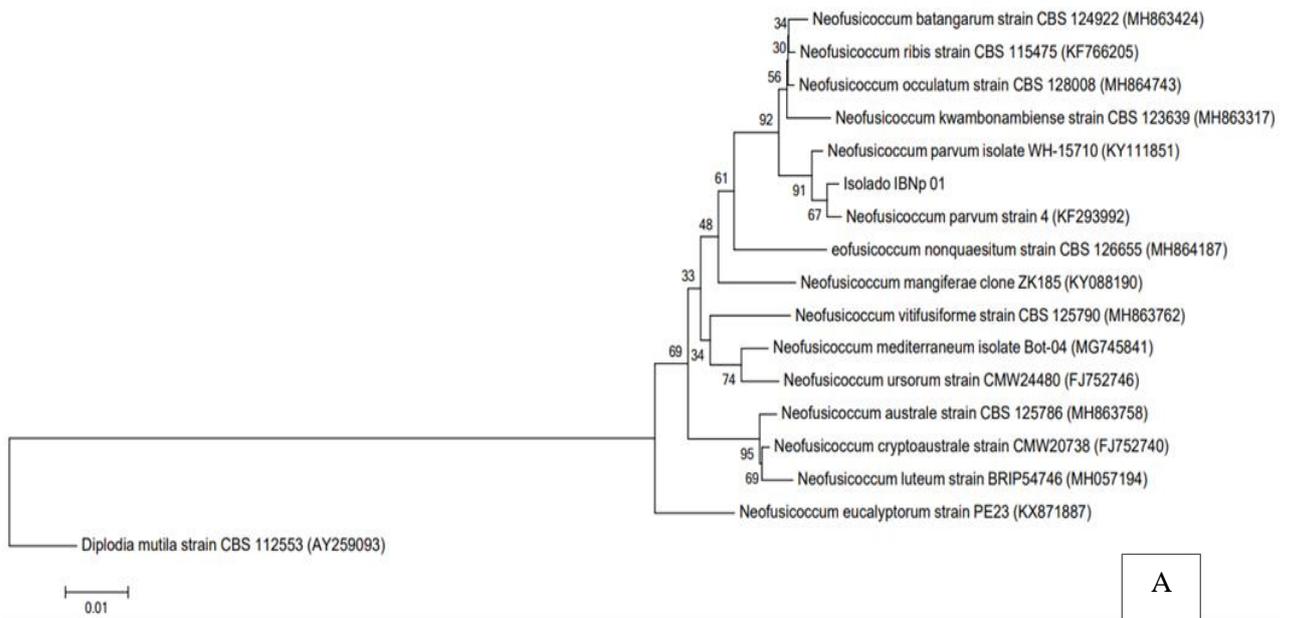


Figura 5. Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança, mostrando a relação entre o isolado de *Neofusicoccum parvum*, obtido no presente estudo, com espécies de *Neofusicoccum* depositadas no GenBank-NCBI. As sequências utilizadas foram: (A) *Internal Transcribed Spacer* (ITS) e (B) β -tubulina (BT). Número de acesso das sequencias no GenBank consta entre parêntese e ao lado do nome dos isolados. Os valores de “bootstrap” para 1.000 repetições estão indicados junto aos ramos da árvore.

5.2. Patogenicidade do isolado de *Neofusicoccum parvum* em videira ‘Niágara Rosada’

Os ramos verdes de videira inoculados com *N. parvum* apresentaram, em 92,5% dos casos, escurecimento, necrose, presença de micélio e produção de picnídios (Figura 6A). O fungo foi re-isolado a partir de fragmentos de ramos, apresentando colônias desenvolvidas em meio BDA de cor cinza escura com reverso negro e formação de picnídios em acículas de pinheiro (Figura 6B), além de esporos elipsoidais, hialinos e asseptados (Figura 6C), características morfológicas do patógeno *N. parvum*.



Figura 6. Teste de Patogenicidade de *Neofusicoccum parvum* em ramo de videira ‘Niágara Rosada’ (A) Após 21 dias da inoculação, com presença de micélio e picnídios. (B) Picnídios em acículas de pinheiro. (C) Esporos.

Nenhum fungo foi isolado dos ramos utilizados como controle, indicando que o patógeno desenvolveu-se como consequência da inoculação realizada artificialmente. Da mesma forma, Spagnolo e colaboradores (2017) inocularam *N. parvum* e *Diplodia seriata* em ramos verdes de plantas adultas de videira, conseguindo re-isolar os fungos a partir das bordas das lesões associadas à inoculação artificial. Assim, os postulados de Koch foram cumpridos e o isolado demonstrou estar ativo e ser o agente causal da doença.

5.3. Teste de pareamento de culturas *in vitro* de diferentes isolados de *Trichoderma* contra *Neofusicoccum parvum*

Após 7 dias da confrontação de *Trichoderma* spp. com *N. parvum*, a maioria dos isolados apresentaram-se antagônicos para o patógeno com uma mediana de nota de 2,0, porém o isolado *T. asperellum* IB 01/13 proporcionou uma nota de antagonismo de 1,5, enquanto *T. asperelloides* IB 02/03 e *T. harzianum* IB 26/10 apresentaram-se com menor potencial de antagonismo. Nessa avaliação, houve variabilidade de antagonismo entre os isolados.

Aos 14 dias de confrontação, não houve diferença entre os diferentes isolados testados, apresentando a nota mediana de antagonismo de 1,0 a 1,5; o que representa quase 100% de crescimento do antagonista sobre o patógeno (Tabela 5).

Nestes experimentos mereceu destaque o isolado *T. asperellum* IB 01/13 como o mais antagonístico para o fungo *N. parvum*, por ter atingido a nota mediana de antagonismo de 1,5 já com 7 dias. Esse isolado foi testado *in vivo* e comparado com *T. asperellum* do produto Quality[®], registrado para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja (LABORATÓRIO FARROUPILHA, 2019), na proteção de ramos de videira contra a ação do fungo *N. parvum*.

Apesar de serem constatados os maiores níveis de antagonismo aos 14 dias, maiores diferenças foram detectadas aos 7 dias, sugerindo ser um tempo de incubação suficiente para a seleção de isolados antagonísticos a *N. parvum* (Tabela 5).

Tabela 5 – Medianas das notas para determinar o nível de antagonismo, *in vitro*, de *Trichoderma* spp. ao patógeno *Neofusicoccum parvum*

Isolado	Avaliação	
	7 dias	14 dias
<i>T. asperellum</i> IB 01/13	1,5* (1,0 ; 3,0)** a ¹ A ²	1,0 (1,0 ; 2,0) a A
<i>T. koningiopsis</i> IB 09/02	2,0 (2,0 ; 2,0) a B	1,5 (1,0 ; 2,0) a A
<i>T. harzianum</i> IB 34/01	2,0 (2,0 ; 2,0) a B	1,0 (1,0 ; 2,0) a A
<i>T. harzianum</i> IB 08/07	2,0 (2,0 ; 2,0) a B	1,5 (1,0 ; 2,0) a A
<i>T. harzianum</i> IB 47/02	2,0 (2,0 ; 2,0) a B	1,0 (1,0 ; 2,0) a A
<i>T. harzianum</i> IB 46/08	2,0 (2,0 ; 3,0) ab B	1,0 (1,0 ; 2,0) a A
<i>T. asperellum</i> Quality [®]	3,0 (1,0 ; 3,0) ab B	1,5 (1,0 ; 3,0) a A
<i>T. harzianum</i> IB 26/10	3,0 (2,0 ; 3,0) b B	1,0 (1,0 ; 2,0) a A
<i>T. asperelloides</i> IB 02/03	3,0 (2,0 ; 3,0) b B	1,5 (1,0 ; 3,0) a A

*Mediana da nota de cada isolado (dois ensaios);

**Valores mínimo e máximo (dois ensaios);

¹Letras minúsculas iguais, na coluna, não diferem entre si segundo o teste Dunn com 5% de probabilidade;

²Letras maiúsculas iguais, na linha, não diferem entre si segundo o teste Dunn com 5% de probabilidade.

Isolados de *Trichoderma* têm apresentado antagonismo *in vitro* sobre vários fungos fitopatogênicos, como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* (ETHUR; CEMBRANEL; SILVA, 2001; CÚNDOM; MAZZA; GUTIÉRREZ, 2003), *Fusarium* sp. e *Lasiodiplodia theobromae* (COELHO et al., 2011; BUENSANTEAI; ATHINUWAT, 2012), apresentando-se

como agentes potenciais para uso como biocontroladores das doenças de plantas, incluindo o fungo *N. parvum* de videira como demonstrado no presente estudo (Tabela 5).

No estudo de Kotze e colaboradores (2011), *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* demonstraram antagonismo *in vitro* sobre vários patógenos de videira, incluindo as 4 espécies da família Botryosphaeriaceae, *Neofusicoccum australe*, *N. parvum*, *Diplodia seriata* e *L. theobromae*. Nesse estudo o fungo *T. asperellum* foi destacado como agente potencial para o controle de *N. parvum* em videira, corroborando nossos dados (Tabela 5).

No presente estudo, aos 14 dias de avaliação todos os isolados de *Trichoderma* testados apresentaram-se como bons antagonistas frente a *N. parvum* de videira, com notas medianas $\leq 2,0$ pelos critérios estabelecidos por Bell, Wells e Markham (1982) (Tabela 5).

5.4. Inibição do crescimento de *Neofusicoccum parvum*, em meio BDA com metabólitos secundários de diferentes isolados de bactérias simbiotes de NEPs

O crescimento micelial de *N. parvum* foi avaliado aos 4 dias da inoculação do fungo, quando o micélio atingiu a borda da placa com meio de cultivo sem adição de metabólitos secundários (MS) (controle). Os 12 filtrados das bactérias simbiotes apresentaram grande variação na porcentagem de inibição do crescimento micelial do patógeno. O filtrado de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 11 diluído a 33%v/v proporcionou maior porcentagem de inibição do fungo *N. parvum* (90,88%), em relação ao tratamento controle, diferindo dos demais (Figura 7). Em contraste, os filtrados de *Xenorhabdus* sp. CER 09 e *Xenorhabdus* sp. CER 140 a 10%v/v apresentaram porcentagens de inibição próximos ao controle, com 11,29% e 4,76% de inibição, respectivamente, diferindo dos demais isolados, mas não do controle (Figura 7).

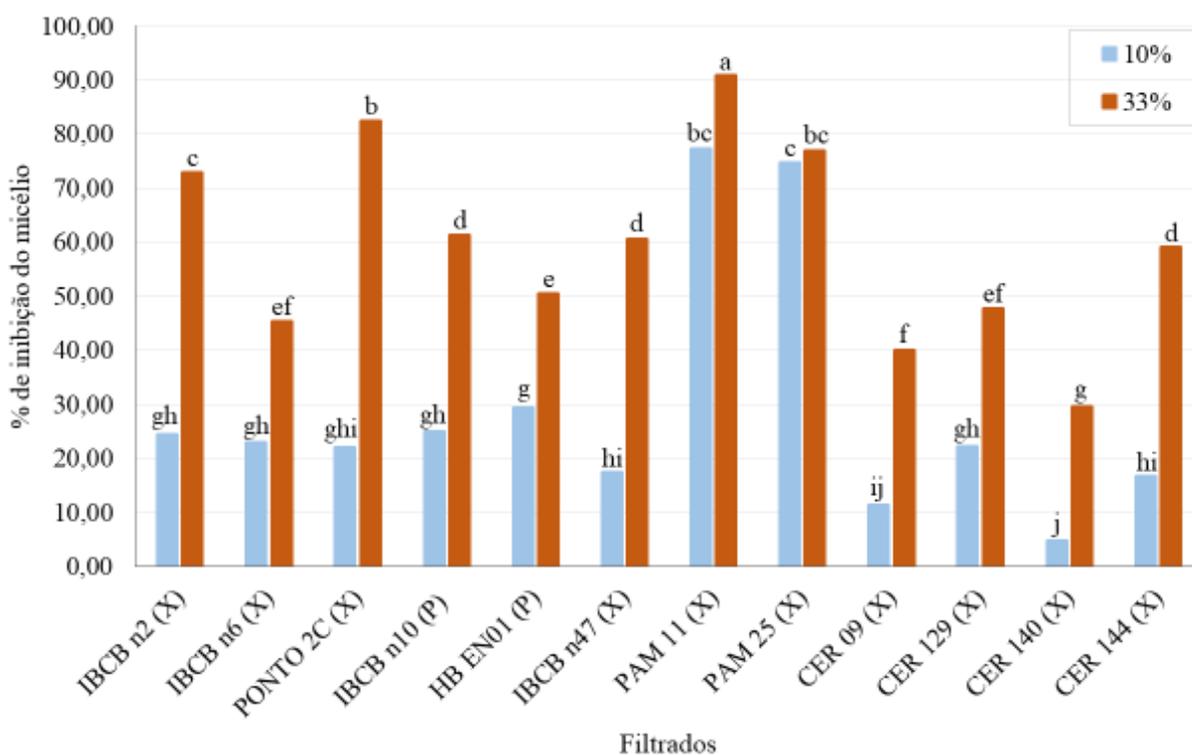


Figura 7. Porcentagem de inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Neofusicoccum parvum* em meio BDA com filtrados das bactérias *Xenorhabdus* (X) e *Photorhabdus* (P), a 10 e 33% v/v. ¹As letras representam as comparações entre os isolados bacterianos através do teste de Tukey com 1% de probabilidade. CV(%) = 5,72. Os dados referem-se às médias de dois ensaios.

Diluídos a 33%v/v, os filtrados da maioria dos isolados apresentaram porcentagens de inibição micelial de *N. parvum* superiores a 50% (Figura 7). Resultados similares foram reportados nos estudos de San-Blas, Carrillo e Parra (2012), Shapiro-Ilan, Bock e Hotchkiss (2014) e Fang e colaboradores (2014), que testaram diferentes espécies de bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* e todas demonstraram capacidade de inibir o desenvolvimento dos fungos fitopatogênicos *Moniliophthora roreri*, *Armillaria tabescens*, *Fusicladium effusum*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora capsici* e *Botrytis cinerea*, ou seja, todas produziram metabólitos secundários capazes de reduzir o crescimento fúngico.

Segundo Bode (2009), as bactérias de NEPs produzem diversos metabólitos que impedem o crescimento de outras bactérias e fungos oportunistas, incluindo derivados de estilbeno (SHI et al., 2016), ácido trans-cinâmico (TCA) (BOCK et al., 2014), xenocoumacinas (YANG et al., 2011) e enzimas hidrolíticas como as quitinases, um peptídeo que decompõe majoritariamente a quitina na parede celular dos fungos filamentosos (CHEN et al., 1996).

Metabólitos secundários produzidos por bactérias do gênero *Xenorhabdus* tem gerado altos níveis de inibição de crescimento de fungos fitopatogênicos, em relação àqueles produzidos por *Photorhabdus*, segundo relatos de Fang e colaboradores (2014); Chen e colaboradores (1996) e de Hazir e colaboradores (2016). No presente estudo, bactérias do gênero *Xenorhabdus* também apresentaram índices de inibição do fungo *N. parvum* acima de 70% (Figura 7).

Hazir e colaboradores (2016) avaliaram filtrados livres de células, obtidos de sete espécies de *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp. contra *Fusicladium carpophilum*, *F. effusum*, *Monilinia fructicola*, *Glomerella cingulata* e *Armillaria tabescens*. Os autores também verificaram maiores níveis de inibição com metabólitos de *X. szentirmaii*, em relação às outras bactérias testadas e ao controle. Segundo Bode (2009), as variações nas porcentagens de inibição devem-se às diferenças de compostos ativos produzidos pelos diferentes gêneros de bactérias.

5.5. Aplicação de *Trichoderma asperellum* IB 01/13, metabólitos de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 11, Quality[®], tebuconazole e tinta látex, em ramos de videira ‘Niágara Rosada’ visando a inibição do crescimento de *Neofusicoccum parvum*

De acordo com os dados da Tabela 6, os tratamentos preventivos com *T. asperellum* IB 01/13, *T. asperellum* Quality[®], metabólitos secundários (MS) de *X. szentirmaii* PAM 11, o fungicida tebuconazole e Tinta Látex não diferiram entre si e controlaram eficientemente de forma preventiva a infecção causada por *N. parvum* nos ramos da videira ‘Niágara Rosada’. Entretanto, Goma Xantana e o Controle (água destilada) não diferiram entre si e não impediram a entrada do fungo nos ramos verdes da videira ‘Niágara Rosada’ (Tabela 6), apresentando incidência do fungo nos fragmentos da planta plaqueados no meio de cultura.

Tabela 6 - Tratamentos preventivos em ramos verdes da videira ‘Niágara Rosada’ à ação do fungo *Neofusicoccum parvum*.

Tratamentos	Porcentagem de fragmentos com crescimento de <i>N. parvum</i>
Água destilada	100,0 ¹ (100,0; 100,0) ² c
Tinta látex	0,0 (0,0; 0,0) a
Folicur [®] (Tebuconazole)	0,0 (0,0; 0,0) a
Goma xantana	100,0 (0,0; 100,0) bc
<i>Xernorhabdus szentirmaii</i> PAM 11	0,0 (0,0; 100,0) ab
<i>Trichoderma asperellum</i> IB 01/13	0,0 (0,0; 0,0) a
<i>T. asperellum</i> Quality [®]	0,0 (0,0; 0,0) a

¹Mediana de 192 fragmentos plaqueados em meio BDA;

²Valores mínimo e máximo observados.

Dois medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Dunn.

O isolado *T. asperellum* IB 01/13 propiciou 100% de controle do fungo nos ramos verdes de ‘Niágara Rosada’ (Tabela 6). Do mesmo modo, o produto Quality[®] (*T. asperellum*) apresentou uma mediana de percentual de incidência do fungo *N. parvum* nos fragmentos sem diferença com o isolado *T. asperellum* IB 01/13.

Kotze e colaboradores (2011) avaliaram *in vivo* vários isolados de *Trichoderma* e produtos à base de *Trichoderma* spp. na proteção de feridas de poda de videira contra a ação de sete patógenos de tronco, dentre eles *N. parvum*. Evidenciaram que após oito meses da inoculação dos patógenos nas feridas tratadas, os biocontroladores apresentaram eficiência similar ou superior ao fungicida testado (benomyl) na inibição dos sete patógenos, incluindo *N. parvum*, destacando o isolado de *Trichoderma* com resultados melhores que aqueles obtidos com os produtos biológicos à base de *Trichoderma*.

Esse estudo de Kotze et al. (2011) reforça os resultados obtidos no presente trabalho, em que o isolado *T. asperellum* IB 01/13 teve a mesma eficiência que o produto Quality[®] (*T. asperellum*) na proteção de feridas de ramos verdes de ‘Niágara Rosada’ contra a ação do fungo *N. parvum* (Tabela 6).

T. asperellum IB 01/13 e *T. asperellum* do produto Quality[®] demonstraram capacidade de penetrar nos ramos de videira, pois no re-isolamento do fungo *N. parvum*, a partir dos fragmentos dos ramos da ‘Niágara Rosada’, foram observadas colônias de *Trichoderma* no meio BDA. Mutawila e colaboradores (2011) constataram também a capacidade de penetração endofítica de *Trichoderma* spp. no caule de diferentes cultivares de uva de vinho e de mesa, porém essa eficiência de penetração depende da espécie e da variedade de videira.

Marraschi e colaboradores (2019) observaram que três isolados de *Trichoderma*, *T. asperelloides* IB 02/03, *T. koningiopsis* IB 09/02 e *T. asperellum* IB 01/13 sobreviveram na extremidade de caules lignificados e feridos de ‘Niágara Rosada’, por até 15 dias. Quanto à capacidade de penetração endofítica, somente o isolado *T. asperelloides* IB 02/03 demonstrou eficiência. Assim, conclui-se que o fungo *Trichoderma* tem realmente ação de penetrar endofiticamente em madeira de videira, característica desejável quando se visa a proteção contra fitopatógenos que agem na madeira da planta.

Os metabólitos secundários (MS) da bactéria *X. szentirmaii* PAM 11 a 33%, veiculados em goma xantana, também foram eficientes no controle do fungo *N. parvum*, em feridas de ramos de ‘Niágara Rosada’, mas aquém um pouco em relação ao isolado *T. asperellum* IB 01/13 e do produto Quality[®] a base de *T. asperellum* (Tabela 6). O aumento da concentração de MS da bactéria poderia gerar um aumento na eficiência de proteção contra *N. parvum*, comportando-se de maneira semelhante aos antagonistas a base de *Trichoderma*.

Fang et al. (2014) verificaram a capacidade inibitória *in vivo* do fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea* com filtrados livres de células de *Xenorhabdus nematophila* em plantas de tomate e pimenta. Os autores mostraram que *X. nematophila* produz metabólitos antimicrobianos, com fortes efeitos terapêuticos e de proteção nos frutos e plantas de tomate, e nas folhas de pimenta, destacando o potencial dos metabólitos de bactérias do gênero *Xenorhabdus*, como a de *X. szentirmaii* PAM 11, que protegeu as feridas de ramos da videira ‘Niágara Rosada’ do patógeno *N. parvum*.

Shapiro-Ilan, Bock e Hotchkiss (2014) observaram inibição *in vivo* do fungo *Phytophthora cactorum* com *X. bovienii* e *P. luminescens* em folhas de noz-pecã, pois houve redução do tamanho das lesões de 60 mm a 30 mm, aproximadamente, causadas por esse patógeno empregando os MS e os cultivos bacterianos. Esse estudo também demonstra o potencial das bactérias do gênero *Xenorhabdus* e de seus metabólitos, na proteção de plantas contra ação de fungos fitopatogênicos.

Na presença dos MS de *X. szentirmaii* PAM 11, o fungo *N. parvum* cresceu sobre o meio de cultura, mas não produziu picnídios após 3 meses da sua exposição às acículas de pinheiro, que induzem a formação destas estruturas produtoras de esporos infectantes. Assim, confirmou-se que os MS desta bactéria deixam o micélio do fungo estéril, ou seja, não há produção de novas estruturas infectantes, para causar doença em outras partes da própria planta e de plantas adjacentes. Chacon-Orozco (2018), ao avaliar a ação de bactérias simbioses de

NEPs e seus metabólitos na inibição sobre o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, em sementes de soja, também constatou que compostos voláteis e não voláteis de *X. szentirmaii* PAM 25 causaram a esterilização do micélio do fungo. Quando avaliados *in vivo* não apresentaram danos fisiológicos à semente e nem à planta.

O fungicida tebuconazole e a Tinta Látex também protegeram os ramos de ‘Niágara Rosada’ contra *N. parvum* (Tabela 6). Torres e colaboradores (2013) avaliaram *in vitro* alguns fungicidas inibidores da demetilação, comumente usados em videira, sobre a esporulação e o crescimento micelial de várias espécies de *Diplodia* e de *Neofusicoccum*. Os princípios ativos tebuconazole e myclobutanil, registrados para o manejo de outros patógenos de videira, como de *Erysiphe necator* e *Botrytis cinerea*, inibiram o crescimento dos patógenos da videira, incluindo *N. parvum*.

Em função dos aspectos negativos do uso de fungicidas para o homem e para o meio ambiente, o resultado obtido neste trabalho sobre os agentes de biocontrole, como *T. asperellum* IB 01/13, *T. asperellum* Quality® e a bactéria simbiote de NEP *X. szentirmaii* PAM 11, são importantes ferramentas pois demonstraram ter grande potencial na proteção de ramos de videira à ação de *N. parvum*, causador da morte descendente.

6. CONCLUSÕES

O fungo *Neofusicoccum* isolado de videira mostrou-se patogênico para ramos verdes de videira ‘Niágara Rosada’ e foi identificado como *N. parvum*;

Todos os isolados de *Trichoderma* avaliados apresentaram ação antagônica *in vitro* para *N. parvum*, destacando-se o isolado *Trichoderma asperellum* IB 01/13 por causar inibição precoce do fungo com 7 dias de crescimento;

Os filtrados das bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos inibiram o crescimento micelial de *N. parvum*, *in vitro*, destacando-se os metabólitos produzidos pela bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 11, na concentração de 33%;

Os tratamentos preventivos com *T. asperellum* IB 01/13, *T. asperellum* Quality®, tebuconazole + Tinta Látex, Tinta Látex e Metabólitos secundários de *X. szentirmaii* PAM 11 a 33% protegeram as feridas de ramos de videira ‘Niágara Rosada’ contra a ação do fungo *N. parvum*.

7. REFERÊNCIAS

AGRIMUNDO. Situación actual del mercado mundial de la uva de mesa. 2016. Disponível em: <http://www.agrimundo.cl/?p=32767>. Acesso em: 4 jul. 2017.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635 p.

AKINBODE, O. A.; IKOTUN, T. Potential of two *Trichoderma* species as antagonistic agents against *Colletotrichum destructivum* of cowpea. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, p. 551-554, 2011.

AIT-LAHSEN, H. et al. An antifungal exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5833-9, 2001.

ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. rev. e atual. Piracicaba: FEALQ, 1998. 549 p.

AMPONSAH, N. T. et al. Production of *Botryosphaeria* species conidia using grapevine green shoots. **New Zealand Plant Protection**, v. 61, p. 301-305, 2008.

ARMENGOL, J. et al. Characterization of *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum parvum* associated with grapevine decline in Iran. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 15, n. 17, p. 603–606, 2013.

BACK, A. J.; BRUNA, E. D.; DALBÓ, M. A. Mudanças climáticas e a produção de uva no vale do rio do peixe – SC. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 159-169, 2013.

BARROS, I. B. I.; COSTA, C. P.; MELO, I. S. Avaliação do potencial antagônico de *Trichoderma* sp. em relação a *Sclerotinia minor*. In: Reunião Anual sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, 3., 1987, São Paulo. **Anais**. São Paulo, SP. 1987.

BASKARATHEVAN, J. et al. Evaluation of different storage methods for rapid and cost-effective preservation of *Botryosphaeria* species. **New Zealand Plant Protection**, v. 62, p. 234-237, 2009.

BATISTA, D. C. et al. **Manejo Integrado de *Lasiodiplodia theobromae* em Videira no Submédio do Vale do São Francisco**. Petrolina, Pernambuco: EMBRAPA, 2010. (Circular Técnica, 91). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/879547/1/CTE91.pdf>. Acesso em: 03/01/2017.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, p. 379-382, 1982.

BERTSCH, C. et al. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, v. 62, p. 243-265, 2013.

BESTER, W.; CROUS, P. W.; FOURIE, P. H. Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. ***Australasian Plant Pathology***, v. 36, p. 73-77, 2007.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. 3-5 p.

BOCK, C. H. et al. Identification of the antifungal compound, trans-cinnamic acid, produced by *Photorhabdus luminescens*, a potential biopesticide against pecan scab. ***Journal of Pest Science***, v. 87, n. 1, p. 155-162, 2014.

BODE, H. B. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. ***Current Opinion in Chemical Biology***, v. 13, p. 224-230, 2009.

BRUEZ, E. et al. Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. ***Phytopathologia Mediterranea***, v. 52, p. 262-275, 2013.

BRUEZ, E. et al. Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of Esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. ***PLOS ONE***, v. 9, n. 5, p. e95928, 2014.

BUENSANTEAI, N.; ATHINUWAT, D. The antagonistic activity of *Trichoderma virens* strain TvSUT10 against cassava stem rot in Thailand. ***African Journal of Biotechnology***, v. 11, n. 84, p. 14996-15001, 2012.

CHACON-OROZCO, J. G. Caracterização e virulência de bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos nativos do Brasil, e toxicidade de seus metabolitos secundários para larvas de traça da colméia (Lepidoptera: Pyralidae). Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ. 2014. 40 p.

CHACON-OROZCO, J. G. Avaliação de bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos e seus filtrados no manejo de *Sclerotinia sclerotiorum* de soja. Tese (Doutorado). Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo-SP. 2018.

CHEN, G.; DUNPHY, G. B.; WEBSTER, J. M. Antifungal activity of two *Xenorhabdus* species and *Photorhabdus luminescens*, bacteria associated with the nematodes *Steinernema* species and *Heterorhabditis megidis*. ***Biological Control***, v. 4, n. 2, p. 157-162, 1994.

CHEN, G. et al. Chitinase activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species bacterial associates of entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 68, n. 2, p. 101-108, 1996.

CHEN, W. Q. et al. Antagonism of *Paenibacillus lentimorbus* to *Botryosphaeria dothidea* and biological control of panicle and shoot blight of pistachio. **Plant Disease**, v. 87, p. 359-365, 2003.

CICHE, T. A.; ENSIGN, J. C. For the insect pathogen *Photorhabdus luminiscens* which end of a nematode is out? **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1890-1897, 2003.

COELHO, O. L. et al. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* sp. a *Lasiodiplodia* sp. e *Fusarium* sp. patogênicos ao dendê (*Elaeis guineensis* Mart.) variedade tenara. In: XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 810, 2011, Bento Gonçalves. **Anais**. Bento Gonçalves, 2011. p. 440.

CONDE, C. et al. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. **Food**, London, v. 1, n. 1, p. 1-22, 2007.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 539p.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, v. 56, p. 651-676, 2000.

CÚNDOM, M. A.; MAZZA, S. M.; GUTIÉRREZ, S. A. Selection of *Trichoderma* spp. isolates against *Rhizoctonia solani*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 4, p. 79-82, 2003.

DA SILVA, P. C. G.; CORREIA, R. C. Caracterização social e econômica da videira. 2004. Disponível em: http://www.cpatosa.embrapa.br:8080/sistema_producao/spvideira/socioeconomia.htm. Acesso em: 2 jul. 2017.

DARAIGNES, L. et al. Efficacy of *P. oligandrum* affected by its association with bacterial BCAs and rootstock effect in controlling grapevine trunk diseases. **Biological Control**, v. 119, p. 59-67, 2018.

DÍAZ, G. A.; LATORRE, B. A. Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against pathogens associated with grapevine trunk diseases in Chile. **Crop Protection**, v. 46, p. 106-112, 2013.

ETHUR, L. Z.; CEMBRANEL, C. Z.; SILVA, A. C. F. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 885-887, 2001.

FANG, X. et al. Inhibitory effect of *Xenorhabdus nematophila* TB on plant pathogens *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinérea* *in vitro* and *in planta*. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-7, 2014.

FAO - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>. Acesso em: 9 abril 2019.

GARCÍA, F. Los Nemátodos Entomopatógenos Agentes de Control de Plagas. In: JACAS, J.; CABALLERO, P.; AVILLA, J. **El CONTROL biológico de plagas y enfermedades. La sostenibilidad de la agricultura mediterránea**. Barcelona: editorial Universitat Jaume I, 2005. 87p. Cp. 2.

GARRIDO, L.R.; GAVA, R. Manual de Doenças Fúngicas da Videira. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 101p. 2014.

GIOVANNINI, E. Produção de uvas para vinho, suco e mesa. Porto Alegre: Renascença, 346p. 1999.

Haidar, R. et al. Multi-organ screening of efficient bacterial control agents against two major pathogens of grapevine. **Biological Control**, v. 92, p. 55-65, 2016.

HARMAN, G. E. Seed treatments for biological control of plant disease. **Crop Protection**, Guildford, v. 10, n. 3, p. 166-171, June 1991.

HARVEY, I.C.; HUNT, J.S. Penetration of *Trichoderma harzianum* into grapevine wood from treated pruning wounds. **New Zealand Plant Protection**, v. 59, p. 343-347, 2006.

HAZIR, S. et al. Relative potency of culture supernatants of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. on growth of some fungal phytopathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v. 146, p. 369-381, 2016.

HAZIR, S. et al. *Trans*-cinnamic acid and *Xenorhabdus szentirmaii* metabolites synergize the potency of some commercial fungicides. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 145, p. 1-8, 2017.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2019. **Sistema IBGE de Recuperação Automática SIDRA – Abril de 2019**. Disponível em <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>. Acesso em: 9 abril 2019.

INCH, S. et al. The development of a model to predict the potential of *Trichoderma harzianum* isolates on perithecial production of *Gibberella zeae* based on secondary metabolite production. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 33, n. 3, p. 337-346, 2011.

KEXIANG, G. et al. Mycoparasitism of *Trichoderma* spp. on five plant pathogenic fungi. **Journal of Shandong Agricultural University**, v. 33, p. 37-42, 2002.

KOPPENHÖFER, A. M. Nematodes. In: LACEY, L.A.; KAYA, H.K. (ed.). Field manual of techniques in invertebrate pathology: Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests, 249-264p., 2007.

KOTZE, C. et al. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 50, p. s247-s263, 2011.

LABORATÓRIO FARROUPILHA. Quality® Mais que *Trichoderma* um biopotente. 2019. Disponível em: <https://www.labfarroupilha.com/produto/QUALITY-13>. Acesso em: 17 maio 2019.

LARANJEIRA, D. et al. Efeito de diferentes substratos na esporulação de espécies de *Trichoderma*. **Summa Phytopathologica**, v. 22, p. 178-181, 1996.

LATORRE, B. A. et al. Evaluation of the use of wound-protectant fungicides and biological control agents against stem canker (*Neofusicoccum parvum*) of blueberry. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 40, n. 3, p. 547-557, 2013.

LAUVEAU, C. et al. Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 48, p. 32-46, 2009.

LEÃO, P. C. deS. Cultivo da Videira. 2004. Disponível em: http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/sistema_producao/spvideira/cultivares.htm. Acesso em: 16 set. 2018

LEGUÍZAMO, M. C. et al. Control de *Fusarium* spp. y *Bacillus subtilis* mediante metabolitos de *Xenorhabdus bovienii* mutualista de *Steinernema feltiae*. **Acta Agronómica**, v. 63, n. 1, p. 1-10, 2014.

LEITE, L. G. et al. **Produção de fungos entomopatogênicos**. ESALQ/USP: Alexandre de Sene Pinto, 2003. 53 p.

LEWIS, E. E. et al. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 38, p. 66-79, 2006.

LORTKIPANIDZE, M. A. et al. Foraging behavior and virulence of some entomopathogenic nematodes. **Annals of Agrarian Science**, v. 14, p. 99-103, 2016.

MAIA, J. D. G. Cultivo da Videira Niágara Rosada em Regiões Tropicais do Brasil. 2003. Disponível em:

<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaNiagaraRosadaRegioesTropicais/poda.htm>. Acesso em: 16 set. 2018.

MARRASCHI, R. Seleção de *Trichoderma* spp. para manejo de *Lasiodiplodia theobromae*, em videira Niágara Rosada. Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico, São Paulo. 2015. 11, 16-18p.

MARRASCHI, R. et al. A protocol for selection of *Trichoderma* spp. to protect grapevine pruning wounds against *Lasiodiplodia theobromae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 213-221, 2019.

MELLO, L.M.R.de. Panorama da vitivinicultura brasileira em 2014. Campo & Negócios, 12 abril 2015. Disponível em: <http://www.revistacampoenegocios.com.br>. Acesso em: 2 jul. 2017.

MELLO, L. M. R.de. Desempenho da viticultura brasileira em 2017. 2018. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1091329?locale=en>. Acesso em: 16 set. 2018.

NG K. K.; WEBSTER J. M. Antimycotic activity of *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) metabolites against *Phytophthora infestans* on potato plants. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 19, n. 2, p. 125-236, 1997.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* com bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 261-295, 1996.

MELO, I. S. Agentes Microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). Controle Biológico, Jaguariúna: EMBRAPA, v. 1, 1998.

MUNKVOLD, G.P. *Eutypa* dieback of grapevine and apricot. **Plant Health Progress**. Disponível em: <https://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/diagnosticguide/dieback/>. Acesso em: 20 set. 2018

MITAWILA et al. Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. **Phytopathol. Mediterr.**, v. 50 (supplement), pp. S264-S276, 2011.

OIV – Organización Internacional de la Viña y el Vino. Uvas de Mesa y Pasas: Los Datos Mundiales Están Disponibles. 2017. Disponível em: <http://www.oiv.int/es/actualidad-de-la-oiv/uvas-de-mesa-y-pasas-los-datos-mundiales-estan-disponibles>. Acesso em: 15 set. 2018.

PHILLIPS, A. J. L. et al. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Micology**, v. 76, p. 51-167, 2013.

PITT, W.; SAVOCCHIA, S. E.; WUNDERLICH, N. Botryosphaeria dieback identification and management. National Wine and Grape Industry Centre pp.6, 2012.

POMMER, C.V. Uva: Tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Porto Alegre: Ed. Cinco Continentes, 2003.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A.; MELLO, L. M. R. de. A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas. 2014. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura/>. Acesso em: 4 jul. 2017.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B. et al. Variações na anatomia foliar de videira Niágara em diferentes sistemas de condução. **Bragantia**, v. 70, p. 488-493. 2011.

REGLA, R. A.; MONTEIRO, R. Enxertia de campo na videira. 2013. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/94911/1/Folder-enxertia-no-campo.pdf>. Acesso em: 16 set. 2018.

REZGUI, A. et al. Study of *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Neofusicoccum parvum* and *Schizophyllum commune*, three pathogenicfungi associated with the Grapevine Trunk Diseases in the North of Tunisia. **European Journal of Plant Pathology**, v. 152, p. 127-142, 2018.

ROIGER, T. C.; JEFERS, S. N.; CALDWELL, R. W. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soil. **Soil Biology Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 353-359, 1991.

SAKALIDIS, M.L.; HARDY, G.E.St.J.; BURGEES, T.T. Use of the Genealogical Sorting Index (GSI) to delineate species boundaries in the *Neofusicoccum parvum*-*Neofusicoccum ribis* species complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 60, n.3, p. 333-344, 2011.

SAN-BLAS, E.; CARRILLO, Z.; PARRA, Y. Effect of *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* bacteria and their exudates on *Moniliophthora roreri*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 45, n. 16, p. 1950-1967, 2012.

SARKAR, S.; NARAYANAN, P.; DIVAKARAN, A. The *in vitro* effect of certain fungicides, insectides, and biopesticides on mycelial growth in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. **Turkish Journal of Biology**, v. 34, p. 399-403, 2010.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v. 354, n. 2, p. 311-313, 2006.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787-99, 2010.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; BOCK, C.H.; HOTCHKISS, M.W. Suppression of pecan and peach pathogens on diferente substrates using *Xenorhabdus bovienii* and *Photorhabdus luminescens*. **Biological Control**, v. 77, p. 1-6, 2014.

SHI, D. et al. Stilbene derivates from *Photorhabdus temperata* SN259 and their antifungal activities against phytopathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 1, p. 60-65, 2017.

SILVA, A. C. F. **Uso de radiação gama para obtenção de mutantes de *Trichoderma harzianum* Rifai. e *T. viride* Pers. Fr. com capacidade melhorada no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary.** 1997. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R.; GRIGOLETTI-JÚNIOR, A. Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil. Circular Técnica 56, Embrapa Uva e Vinho, 2005.

SOUSA, J. S. I. de. Uvas para o Brasil. 2. ed. rev. atual. Piracicaba: Fealq, 1996. 791 p. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 1).

SOUZA, M.C.M.; OTANI, M. N.; VERDI, A. R. Valorização da cultura italiana e o consumo de vinho artesanal. **Informações Econômicas**, v. 40, p. 56-67, 2010.

SPAGNOLO, A. et al. Defense Responses in Grapevine (cv. Mourvèdre) after Inoculation with the Botryosphaeria Dieback Pathogens *Neofusicoccum parvum* and *Diplodia seriata* and Their Relationship with Flowering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 1-12, 2017.

TAPWAL, A. et al. Compatibility of *Trichoderma viride* for selected fungicides and botanicals. **International Journal of Plant Pathology**, v. 3, p. 89-94, 2012.

TAVARES, S. C. C. deH. Cultivo da Videira. 2004. Disponível em: http://www.cpatasa.embrapa.br:8080/sistema_producao/spvideira/doencas.htm. Acesso em: 2 fev. 2019

TEMPLETON, E. G.; HEINY, D. K. Improvement of ungi to enhance mycoherbicide potential. In: WHIPPS, J. M.; LUMSDEN, R. D. (Eds.). *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth*. Cambridge University Press, 1989. p.127-151.

TORRES, C. et al. Evaluation of DMI fungicides against species of *Diplodia* and *Neofusicoccum* associated with Botryosphaeria canker of grapevine. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 40, n. 1, p. 131-138.

VAN NIEKERK, J. M. et al. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 781-798, 2004.

VAN NIEKERK, J. M. et al. Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens in South Africa. **European Journal of Plant Pathology**, v. 127, n. 3, p. 375-390, 2010.

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; GUBLER, W. D. Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California. **Plant Diseases**, v. 93, p. 584-592, 2009.

ÚRBEZ-TORRES, J. R. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 50 (Supplement), p. S5–S45, 2011.

WHIPPS, J. M.; LUMSDEN, R. D. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: BULT, T.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Eds.). *Fungal Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. Wallingford: CABI Publishing, 2001. p. 9.

WOUTS, W.M. *Steinernema* (Neoaplectana) and *Heterorhabditis* species. In: NICKLE, W.R. (ed.). *Manual of agricultural nematology*. New York: Marcel Dekker, 855-97p., 1991.

YANG, X. et al. Antifungal activity of xenocoumacin 1 from *Xenorhabdus nematophilus* var. *Pekingensis* against *Phytophthora infestans*. **World Journal of Microbiol. Biotechnology**, v. 27, p. 523-528, 2011.

ZAR, J.H. (Ed.). *Biostatistical analysis*. 5 ed. New Jersey: Practice-Hall, 2009. 994p.