



Doença de Petri na videira 'Niágara Rosada' no estado de São Paulo: levantamento de ocorrência, etiologia e medidas para o manejo da doença

INSTITUTO BIOLÓGICO
PÓS-GRADUAÇÃO

**Doença de Petri na videira 'Niágara Rosada' no estado de
São Paulo: levantamento de ocorrência, etiologia e
medidas para o manejo da doença**

ANA BEATRIZ MONTEIRO FERREIRA

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. Luís Garrigós Leite

Co-orientador: Dr. César Júnior Bueno

São Paulo
2016

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

Ferreira, Ana Beatriz Monteiro.

Doença de Petri na videira 'Niagara Rosada' no Estado de São Paulo: levantamento de ocorrência, etiologia e medidas para o manejo da doença. / Ana Beatriz Monteiro Ferreira. – São Paulo, 2016.
92 p.

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: Petri disease in grapevine 'Niagara Rosada' in São Paulo State: analysis of occurrence, etiology and procedures to management of the disease.

1. *Vitis vinifera* 2. *Phaeomoniella chlamydospora* I. Ferreira, Ana Beatriz Monteiro II. Leite, Luís Garrigós III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

IB/Bibl./2016/01



**SECRETARIA DE AGRICULTURA E
ABASTECIMENTO**

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Ana Beatriz Monteiro Ferreira

Título: Doença de Petri na videira 'Niagara Rosada' no estado de São Paulo: levantamento da ocorrência, etiologia e medidas para o manejo da doença

Orientador: Dr. Luís Garrigós Leite

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

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a): Luís Garrigós Leite

*Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a): Edson Luiz Furtado

*Instituição: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), FAC Faculdade de Ciências Agrônômicas, Campus Botucatu

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a): Ivan Herman Fischer

*Instituição: Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Polo Regional Centro Oeste - Bauru

À minha avó Norma por nunca me deixar desistir
Ofereço

*Aos meus pais Willes e Nilza
Stela por todo amor, carinho,
paciência, companheirismo e
apoio incondicional, pois sem
eles eu não seria nada, a
minha base!*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter me dado a vida e fé, força para superar todos os obstáculos presentes em minha vida.

A toda a **minha família**, pelas demonstrações de carinho, amor, paciência, apoio para que eu pudesse concluir esta etapa na minha vida.

Ao **Instituto Biológico** e a todos os **docentes** do programa de Pós-graduação, pela oportunidade e ensinamentos.

Ao **Dr. Luís Garrigós Leite**, pela orientação, ensinamentos e pela confiança para a realização deste trabalho.

Ao **Dr. César Júnior Bueno**, pela paciência, dedicação, ensinamentos deste universo fascinante da fitopatologia, que aos poucos fui aprendendo, adorando e por estar presente ao longo deste trabalho.

À **Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa.

Ao **Dr. Lucas da Ressurreição Garrido** e **Renata Gava**, pesquisadores da Embrapa Uva e Vinho, pelo envio e disponibilização dos isolados de *Phaeacremonium* spp.

Aos **viticultores**, que permitiram a coletas de videiras de 'Niagara Rosada' em suas propriedades para que este trabalho fosse realizado.

À Prefeitura Municipal de Louveira, do estado de São Paulo / Brasil, principalmente na pessoa do Diretor de Agricultura, o Engenheiro Agrícola **Daniel Fernando Miquelletto**, pelo suporte financeiro dado ao projeto.

Ao pesquisador **Msc. José Luis Hernandez**, do Instituto Agrônômico (IAC), pela disponibilização dos porta-enxertos para 'Niagara Rosada' e ajuda em todos os ensaios realizados no Centro APTA de frutas, Jundiaí.

Ao **Dr. Ricardo Harakava**, por toda a ajuda e auxílio nos testes moleculares.

Ao **Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani**, do Departamento de Bioestatística da UNESP de Botucatu, pelas análises estatísticas dos dados do trabalho.

A todos os meus colegas do laboratório de Fitopatologia: **Karina Moura, Kamila Moura, Antônio Alves, Alice Elias, Isabela Ordine, Fernanda Fernandes** por terem me recebido muito bem, pela paciência e atenção que tiveram comigo ao longo desses anos.

A toda equipe do laboratório de Controle Biológico: **Roselaine Bueno, Ana Paula Ferreira Pinto, Ana Paula dos Santos Bartels, Lucas Detogni Simi, Tatiane de Castro Pietrobon, Milena Yasmin**, que sempre me receberam com muito carinho em todos os momentos que estive lá e com várias delícias na cozinha.

À **Karen Wolf Maciel**, que se tornou uma “grande” amiga, presente em vários momentos bons e ruins ao longo desta etapa, sempre me falando que era só uma fase, que em breve tudo estaria bem.

À **Renata Marraschi**, que foi minha irmãzinha de orientador, que esteve presente comigo ao longo deste trabalho, em dias de sol, chuva sempre forte e vivendo a vida como se fosse um grande espetáculo. Vivemos várias aventuras que por sinal poderíamos escrever um livro, quem sabe num futuro.

As minhas amigas/biólogas **Amanda Fantinatti, Fernanda Polastre Pereira, Karine Carvalho, Carla Bulgarelli e Micaele Franco**; mesmo que vocês não estavam presentes no desenvolvimento deste trabalho, sempre me deram força e coragem para que tudo desse certo.

À **Bruna Cristina Migotto** uma amiga que com seu jeitinho todo meigo de ser, foi tendo cada dia um espacinho na minha vida. Lembro-me como se fosse hoje quando cheguei no laboratório não sabia nada, ela teve a paciência de me ensinar, me ajudava sempre. Nos separamos por um tempo, mas a amizade só cresceu e se fortaleceu.

À minha amiga/irmã **Caroline Thais Negrato de Souza**, pela nossa amizade verdadeira que perdura por anos, que mesmo com a distância continua cada dia mais forte. Mesmo de longe quando nos falamos vibra com as minhas conquistas. Estamos separadas apenas fisicamente, mas nossos pensamentos estão sempre juntos.

À **Tayane de Paula Coragem**, uma amiga de todas as horas, uma irmã que mesmo distante esteve presente em vários momentos para que eu concluísse mais essa etapa na minha vida.

À **Marília Pizetta**, uma amiga que foi chegando de mansinho e acabou fazendo parte da minha vida, desde o primeiro momento que decidi me inscrever no mestrado, me ajudou, deu conselhos, não me deixou largar tudo, em um momento de desânimo. Até um continente pareceu ser um obstáculo na nossa amizade, mas isso não aconteceu.

À **Rosangela de Sales Sousa**, que o destino colocou no meu caminho, bem no dia da inscrição do mestrado, que aos pouquinhos fomos construindo uma amizade. E como não esquecer as várias madrugadas que passamos discutindo sobre trabalhos, artigos, apresentações e sempre uma ajudando a outra.

À **Amanda de Oliveira**, uma amiga de todas as horas, que se tornou muito especial para mim. Dando-me conselhos, me ajudando sempre que possível na realização deste trabalho. Mesmo estando longe, se fez presente em diversas etapas desta caminhada. Mostrando-me que tudo passa, que os momentos ruins são para que tenhamos força para vencer, que em breve os bons virão.

Aos futuros chefes de cozinha **Dilva Pereira, Cristina Said, Susi Sorgi, Maylon Fialho, Roseval Júnior, Tiago Olgado**, mesmo não estando presentes na

realização deste trabalho deram mais alegria e diversão na minha vida, nesta etapa importante na minha carreira profissional.

À **Rosilene Alberti Mileu**, minha querida professora de inglês e amiga, que sempre que precisei de uma ajuda nas traduções esteve presente.

À **Nilza Stela Candido Monteiro Ferreira**, minha amada mãe, amiga, companheira, que sempre fez e faz de tudo para mim. Mostrando-me que sou capaz de tudo, não me deixando esmorecer e nem tão pouco desistir dos meus sonhos, pois muitas vezes abre mão dos seus para viver os meus. Sem seu apoio, carinho e amor incondicional não seria nada. Meu exemplo de dedicação, amor e sabedoria. Te amo até o infinito.

Ao **Willes Ferreira**, meu amado pai, amigo, que não mede esforços para me ver feliz. Nunca me deixando desistir, dizendo que vou vencer mais esta etapa na minha vida. Meu fiel companheiro, sempre comigo quando eu precisava ir nos finais de semana para o laboratório, nas avaliações dos experimentos. Te amo para sempre.

À **Norma Candido Monteiro**, minha querida avó e madrinha, que me viu dando os meus primeiros passos de vida e que agora está podendo compartilhar desta alegria, de me ver concluindo mais essa etapa na minha vida. Por sempre me colocar em suas orações, pedindo a minha proteção nesta longa caminhada e também não deixando o desânimo me abater ou que desista do que eu acredito. Te amo.

E a todos, que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, agradeço.

“Ser feliz não é ter uma vida perfeita. Mas usar as lágrimas para irrigar a tolerância. Usar as perdas para refinar a paciência. Usar as falhas para esculpir a serenidade. Usar a dor para lapidar o prazer. Usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência.”

Augusto Cury

FERREIRA, A. B. M. DOENÇA DE PETRI NA VIDEIRA 'NIAGARA ROSADA' NO ESTADO DE SÃO PAULO: LEVANTAMENTO DE OCORRÊNCIA, ETIOLOGIA E MEDIDAS PARA O MANEJO DA DOENÇA. São Paulo, 2016. **Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.**

RESUMO

A doença de Petri causada por *Phaeomoniella chlamydospora* e espécies de *Phaeoacremonium* é grave, complexa, ataca plantas jovens de videira e é de difícil controle no mundo. O estado de São Paulo está entre os maiores produtores da uva de mesa 'Niagara Rosada' e não há relato oficial da doença de Petri no estado. Os objetivos do presente trabalho foram: 1) avaliar a incidência dessa doença em 'Niagara Rosada' em São Paulo e comparar metodologias de isolamento; 2) identificar molecularmente isolados dos fungos obtidos e realizar teste de patogenicidade; 3) estudar o local de colonização natural dos fungos da doença de Petri, em diferentes partes da planta Niagara Rosada; 4) fazer um screening em porta-enxertos para 'Niagara Rosada' quanto à resistência ao fungo *P. chlamydospora*; e 5) desinfetar em condições *in vitro* o porta-enxerto de 'Niagara Rosada' infectado com *P. chlamydospora* por meio de solarização e biofumigação, ambas associadas ou não com termoterapia, e o efeito destas técnicas no desenvolvimento do sistema radicular das estacas. O isolamento dos agentes causais da doença é feita com a retirada de fragmentos do sistema vascular da região do colo das plantas sintomáticas, seguido de desinfestação superficial e plaqueamento de fragmentos em meio de cultura BDA. Incuba-se em BOD, a 23°C, por até 21 dias. Detectou-se a doença de Petri em todos os iguais produtores do estado de São Paulo. A espécie de *Phaeoacremonium* prevalente foi *P. aleophilum*. Somente no município de Jales, além de *P. aleophilum* detectou-se, também, a espécie *P. venezuelense*. A única espécie de *Phaeomoniella* identificada foi *P. chlamydospora*. A porcentagem de isolamento foi maior para *P. chlamydospora* do que para *Phaeoacremonium*. No teste de patogenicidade, a média do comprimento das estrias escuras para *Phaeomoniella* sp. foi de 7,9 cm e de *Phaeoacremonium* sp. foi de 5,2 cm. As plantas controle (testemunha) permaneceram sadias. Os fungos foram re-isolados das plantas doentes, completando os postulados de Koch e comprovou-se a presença da doença em 'Niagara Rosada' no estado de São Paulo - Brasil. Na colonização, os fungos detectados e identificados em 'Niagara Rosada' foram *P. chlamydospora* e *Phialemonium dimorphosporum*. As partes da planta 'Niagara Rosada' diferiram entre si somente para *P. chlamydospora* e este fungo colonizou somente a região do colo. O porta-enxerto mais resistente ao fungo *P. chlamydospora* foi o Golia, os mais suscetíveis foram IAC 313, IAC 571-6 e IAC 572. Não houve doença nos porta-enxertos do tratamento testemunha. As espécies *Vitis riparia* e *Vitis rupestris* são responsáveis pela resistência dos porta-enxertos

ao fungo *P. chlamydospora*. A biofumigação e a temperatura de 37°C como única medida, ambas as técnicas aplicadas por 7 e 14 dias e seguidas da termoterapia, eliminaram *P. chlamydospora* no porta-enxerto IAC 766 de 'Niagara Rosada' e não prejudicaram o desenvolvimento do seu sistema radicular.

Palavras-chave: *Vitis vinifera*, *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilium*, Declínio.

FERREIRA, A. B. M. PETRI DISEASE IN GRAPEVINE 'NIAGARA ROSADA' IN SÃO PAULO STATE: ANALYSIS OF OCCURRENCE, ETIOLOGY AND PROCEDURES TO MANAGEMENT THE DISEASE. São Paulo, 2016. **Dissertation (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.**

ABSTRACT

The Petri disease caused by *Phaeoconiella chlamydospora* and species *Phaeoacremonium* is devastating, complex, infect young plants vine and is difficult to control in the world. The state of São Paulo is among the largest producers of 'Niagara Rosada' table grape and there is no official report of Petri disease in the state. This study aimed : 1) to assess the incidence of this disease in 'Niagara Rosada' in Sao Paulo and compare methodologies of isolation; 2) identify molecularly isolated and conduct pathogenicity test; 3) study the local of natural colonization of the fungi in different parts of the plant 'Niagara Rosada'; 4) make a screening of 'Niagara Rosada' rootstocks with resistance to the fungus *P. chlamydospora* and 5) disinfect 'Niagara Rosada' rootstock infected with *P. chlamydospora* through solarization and biofumigation, both associated or not with thermotherapy, and the effect of these techniques on the development of its root system. The isolation of the causal agents of the disease was made with the removal of vascular system fragments of the stalk region of symptomatic plants followed by surface disinfection and plating of fragments in the PDA culture medium. Then, this was incubated in growth chamber at 23°C for up to 21 days. The Petri disease was detected in the São Paulo state. The most prevalent specie of *Phaeoacremonium* was *P. aleophilum*. *P. aleophilum* and *P. venezuelense*, which were detected in Jales. The only specie of *Phaeoconiella* identified was *P. chlamydospora*. *P. chlamydospora* was found in higher incidence than *Phaeoacremonium*. For the pathogenicity test, the average length of dark streaks was 7.9 cm for *Phaeoconiella* sp., and 5.2 cm for *Phaeoacremonium* sp. Control plants remained healthy. The fungi were re-isolated from diseased plants, completing the Koch postulates and confirming the presence of these diseases in 'Niagara Rosada' in São Paulo - Brazil. For the colonization studies, fungi were detected and identified in 'Niagara Rosada' as *P. chlamydospora* and *Phialemonium dimorphosporum*. The parts of the 'Niagara Rosada' plant differed only *P. chlamydospora* and this fungus only colonized the collard region. Golia was the most resistant rootstock to the fungus *P. chlamydospora*, while IAC 313 was the most susceptible. There was no infection in the control rootstocks. The species *V. riparia* and *V. rupestris* are responsible for the resistance of the rootstocks to the fungus *P. chlamydospora*. Biofumigation method and 37°C as a single measure, both techniques applied during 7 and 14 days followed by thermotherapy, eliminated *P. chlamydospora* from the 'Niagara Rosada' rootstock (IAC 766)

and did not damage the development of its root system.

Keyword: *Vitis vinifera*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, Decline.

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Produção de uvas no Brasil, em toneladas.....	07
TABELA 02: Área plantada de uva no Brasil, por hectares.....	07
TABELA 03: Composição mineral (macro e micronutrientes), pH e matéria orgânica (M.O.) do solo de barranco.....	29
TABELA 04: Composição mineral (macro e micronutrientes) do material de couve (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> L.).....	29
TABELA 05: Ocorrência de <i>Phaeoacremonium</i> sp. e / ou <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> na videira ‘Niagara Rosada’ enxertada em diferentes porta-enxertos, em oito municípios do estado de São Paulo – Brasil.....	34
TABELA 06: Porcentagem de incidência de <i>Phaeoacremonium</i> sp. e / ou <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> por fragmento retirado do sistema vascular da região do colo da videira ‘Niagara Rosada’ de plantas de todos os municípios paulistas visitados e que foi plaqueado em meios de cultura diferentes, sendo os fragmentos passados ou não por processo de desinfestação superficial.....	35
TABELA 07: Comprimento (cm) de estrias escuras causadas por <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> e <i>Phaeoacremonium aleophilium</i> no sistema vascular de mudas da videira ‘Niagara Rosada’ enxertadas no porta-enxerto IAC 766 e que ficaram mantidas em casa-de-vegetação por quatro meses.....	44
TABELA 08: Percentual de incidência dos fungos <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> e <i>Phialemonium dimorphosporum</i> , de fragmentos retirados de ‘Niagara Rosada’ em dois porta-enxertos diferentes.....	46

TABELA 09: Lesões (centímetros) provocadas pelo fungo *Phaeomoniella chlamydospora* nas regiões do colo-raiz e colo-parte aérea no sistema vascular dos diferentes porta-enxertos.....**49**

TABELA 10: Porcentagem de incidência de *Phaeomoniella chlamydospora* em fragmentos do sistema vascular da região do colo de mudas de ‘Niagara Rosada’ enxertadas no porta-enxerto IAC 766, submetidas a diferentes tratamentos por diferentes períodos de tempo, com e sem complemento de termoterapia.....**53**

TABELA 11: Frequência de ocorrência e percentual de sobrevivência de *Phaeomoniella chlamydospora* em fragmentos do sistema vascular da região do colo de mudas de ‘Niagara Rosada’ enxertadas no porta-enxerto IAC 766 e submetidos a tratamentos de desinfestação, nos tempos com 7, 14 e 21 dias, com e sem complemento de termoterapia.....**56**

TABELA 12: Porcentagem de formação de raízes de estacas do porta-enxerto IAC 766 de ‘Niagara Rosada’ submetidas a tratamentos de desinfecção em diferentes períodos de tempo, com e sem complemento termoterapia.....**59**

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01:** Cachos de uva ‘Niagara Rosada’.....**09**
- FIGURA 02:** Características morfológicas do isolado *Phaeoconiella chlamydospora*.....**11**
- FIGURA 03:** Características morfológicas do isolado *Phaeoacremonium aleophilum*.....**12**
- FIGURA 04:** Detalhe da sintomatologia da Doença de Petri, em videira, na parte aérea.....**13**
- FIGURA 05:** Detalhe da sintomatologia da doença de Petri, em videira, no sistema vascular da região do colo, onde se pode observar pontuações escuras e exsudações.....**14**
- FIGURA 06:** Sintomas em videira observado no campo: Folha com clorose, planta com baixa produtividade ou sem nenhum cacho e sistema vascular da planta com pontuações escuras e exsudações, na região do colo.....**20**
- FIGURA 07:** Amostra composta de plantas da videira ‘Niagara Rosada’ com fragmentos do sistema vascular da região do colo, passadas ou não pelo processo de desinfestação superficial e fragmentos menores plaqueados nos meios de cultura AA, BDA e isca de maçã verde.....**21**
- FIGURA 08:** Isolamento de fitopatógenos da doença de Petri da videira ‘Niagara Rosada’ - placas com os três meios de isolamento (BDA, AA e isca de maçã verde) incubadas em estufa tipo BOD, a 23°C, com fotoperíodo de 12 horas.....**22**
- FIGURA 09:** Métodos de preservação dos fungos obtidos no isolamento da videira ‘Niagara Rosada’ com sintomas de declínio: Castellani e tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA com adição de óleo Nujol®.....**23**
- FIGURA 10:** Detalhe das três partes diferentes da videira ‘Niagara Rosada’ amostradas: colo, parte média (40 cm acima da região do colo) e parte aérea (40 cm acima da parte média).....**26**

- FIGURA 11:** Método de inoculação do fungo *Phaeomoniella chlamydospora* nos porta-enxertos.....**27**
- FIGURA 12:** Comprimento da estria escura causada pelo fungo *Phaeomoniella chlamydospora* no sistema vascular, do ponto de inoculação (colo) até as raízes.....**28**
- FIGURA 13:** Conjunto de dois recipientes de vidros – o microcosmo, com tampas vazadas permitindo a passagem de uma mangueira de silicone interligando os recipientes de vidros e seus tratamentos. Detalhe do microcosmo mantido dentro de estufa tipo BOD regulada para as temperaturas de $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, visando ao controle do fungo *Phaeomoniella chlamydospora* em mudas infectadas da videira ‘Niagara Rosada’.....**30**
- FIGURA 14:** Mudas de ‘Niagara Rosada’, que passaram pelos tratamentos de desinfecção em diferentes períodos e depois submetidas a tratamento adicional de termoterapia em banho-maria com água destilada com temperatura regulada para $51\pm 1^{\circ}\text{C}$**31**
- FIGURA 15:** Estacas do porta-enxerto IAC 766, passadas pelos tratamentos de desinfecção mais termoterapia e que foram plantadas em canteiro para observar o desenvolvimento do seu sistema radicular.....**32**
- FIGURA 16:** Árvore filogenética gerada por “Neighbour-joining” e construída com base em 1000 réplicas das árvores embasadas no algoritmo de “bootstrap”. Essa árvore ilustra os fungos de videira obtidos nos municípios de São Paulo com fungos de dois gêneros e diversas espécies de videira depositadas no GenBank-NCBI, a partir das seqüências da região ITS-5.8S rDNA dos mesmos. O número nas ramificações representa o valor de 1000 “bootstrap”. O isolado *Pleurostomophora richardsiae* foi utilizado como “outgroup”.....**37**
- FIGURA 17:** Árvore filogenética gerada por “Neighbour-joining” e construída com base em 1000 réplicas das árvores embasadas no algoritmo de “bootstrap”. Essa árvore ilustra os fungos de videira obtidos nos municípios de São Paulo com fungos de dois gêneros e diversas espécies de videira depositadas no GenBank-NCBI, a partir das seqüências do fator de alongação do gene 1- α dos mesmos. O número nas ramificações representa o valor de 1000 “bootstrap”. O isolado *Pleurostomophora richardsiae* foi utilizado como

“outgroup”38

FIGURA 18: Árvore filogenética gerada por “Neighbour-joining” e construída com base em 1000 réplicas das árvores embasadas no algoritmo de “bootstrap”. Essa árvore ilustra os fungos de videira obtidos nos municípios de São Paulo com fungos de dois gêneros e diversas espécies de videira depositadas no GenBank-NCBI, a partir do gene da β -tubulina dos mesmos. O número nas ramificações representa o valor de 1000 “bootstrap”. O isolado *Pleurostomophora richardsiae* foi utilizado como “outgroup”39

FIGURA 19: Árvore filogenética gerada por “Neighbour-joining” e construída com base em 1000 réplicas das árvores embasadas no algoritmo de “bootstrap”. Essa árvore ilustra os fungos de videira obtidos nos municípios de São Paulo com fungos de dois gêneros e diversas espécies de videira depositadas no GenBank-NCBI, a partir das seqüências da região ITS-5.8S rDNA dos mesmos. O número nas ramificações representa o valor de 1000 “bootstrap”. O isolado *Pleurostomophora richardsiae* foi utilizado como “outgroup”40

FIGURA 20: Planta de videira ‘Niagara Rosada’ enxertada em IAC 766 exibindo sintomas de doença de Petri, com caule fino, escurecido e sem folhas. Ao lado, planta sem o fungo – sadia (controle); local de inoculação dos fungos – região do colo; detalhe de estrias escuras no vaso a partir do ponto de inoculação em direção ao sistema radicular.....44

FIGURA 21: Características morfológicas do isolado de *Phaeomoniella chlamydospora* (IBVD 01).....45

FIGURA 22: Características morfológicas de um isolado de *Phaeoacremonium aleophilium* (IBVD 05).....45

FIGURA 23: Estrias escuras no sistema vascular do porta-enxerto de videira na região do colo em direção a raiz e na região do colo em direção a parte aérea.....50

FIGURA 24: Estacas de videira do porta-enxerto IAC 766 tratadas pelos tratamentos de desinfecção nos períodos de 7, 14 e 21 dias com adicional ou não de termoterapia, sendo posteriormente plantadas em solo de canteiro para verificar o seu desenvolvimento e, principalmente, a emissão de raízes.....58

FIGURA 25: Estacas de videira do porta-enxerto IAC 766 do período de 7 dias.....**60**

FIGURA 26: Estacas de videira do porta-enxerto IAC 766 do período de 14 dias.....**61**

FIGURA 27: Estacas de videira do porta-enxerto IAC 766 do período de 21 dias.....**62**

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
1. INTRODUÇÃO	xvii
2. JUSTIFICATIVA	3
3. OBJETIVOS	4
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
4.1 Viticultura	5
4.2 A Variedade Niagara Rosada	8
4.3. Doença de Petri em videira	9
4.4. Identificação de fitopatógenos em videira	10
4.5. Etiologia de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	11
4.6. Etiologia de <i>Phaeoacremonium aleophilium</i>	12
4.7. Sintomatologia da Doença de Petri em videira	12
4.8. Meios de disseminação da Doença de Petri em videira	14
4.9. Medidas de controle da Doença de Petri em videira	15
4.10. Solarização e Biofumigação	17
5. MATERIAL E METODOS	19
5.1 Levantamento de ocorrência de doença de Petri na videira ‘Niagara rosada’ no estado de São Paulo	19
5.1.1. Coleta de plantas de videira e pré-processamento	19
5.1.2. Isolamento de fitopatógenos da doença de Petri da videira ‘Niagara Rosada’	20
5.1.3. Identificação molecular de fungos isolados da videira ‘Niagara Rosada’ com sintomas de doença de Petri e sua preservação	22
5.1.4. Análise dos dados de ocorrência de doença de Petri na videira ‘Niagara Rosada’	23
5.2. Teste de patogenicidade dos fungos obtidos de videira ‘Niagara Rosada’, com sintomas da doença de Petri	24

5.3. Local de colonização natural e predominante dos fungos da doença de Petri em diferentes partes da videira ‘Niagara Rosada’	25
5.3.1. Coleta de plantas de videira ‘Niagara Rosada’ com doença de Petri.....	25
5.3.2. Processamento, avaliação e análise estatística dos dados	25
5.4. “Screening” para verificar resistência de porta-enxertos para ‘Niagara Rosada’ ao fungo <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	26
5.5 Solarização, Biofumigação e Termoterapia para desinfectar o porta-enxerto IAC 766 de ‘Niagara Rosada’ do fungo <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> e o efeito destas técnicas no desenvolvimento do sistema radicular.....	28
5.5.1. Solarização, Biofumigação e Termoterapia para desinfectar o porta-enxerto IAC 766 para ‘Niagara Rosada’ do fungo <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	28
5.5.2. Efeito das técnicas de desinfecção do porta-enxerto IAC 766 para ‘Niagara Rosada’ no desenvolvimento do sistema radicular	31
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.1. Levantamento de ocorrência da doença de Petri na videira ‘Niagara Rosada’ no estado de São Paulo	33
6.1.1. Identificação molecular dos fitopatógenos causadores da doença de Petri	36
6.2. Teste de patogenicidade com fungos obtidos no levantamento de videira com sintomas da doença de Petri	41
6.3. Local de colonização natural dos fungos da doença de Petri em diferentes partes da videira ‘Niagara Rosada’	46
6.4. “Screening” para verificar resistência de porta-enxertos para ‘Niagara Rosada’ ao fungo <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	48
6.5 Solarização e solarização mais brássica em microcosmo (biofumigação) e termoterapia para controle de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> no porta-enxerto IAC 766 de ‘Niagara Rosada’ e o efeito destas técnicas no desenvolvimento do sistema radicular	52
7. CONCLUSÕES	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

A videira é um arbusto de caule sarmentoso e trepador e que pode se fixar a suportes naturais ou artificiais, de acordo com os órgãos especializados que nela estão presentes (POMMER, 2003).

Na botânica sistêmica a videira é nominada como *Vitis* L., sendo um grupo de grande importância no Reino Vegetal. Como apresenta inúmeras espécies, as que mais se destacam com grande importância econômica na agricultura são *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera* (POMMER, 2003; GIOVANNINI, 1999).

A viticultura no Brasil é um importante ramo da fruticultura, cuja produção significativa encontra-se concentrada nas regiões Sul, Nordeste e Sudeste. A região Sul do país é considerada a maior produtora de uva. As regiões Nordeste e Sudeste destacam-se quanto a produção de uvas de mesa (SILVA; CORREIA, 2004). A uva 'Niagara Rosada', uma das uvas de mesa mais apreciada no país, é resultado de uma mutação somática da 'Niagara Branca', sendo inclusive uma das uvas mais plantadas no estado de São Paulo (POMMER, 2003; de SOUZA, 2002).

A cultura da videira tem vários problemas de doenças (AMORIN & KUNIYUKI, 1997). No entanto, para a videira 'Niagara Rosada', especificamente no estado de São Paulo, há poucos estudos quanto à incidência de doenças.

Uma doença grave, complexa e de difícil controle em videira no mundo é a doença de Petri. A mesma é causada pela combinação de vários fungos, sendo os mais importantes *Phaeoconiella chlamydospora* e várias espécies de *Phaeoacremonium* (SCHECK et al., 1998). Segundo Mostert et al. (2006) e Aroca; Raposo (2009), essa doença ocorre em vinhedos jovens e os sintomas macrovisuais são: atraso no desenvolvimento, baixo vigor, entrenós curtos, folhas amareladas, murchas ou com clorose e baixa produção de cachos, levando ao declínio e morte da planta. Outro sintoma peculiar da doença é o aparecimento de estrias escuras e exsudação de goma escura nos vasos da região do colo das plantas (CHICAU, 2006; SÔNEGO et al., 2005).

Como visto na literatura, há relatos desta doença em várias partes do mundo (CROUS; GAMAS, 2000; ESKALEN; GUBLER, 2001; GATICA et al., 2001; EDWARDS ; PASCOE, 2004; AROCA ; RAPOSO, 2009; CHICAU, 2006). No Brasil, essa doença foi relatada apenas no Rio Grande do Sul (GARRIDO et al., 2004; ALMANÇA et al., 2013) e no Nordeste (CORREIA et al., 2012).

Lorena et al. (2001), por meio de exames microscópicos, relataram que *P. chlamydospora* inicia a infecção pelas raízes e requer nove meses para colonizar até 25 cm

do sistema vascular do colo das videiras. Esse progresso lento no vaso das plantas deve-se às respostas de defesa das videiras. Essa constatação revela a presença do fungo na região do colo, o que caracteriza problema no porta-enxerto e não na copa, mas isso ainda carece de novas validações.

A forma mais favorável para que ocorra a disseminação da doença no campo consiste no intercâmbio ou plantio de material propagativo infectado (mudas), vindo a partir de plantas matrizes de enxertos e porta-enxertos conhecidos como cavalo (REGO, 1998; BUENO et al., 2010). Assim, estudos devem ser feitos com os porta-enxertos, quer seja na obtenção de algum com certo nível de resistência à doença, ou desinfestando os materiais utilizados no sistema de produção de mudas.

Com relação as fontes potenciais de resistência aos patógenos da doença de Petri, um número significativo de estudos (GRAMAJE; ARMENGOL, 2011) indica que os principais porta-enxertos e copas de videira são suscetíveis aos fungos causadores da doença. No entanto, em alguns trabalhos que envolveram a inoculação artificial dos patógenos da doença de Petri, detectou-se contrastes entre as suscetibilidades de alguns porta-enxertos e copas de videira (GRAMAJE et al., 2010).

O tratamento padrão de porta-enxertos dormentes e explantes, que são utilizados no sistema de produção de mudas, consiste em submergir estacas em água quente (HWT, *heat water treatment*, 50°C por 30 minutos). Publicações do início da última década parecem assegurar que tratamentos térmicos com essa duração seguramente inibem a maioria dos patógenos fúngicos e bacterianos, e não danificam gemas e brotos. No entanto, mais recentemente, os autores (GRAMAJE; ARMENGOL, 2011) mostram-se mais cautelosos a respeito do risco de dano térmico às partes meristemáticas de explantes de videira, promovido pelo tratamento HWT.

Aparentemente, a redução da doença de Petri promovida por HWT, com resfriamento (HALLEEN et al., 2007), demonstrou, com clareza, o potencial dessa medida de controle para erradicação dos patógenos que causam infecções em material propagativo, um fator crucial para a dispersão da doença no campo. No entanto, de maneira oposta, considerando-se os patógenos da doença de Petri, também há relatos de insucesso no uso do tratamento térmico para tal controle (WHITING et al., 2001; ROONEY et al., 2001). Sendo assim, essa técnica precisa de uma validação quanto ao seu sucesso no controle dos fitopatógenos da doença de Petri e se essa técnica danifica ou não o material para posterior uso no sistema de produção de mudas.

2. JUSTIFICATIVAS

A viticultura tem grande importância econômica para o estado de São Paulo, em função do cultivo da uva de mesa 'Niagara Rosada'. A produção de vinhos artesanais e industrializados e o grande consumo da variedade na sua forma *in natura* geram renda e emprego às pessoas que utilizam desta cultura para o seu sustento.

Há poucos estudos com a uva 'Niagara Rosada' quanto à incidência de doenças, mais especificamente com relação a doença de Petri, que afeta vinhedos jovens (MOSTERT et al., 2006). Sendo assim, um levantamento em todo o Estado se faz necessário.

Os estudos sobre o local de colonização natural e predominante dos fungos causadores da doença de Petri, em diferentes partes da uva 'Niagara Rosada,' são escassos e necessários, e estes são importantes para direcionar pesquisas para materiais de copa ou para porta-enxertos.

Estudos feitos por Gramaje; Armengol (2011) mostram que os principais porta-enxertos e copas de videira apresentam uma suscetibilidade com os fungos causadores da doença de Petri. No entanto, ao se fazer inoculação artificial dos patógenos da doença de Petri, detectou-se contraste dos porta-enxertos e copa, culminando com a descoberta de uma certa resistência em material que contém o cruzamento de *V. riparia* x *V. berlandieri* (SO4) (Gramaje et al., 2010). Sendo assim, os porta-enxertos brasileiros desenvolvidos e em desenvolvimento precisam ser testados quanto à resistência aos fitopatógenos da doença de Petri.

A forma principal de disseminação da doença de Petri é através do plantio de mudas infectadas nos vinhedos e, também, o vento e a chuva podem disseminar os propágulos dos fitopatógenos a longas distâncias e estes também têm mecanismos próprios que conseguem lançar seus conídios para o ambiente (SURICO et al., 2006; QUAGLIA et al., 2009). Sendo assim, o desenvolvimento de mudas sadias de videira deve ser um grande foco de estudos.

Conhecimento da ocorrência da doença de Petri no estado de São Paulo, principalmente na uva de mesa 'Niagara Rosada', epidemiologia da doença e medidas para o seu manejo serão possíveis com a realização deste trabalho.

3. OBJETIVOS

Gerais:

Verificar a ocorrência da doença de Petri na videira 'Niagara Rosada' no estado de São Paulo, o local de colonização natural dos fitopatógenos na planta e estudar algumas medidas de manejo para a doença.

Específicos:

- Efetuar um levantamento de ocorrência da doença de Petri na videira 'Niagara Rosada', no estado de São Paulo e identificar os agentes causais ao nível de gênero e espécie;
- Verificar o local de colonização natural e predominante dos fungos da doença de Petri, em diferentes partes da videira 'Niagara Rosada';
- Proceder uma triagem em porta-enxertos de 'Niagara Rosada' quanto à resistência ao fungo *P. chlamydospora*, principal patógeno da doença de Petri;
- Realizar ensaio in vitro, simulando a solarização, a solarização mais incorporação de brássica (biofumigação) e termoterapia, visando a desinfecção de mudas de videira de 'Niagara Rosada' infectadas artificialmente com o fungo *P. chlamydospora*;
- Realizar ensaio in vitro, simulando a solarização, a solarização mais incorporação de brássica (biofumigação) e termoterapia em estacas de videira do porta-enxerto IAC 766, para verificar os efeitos destas técnicas de desinfestação no desenvolvimento do sistema radicular.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1) Viticultura

A videira, *Vitis* L., pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Rhamnales e família Vitacea (POMMER, 2003). Dentre as várias espécies de videira, as que apresentam uma grande importância econômica na agricultura são *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera*, tanto na produção de vinhos, quanto no consumo “in natura”. A primeira espécie tem origem americana e apresenta características mais rústicas quanto à suscetibilidade às doenças e a segunda é de origem européia, sendo responsável por mais de 90% dos vinhos que são fabricados no mundo (GIOVANNINI, 1999).

A organografia da videira é representada pela raiz e pela parte aérea, que pode se distinguir o tronco ou cepa e os ramos, onde se desenvolvem as gemas, folhas, gavinhas, flores, frutos e sementes (POMMER, 2003).

A principal função da raiz é absorver do solo a água e elementos que são necessários à cepa, que serão transportados até as folhas pelos vasos do xilema. O caule pertence à parte aérea da planta. De acordo com as posições do ramo, onde ocorrem as folhas são denominados como nós, as porções entre os nós, que apresentam comprimentos diferenciados, são os entrenós. As folhas podem ser inseridas sobre os nós, dispostas no mesmo plano ou opostas, e estes órgãos são de grande importância, pois, junto com as raízes, tem a função de nutrir a planta. As gavinhas são órgãos filiformes, homólogos aos cachos, com a função de sustentação da planta, uma vez que os cachos estão inseridos do lado oposto à folha. (POMMER, 2003).

As bagas pedunculadas e reunidas em cachos são propriamente ditas como frutos da videira. Estes cachos são de tamanho variável e podem se apresentar compactos ou soltos, dependendo do número de bagas fixados a eles. A cor das bagas vai desde o verde até o preto, que pode passar pelo amarelo, rosado, vermelho e azulado. O cultivo é feito através de enxertia. Um fator importante que determina o êxito de uma enxertia é a compatibilidade ou afinidade entre o porta-enxerto e o enxerto, ou se apresentam a predisposição de permanecerem juntos. Os porta-enxertos (cavalos) não têm valor comercial, pois não produzem frutos ou os cachos são com bagas pequenas. No entanto, os porta-enxertos são vigorosos e com sistema radicular resistente às pragas e situações

adversas do solo, e transmitem o seu vigor e resistência para as variedades que serão enxertadas (copas).

A viticultura no Brasil está em um momento de transformação, pois se trata de uma atividade de grande importância para a sustentabilidade da pequena propriedade no país, se tornando relevante no que diz respeito ao desenvolvimento de algumas regiões produtoras de uvas, uma vez que há a oportunidade de gerar empregos (MELLO, 2015). A uva no país é cultivada com as seguintes finalidades: produção de sucos e fermentados (vinho), consumo “in natura” ou como uva passa (MELLO, 2013; CONDE et al., 2007).

A França é o maior produtor de uva do mundo, acompanhado da Itália, Espanha e Estados Unidos. O Brasil encontra-se no 19º lugar, com uma produção de 1.388.859 toneladas de uva, com área plantada de 78.450 ha em 2014 (FAO, 2014). A maior parte da produção brasileira concentra-se no estado do Rio Grande do Sul, com uma produção de 876.286 toneladas em 2015, em uma área plantada de 50.743 ha. Outros estados produtores são Pernambuco com 237.367 t e São Paulo com 142.063 t (Tabelas 01 e 02) (IBGE, 2016).

A região Sul do Brasil, mais precisamente o estado do Rio Grande do Sul, apresenta-se como o maior produtor de uva no país. A produção de uva no Nordeste do país está concentrada mais precisamente nos sertões dos estados da Bahia e de Pernambuco, principalmente no submédio do rio São Francisco, considerada uma viticultura tropical irrigada e além da produção das uvas de mesa há a produção de vinhos (da SILVA, CORREIA, 2004). O Nordeste contribuiu com uma produção de 317.904 toneladas de uva, em uma área plantada de 9.854 ha no ano de 2015 (TABELAS 01 e 02) (IBGE, 2016).

TABELA 01: Produção de uvas no Brasil, em toneladas.

Estado/ Ano	2012	2013	2014	2015
Pernambuco	224.758	228.727	236.767	237.367
Bahia	62.292	52.808	77.504	77.401
Ceará	767	864	573	658
Paraíba	0	0	4.036	2.196
Minas Gerais	10.107	12.734	11.557	12.679
Espírito Santo	0	0	2.226	2.327
São Paulo	176.902	172.868	146.790	167.613
Paraná	70.500	79.052	80.910	80.000
Santa Catarina	70.909	53.153	66.106	69.250
Rio Grande do Sul	840.251	808.267	812.537	876.286
Mato Grosso do Sul	0	0	186	981
Mato Grosso	0	0	1.370	981
Goiás	4.570	4.381	3.230	3.390
Distrito Federal	0	0	1.845	1.480
BRASIL	1.461.056	1.412.854	1.445.637	1.532.609

Fonte: IBGE (2016)

TABELA 02: Área plantada de uva no Brasil, por hectares.

Estado/ Ano	2012	2013	2014	2015
Pernambuco	6.813	6.787	6.833	6.814
Bahia	2.624	2.357	2.864	2.856
Ceará	44	45	30	40
Paraíba	0	0	202	122
Minas Gerais	803	828	834	858
Espírito Santo	0	0	138	148
São Paulo	9.750	8.812	8.308	8.479
Paraná	5.821	5.276	5.580	4.800
Santa Catarina	5.130	4.965	4.989	4.845
Rio Grande do Sul	51.182	50.056	51.005	49.737
Mato Grosso do Sul	0	0	16	51
Mato Grosso	0	0	57	51
Goiás	166	163	138	131
Distrito Federal	0	0	77	74
BRASIL	82.333	79.289	81.071	79.006

Fonte: IBGE (2016)

Como a viticultura se tornou importante para algumas regiões do Brasil, criou-se um segmento que cuida da parte turística, o enoturismo, que tem como base passeios que as pessoas fazem para apreciar a cultura da videira e os produtos que dela podem ser feitos, tais como o vinho, suco de uva, espumante e até mesmo cosmético (xampu, condicionador, cremes para a pele) (ANSARAH, 2005). Este tipo de turismo vem sendo praticado em várias regiões do Brasil produtoras de uva e vinhos. Especificamente na região de São Joaquim - Santa Catarina, essa atividade aproveita as características próprias da região (montanhas, etc). E quanto ao cultivo da vinha e a produção de vinhos, representando grande potencial para o enoturismo e despertando interesse de pessoas que já estão na região, ou até mesmo atraindo visitantes de outras localidades do país em períodos do ano em que as vinhas estejam produzindo frutos (LOSSO; PEREIRA, 2010). No estado de São Paulo, este tipo de atividade está se tornando cada dia mais presente nos municípios produtores de vinhas, principalmente na bacia do Jundiaí. Sendo assim, isto é uma outra finalidade da videira no país.

A viticultura de grande expressão no estado de São Paulo continua sendo o cultivo de uvas comuns de mesa, predominando as variedades 'Niagara Rosada' e 'Niagara Branca', com 8.308 hectares de área plantada e produção de 151.960 toneladas de uva. A produção, basicamente com a variedade 'Niagara Rosada', destina-se ao consumo *in natura*, mas também há a produção de vinhos artesanais, sucos e até aguardantes dos resíduos das bagas. Essa produção está concentrada nas regiões leste e sudoeste do estado, abrangendo os municípios de Jundiaí, Vinhedo, Louveira, Indaiatuba, Sorocaba, Porto Feliz e São Miguel do Arcanjo, e também em Jales, região norte do estado (MELLO, 2013; IBGE, 2015; BUENO et al., 2010).

Recentemente, os viticultores vêm relatando declínio de plantas jovens e encurtamento do período de exploração da cultura, que atualmente por volta de até 10 anos.

4.2) A variedade Niagara Rosada

A variedade de videira 'Niagara Rosada' é resultado de uma mutação somática natural da 'Niagara Branca', originária dos Estados Unidos, a partir da hibridação de Concord (*Vitis labrusca* L.) polinizada com Cassady (*Vitis labrusca* x *Vitis vinifera*). A 'Niagara Rosada' foi encontrada pelo viticultor Aurelio Frazini, localizado no então distrito de Louveira, município de Jundiaí, São Paulo, no ano de 1933. Esta videira é de fácil cultivo, tem boa resistência à

podridão cinzenta, causada por *Botrytis cinerea*, e ao oídio (*Oidium nectator*) (de SOUZA, 2002; MAIA; CAMARGO, 2012; POMMER, 2003) (Figura 01).

A 'Niagara Rosada' não se distingue da forma primitiva da 'Niagara Branca', a não ser próximo ao período de maturação dos frutos, apresentando-os com cor viva e atraente tonalidade rosa. As duas variedades são similares quanto ao vigor da planta, à alta fertilidade de gemas, tamanho e forma dos cachos e bagos (de SOUZA, 2002).

Após seu surgimento na década de 1930, a 'Niagara Rosada' se expandiu por diversas regiões vitícolas, principalmente no estado de São Paulo, ocupando um grande destaque dentro da viticultura brasileira, sendo a uva mais popular de mesa. Essa variedade é plantada nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Minas Gerais (de SOUZA, 2002).



Foto: J. Dimas. G. M., 2003

FIGURA 01: Cachos de uva 'Niagara Rosada'

4.3) Doença de Petri em videira

Entre as diversas doenças ocasionadas por fungos de solo, na cultura da videira, destaca-se a doença de Petri, relatada pela primeira vez no início do século XX, na Sicília, Itália (PETRI, 1912).

A doença de Petri é considerada grave, complexa e de difícil controle em videiras no mundo. Ela é causada por uma combinação de vários fungos, sendo os mais importantes o fungo *Phaeomoniella chlamydospora* e várias espécies de *Phaeoacremonium* (SCHECK et al., 1998).

Há relatos de dezessete espécies de *Phaeoacremonium* encontradas em videira. Destas, *P. aleophilum* é a mais distribuída e a mais comum em videira. No entanto, o fungo

P. chlamydospora tem sido muito mais frequentemente associado aos sintomas típicos da doença do que as espécies de *Phaeoacremonium* (MUGNAI et al., 1999).

Vários fungos hifomicetos foram recentemente isolados de tecido vascular, sintomático ou não, de plantas com doença de Petri na África do Sul (HALLEEN et al., 2007). Dentre esses fungos, há a descrição de *Acremonium* cf. *charticola*, *Acremonium* cf. *ochraceum*, *Cadophora luteo-olivacea*, *Phialemonium* cf. *curvatum*, *Pleurostomophora richardsiae*, *Phaeoacremonium krajdennii*, *P. parasiticum*, *P. subulatum*, *P. venezuelense* e *P. viticola*. Ensaio em mudas envolvendo inoculação artificial destes hifomicetos e mais *P. aleophilum* e *P. chlamydospora*, tanto em condições de casa de vegetação, quanto em campo, foram realizados para comprovar a patogenicidade desses novos fungos hifomicetos. Em ambas condições, o fungo mais agressivo e frequentemente isolado foi *P. chlamydospora*. No entanto, em comparação com o controle negativo, todos os fungos hifomicetos, recentemente isolados, foram capazes de infectar, colonizar e produzir lesões diferentes em videira (HALLEEN et al., 2007).

Há relatos de doença de Petri, em videira, em várias partes do mundo (CROUS ; GAMAS, 2000; ESKALEN ; GUBLER, 2001; GATICA et al., 2001; EDWARDS ; PASCOE, 2004; AROCA ; RAPOSO, 2009). No Brasil há relatos desta doença no Rio Grande do Sul, nas variedades 'Niagara' e 'Bordô' (GARRIDO et al., 2004; ALMANÇA et al., 2013) e no Nordeste, na variedade 'Isabel' (CORREIA et al., 2012). No Sudeste, especificamente no estado de São Paulo, não houve ainda um levantamento com o intuito de se verificar a existência desta doença em videiras no estado, principalmente na variedade Niagara Rosada, a principal variedade de uva de mesa.

4.4) Identificação de fitopatógenos em videiras

O procedimento mais comum para identificar fitopatógenos é a utilização de métodos clássicos de isolamento em cultura pura e, posteriormente, a descrição de suas características morfológicas e culturais. Todo este processo é finalizado com o auxílio de chaves dicotômicas. Isto, no entanto, é difícil e moroso (PINTO, 2010).

Segundo Pinto (2010), o isolamento e a identificação dos fungos da doença de Petri não são fáceis pelos métodos clássicos de isolamento em meio de cultura; assim, utiliza-se também a técnica de identificação molecular.

No ano de 1998, o sequenciamento das regiões ITS do DNA ribossomal de isolados identificados como *Phaeoacremonium* spp., confirmou claramente divergências entre eles,

ou seja, já apontava várias espécies dentro do gênero (DUPONT et. al.,1998). Com base neste estudo, em dados de sequenciamento (ITS1, 5.8S, ITS2, β -tubulina) e caracterizações culturais e morfológicas, Crous; Gams (2000) descreveram, pela primeira vez, o gênero *Phaeomoniella* e a espécie *P. chlamydospora*.

Assim, além da caracterização morfológica e cultural, a identificação molecular, principalmente com sequências das regiões ITS, partes do gene do fator de alongação 1- α (EF) e de partes do gene da β -tubulina, é importante para a correta identificação dos fungos da doença de Petri.

4.5) Etiologia de *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai) Crous & W.Gams, comb., Phytopa. Medit.39:1, 2000

O micélio de *P. chlamydospora* consiste em hifas septadas e ramificadas, que aparecem isoladas ou em grupos de até dez, tuberculadas com verrugas, tornando-se mais claras em direção à região conidiogênica. Os clamidósporos podem ser abundantes ou escassos (o que vai depender do isolado), globosos a subglobosos, quase sempre isolados, raramente em cadeias, com coloração de olivácea a castanha-esverdeada, lisos e tuberculados (CROUS; GAMS, 2000). Os conidióforos eretos, simples e cilíndricos, podem surgir de hifas aéreas ou submersas, com uma célula apical de forma alongada, com parede espessa na base, mas com o restante da parede fina e castanha, mais clara em direção ao ápice, possuindo até três septos. As fiálides (células conidiogênicas) são isoladas, terminais e monofialídicas, sub-hialinas, lisas, de forma alongada ou subcilíndricas. Os conídios se apresentam agregados com forma globosa e mucilaginosa nos ápices das células conidiogênicas, oblongos a elipsoidais, ovóides e direitos (PINTO, 2010) (Figura 02).

Foto: Marcus Almança, 2013

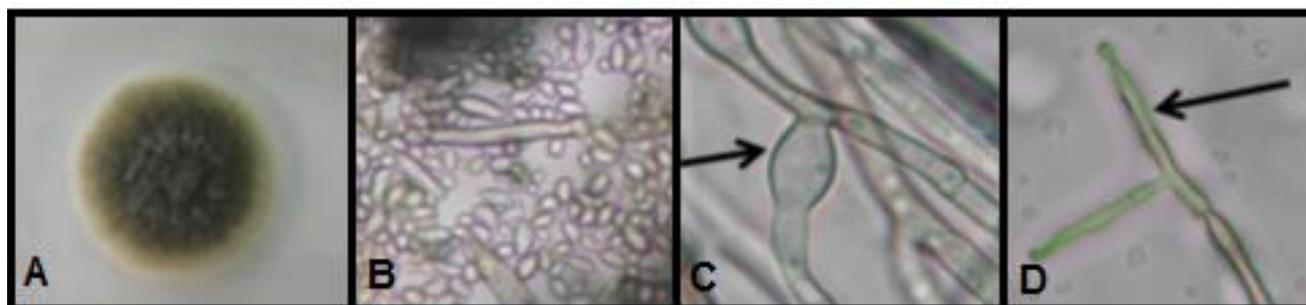


Figura 02: (A) Características morfológicas de um isolado de *Phaeomoniella chlamydospora*: Colônia desenvolvida em meio de cultura de batata dextrose ágar (20 dias); (B) Conídios em aumento de 400x; (C) Clamidósporos em aumento de 1000x (indicação com setas) e (D) conidióforo em aumento de 400x (indicação com setas).

4.6) Etiologia de *Phaeoacremonium aleophilum* W. Gams, Crous, M. J. Wingf. & Mugnai Mycol.88:789.1996

O micélio de *P. aleophilum* pode apresentar hifas ramificadas e septadas, isoladas ou agregadas. A coloração da colônia é castanho e vai se tornando castanho pálido à hialino nas suas extremidades, podendo ser liso, verrugoso ou ligeiramente verrugoso (PINTO, 2010). Os conidióforos podem ser ramificados ou simples, aéreos ou submersos, são eretos, quase cilíndricos quando não ramificados. Os conídios são hialinos, podem ser agregados em estruturas redondas e viscosas, com formas variadas sendo elas elipsoidais ou cilíndricos, ocasionalmente reniformes. Na fase sexual, conhecida como *Tognina minima*, ocorre à formação de peritécio. A cor da colônia em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) é variável de castanho a cinzento e a textura da mesma varia a felpuda ou lanosa em função da espécie (MOSTERT et al., 2006) (Figura 03).

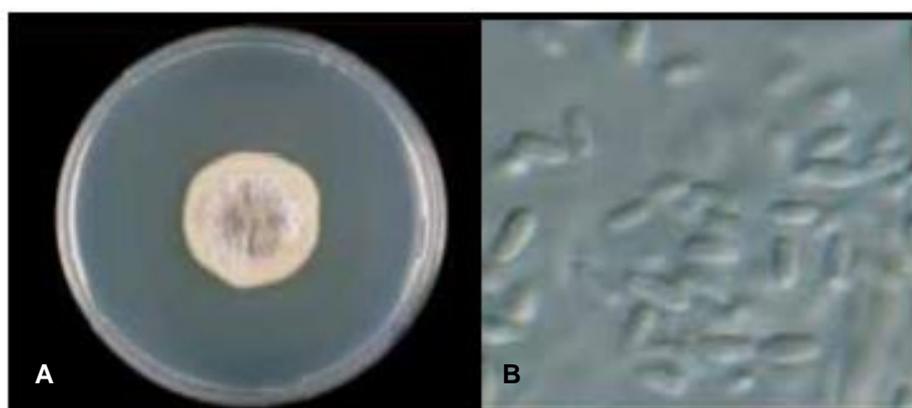


Figura 03: (A) Características morfológicas de um isolado de *Phaeoacremonium aleophilum*. Colônia desenvolvida em meio de cultura de batata dextrose ágar (16 dias); (B) Conídios em aumento de 400 x.

Fonte: MOSTERT (2006).

4.7) Sintomatologia da doença de Petri em videira

A doença de Petri ocorre em vinhedos jovens (GATICA et al., 2001; MOSTERT et al., 2006).

A sintomatologia da doença consiste no desenvolvimento inicial comprometido e no reduzido vigor vegetativo, seguidos de interrupção de crescimento e morte da planta

(declínio). Plantas afetadas revelam ainda menor diâmetro do tronco, encurtamento de internódios, reduzidas quantidades de folhagem e de área foliar.

Os sintomas foliares, desenvolvidos de três a cinco anos após o transplântio, incluem cloroses internervais, necroses das extremidades e murchas, que podem resultar em desfolha prematura (CORREIA et al.,2012; SCHECK et al. 1998), (Figura 04).

Quando observados em seção transversal, os vasos do xilema do colo (parte de baixo do porta-enxerto) apresentam manchas ou pontos negros ou marrom escuros (Figura 05). Em seção longitudinal, os elementos de vaso mostram estrias escurecidas. Essas estrias de vasos obstruídos ocorrem próximas à medula, que também pode estar afetada e escurecida (AROCA; RAPOSO, 2009).

Na parte interna, é possível observar o escurecimento de vasos do xilema com produção associada de tiloses de massas de goma escura, o que resulta em oclusão de elementos traqueais. Os fungos da doença podem ser isolados a partir de tecido lenhoso, próximo aos elementos traqueais obstruídos, e a forma como esses patógenos habitam a região do apoplasto do tecido vascular vai depender do potencial hídrico do tecido naquele ponto, uma vez que os patógenos dependem do hospedeiro para obter água e nutrientes (BRUEHL; KAISER, 1996).

Os sintomas podem ser agravados durante a fase patogênica, caso as plantas estejam submetidas a estresses diversos, em particular o estresse hídrico. O bloqueio de vasos do xilema no processo de infecção acentua, ainda mais, a restrição hídrica da copa, levando à interrupção de fornecimento de água e nutrientes para as partes vegetativas, o que agrava os sintomas durante o período de maior demanda por água. Outros fatores relacionados ao ambiente, como o desequilíbrio nutricional, a má drenagem, a compactação do solo, o preparo inadequado do solo e da cova para o plantio podem contribuir para o aumento da ocorrência da doença (GRAMAJE; ARMENGOL, 2011).



Figura 04: A e B – Detalhe da sintomatologia da Doença de Petri, em folhas de videira.

Fonte: SCHECK et al. (1998).

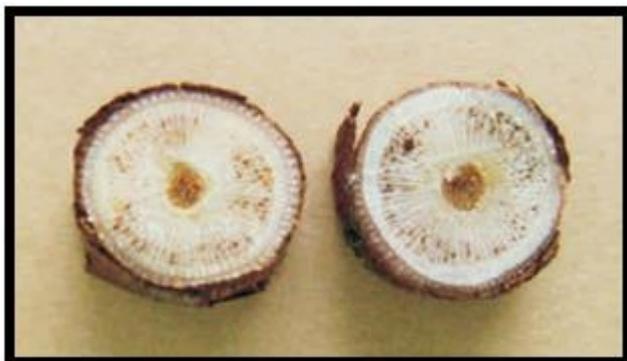


Figura 05: Detalhe da sintomatologia da doença de Petri, em videira, no sistema vascular da região do colo, onde se pode observar pontuações escuras e exsudações.

Fonte: CHICAU (2006).

4.8) Meios de disseminação da doença de Petri em videira

Paralelamente à incorporação de mudas infectadas no momento da instalação do vinhedo, os fungos associados às doenças “de Petri” e “Esca” (*Phaeoacremonium* spp., *Phaeomoniella chlamydospora* e *Fomitiporia* sp.) têm mecanismos próprios para lançar esporos no ar, após a chuva. Esses esporos são viáveis e podem infectar plantas de videira com ferimentos de poda e outras injúrias físicas (SURICO et al., 2006; QUAGLIA et al., 2009).

Experimentos envolvendo lâminas com cobertura gelatinosa, dispostas próximas a ramos e troncos infectados de videira, mostraram capturas de esporos de *Phaeoacremonium* spp. e de *P. chlamydospora* (ESKALEN; GUBLER, 2001).

Estudos citados por Rego et al. (1998) mostraram que a forma mais favorável para a disseminação da doença consiste no intercâmbio de material propagativo infectado (mudas), a partir de plantas matrizes de enxerto e porta-enxerto (cavalo).

A disseminação da doença também pode ocorrer em processos de enxertia. Na época do plantio, as extremidades basais (especialmente a área da medula) da maioria dos porta-enxertos estão parcial ou totalmente expostas à infecção por patógenos de solo. Calos radiculares frequentemente quebram durante o processo de plantio, resultando em pequenos ferimentos que favorecem a infecção (REGO et al., 1998).

Conforme comentado, os sítios de infecção para esses fungos são geralmente ferimentos que expõem tecidos parenquimatosos corticais ou vasculares, em plantas jovens

ou maduras de videira. Além disso, em ambiente de viveiro, existe a possibilidade de estruturas do patógeno passarem dos matrizeiros às estacas progênes, por meio de esporos ou micélio localizados tanto na seiva ou em contaminações externas na casca, via lançamento de ascósporos a partir de peritécios. No entanto, esses patógenos sobrevivem no solo e possuem também a capacidade de infectar raízes jovens diretamente, através dos ferimentos ocasionados no plantio das mudas (GUBLER et al., 2010).

Por outro lado, existem evidências de redistribuição interna de conídios de *Phaeoacremonium* spp. através de vasos de xilema e de crescimento micelial ativo de *P. chlamydospora* dentro de tecidos da copa da planta. Por hipótese, esporos são carreados com o fluido do xilema em plantas matrizes infectadas, as quais podem oferecer varas contaminadas. Por exemplo, em um monitoramento de vinte meses, ramos infectados retirados próximos ao ápice da planta passaram de percentuais reduzidos (próximos de zero) para 53% de infecção, em um mesmo nível de incidência (55%) de segmentos extraídos em um ponto distante do ápice da planta (WHITEMAN et al., 2007). Além disso, Lorena et al. (2001) mencionam que *P. chlamydospora* inicia a infecção pelas raízes e requer nove meses para colonizar os primeiros 20-25 cm do tronco das plantas. O lento processo do fungo no sistema vascular é devido às respostas de defesa da videira, tais como produção de tiloses e outras.

4.9) Medidas de controle da doença de Petri em videira

Até o presente momento não há medidas curativas para controlar a doença depois de instalada no vinhedo.

Segundo Camargo e Bergamin Filho (1995), o emprego da resistência genética no controle de doenças vegetais representa um dos mais significativos avanços tecnológicos da agricultura. O uso de cultivares resistentes é o método de controle preferido pelos agricultores, por ser mais barato e de fácil utilização.

Com relação a potenciais fontes de resistência à doença de Petri, um número significativo de estudos (GRAMAJE; ARMENGOL, 2011) indica que os principais porta-enxertos e copas de videira são suscetíveis aos fungos causadores da doença. No entanto, nos trabalhos envolvendo inoculação artificial dos patógenos da doença de Petri, detectaram-se contrastes entre tais suscetibilidades dos principais porta-enxertos e copas de videira, com destaque para as menores suscetibilidades do genótipo 161-49 Couderc e cruzamentos entre *V. riparia* x *V. berlandieri* (GRAMAJE et al., 2010). Há porta-enxertos de

videira brasileiros desenvolvidos e em desenvolvimento, tanto no IAC Frutas/APTA, quanto na Embrapa Uva e Vinho, que ainda não foram testados quanto à resistência à doença de Petri.

Os tratamentos com *Trichoderma* (Trichopel™/Trichoflow™), controle biológico, mostraram-se ineficientes ou inconsistentes, pois preveniram a infecção por *P. chlamydospora* em, apenas, uma estação. Uma possível razão para isso pode estar relacionada à colonização sistêmica ineficiente nas extremidades das estacas dos porta-enxertos, como foi demonstrado pelo baixo percentual de reisolamentos, em plantas tratadas, por esse agente de controle biológico (HALLEEN et al., 2007). No entanto, plantando-se material sadio e protegendo, ano a ano, locais de poda com *Trichoderma*, tal tratamento poderá ser eficaz em manter o vinhedo sadio.

O tratamento padrão de porta-enxertos dormentes e explantes consiste em submergir estacas em água quente (HWT, *heat water treatment*, 50°C por 30 minutos). Publicações do início da última década parecem assegurar que tratamentos térmicos com essa duração seguramente inibem a maioria dos patógenos fúngicos e bacterianos, e não danificam gemas - brotos. No entanto, mais recentemente, os autores (GRAMAJE; ARMENGOL, 2011) mostraram-se mais cautelosos a respeito do risco de dano térmico às partes meristemáticas de explantes de videira, promovido pelo tratamento HWT.

Aparentemente, a redução da “doença de Petri” promovida por HWT, com resfriamento (HALLEEN et al., 2007), demonstrou, com clareza, o potencial dessa medida de controle para erradicação dos patógenos que causam infecções em material propagativo, um fator crucial para a dispersão da doença no campo.

No início, o tratamento térmico foi recomendado para erradicação de *Phytophthora cinnamomi* (VON BROEMBSSEN; MARAIS, 1978), *P. chlamydospora* (FOURIE; HALLEEN, 2004) e *Meloidogyne javanica* (BARBERCHECK, 1986), em estacas dormentes. No entanto, de maneira oposta, considerando-se os patógenos da “doença de Petri”, também há relatos de insucesso no uso do tratamento térmico para tal controle (WHITING et al., 2001; ROONEY et al., 2001).

Dessa forma, parece que a questão do tratamento térmico, em propágulos de plantas de videira, apresenta contradições e precisa de validação, visando a sua recomendação como uma estratégia integrada de manejo da doença, em viveiros de plantas de videira e de produção de mudas.

Na África do Sul, Halleen et al. (2007), por duas estações consecutivas de cultivo de videira, utilizaram produtos químicos, biológicos e físicos para o controle de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. Os autores verificaram a influência das condições ambientais das estações de 2002 a 2003 e de 2003 a 2004 sobre as respostas de incidência

da doença, nas plantas jovens de videira. No entanto, níveis mais elevados de incidência da doença foram evidenciados por porta-enxertos de controle tratados com água (média de 21,7% de 2003 a 2004), em ambas as estações. Todos os tratamentos (incidência média entre 0 e 10,7%) promoveram redução (a maioria não significativa) de infecções em porta-enxertos e raízes, excetuando-se a mistura de *Trichoderma harzianum*, Trichoflow-T (18,0%) e flusilazole (15,3%).

4.10) Solarização e Biofumigação

A solarização é um método desenvolvido por Katan (1976), que consiste, basicamente, na cobertura do solo umedecido em pré-plantio, com um filme plástico transparente, durante o período de maior radiação solar (verão), sendo relatada como eficiente no controle de diversos fitopatógenos de solo (AMBRÓSIO, 2006).

Este método atua na inativação dos patógenos, através de efeitos diretos, causados pelas altas temperaturas, e indiretos, favorecendo o controle biológico e a supressividade do solo (SOUZA, 1994). Porém, de acordo com alguns pesquisadores, essa técnica, quando utilizada isoladamente, não controla efetivamente alguns fungos fitopatogênicos habitantes do solo como *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* e *Plasmodiophora brassicae* (SOUZA ; BUENO, 2003). Uma das medidas que vem sendo utilizada e que potencializa o uso deste método de controle e que, ainda, diminui o tempo necessário para o processo, é a incorporação de partes vegetais de culturas específicas ao solo seguida de solarização (GAMLIEL ; STAPLETON, 1993a; SOUZA, 2004; SOUZA ; BUENO, 2003; AMBRÓSIO, 2006; AMBRÓSIO et al.; 2008).

Entre os materiais vegetais, as brássicas, em especial, quando em associação com a solarização, são umas das mais pesquisadas e possíveis de serem empregadas para o controle de doenças causadas por fitopatógenos de solo (SUBBARAO ; HUBBARD, 1996; MORRA ; KIRKEGAARD, 2002). Há relatos na literatura de uma série de patógenos afetados por esta associação: *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (RAMIREZ-VILLAPUDUA ; MUNNECKE, 1988), *Pythium ultimum* e *Sclerotium rolfsii* (GAMLIEL ; STAPLETON, 1993), entre vários outros fungos fitopatogênicos, citados por Souza (2004), como *Aphanomyces euteches*, *Didymella brioniae*, *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *M. phaseolina*, *Pyrenochaeta terrestris*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium cepivorum* e *Verticillium dahliae*.

Em geral, membros da família das brássicas contém, em sua composição, uma grande

quantidade e variedade de glucasinolatos (ROSA et al., 1997). Os glucasinolatos são compostos sulfúricos formados por um grupo de tioglicose, um variável carbono pertencente ao chamado grupo "R" e um óxido sulfatado. Estes compostos são nomeados de acordo com a estrutura do seu grupo "R" - aproximadamente cerca de 100 diferentes tipos de glucasinolatos já foram identificados, em diferentes tecidos vegetais (DUNCAN, 2001). Os glucasinolatos são hidrolisados por enzimas específicas, as mirosinases, no processo de decomposição dos resíduos vegetais, gerando uma série de compostos voláteis como os aldeídos formaldeído e acetaldeído e compostos de enxofre, incluindo tiocianatos e isotiocianatos (GAMLIEL ; STAPLETON, 1993b). Estes compostos voláteis, em especial o isotiocianato, quando emanado pela rápida degradação do material e retido na superfície do solo, pela cobertura plástica no processo de solarização, atua, comprovadamente, como substância fungicida, sendo letal a vários fitopatógenos de solo como observado por diversos autores (LODHA et al., 1997).

Portanto, a solarização, e a solarização associada à prévia incorporação de brássica (biofumigação), poderão ser testadas em estacas de videira infectadas com os patógenos da doença de Petri, com o intuito de controlar os mesmos, sem danificar o material para posterior plantio.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados nas dependências do Laboratório de Fitopatologia do Centro Experimental Central do Instituto Biológico / APTA.

5.1) Levantamento de ocorrência de doença de Petri na videira 'Niagara Rosada' no estado de São Paulo

5.1.1) Coleta de plantas de videira e pré-processamento

Plantas de videira 'Niagara Rosada', com suspeita de doença - declínio, foram coletadas em propriedades vitícolas localizadas nos municípios de Jales (20° 12.376 S e 50° 36.190 W), Jarinu (23° 07.761' S e 46° 40.951' W), Jundiaí (23° 07.830' S e 46° 56.853' W), Indaiatuba (23° 07.958' S e 47° 09.538' W), Louveira A (23° 06.716' S e 46° 54.857' W), Louveira B (23° 05.800' S e 46° 55.625' W), Porto Feliz (23° 17.546' S e 47° 28.252' W), São Miguel Arcanjo (23° 49.750' S e 47° 59.008' W) e Vinhedo (23° 02.430' S e 46° 58.886 W), no estado de São Paulo. As plantas apresentavam os seguintes sintomas: atraso no desenvolvimento, baixo vigor, entrenós curtos, folhas amareladas, murchas ou com clorose e, ainda, baixa produção de uva, cachos pequenos e diâmetro de tronco fino (declínio). Além destes sintomas, na região do colo, as plantas apresentavam ou não pontuações escuras e exsudações no seu sistema vascular (Figura 06). Foram coletadas três plantas na amostragem, ao acaso, por propriedade.

Foram retirados fragmentos do sistema vascular da região do colo das três plantas. O material passou ou não por procedimentos de desinfestação superficial (30 segundos em solução de álcool a 70%, um minuto em solução de hipoclorito de sódio a 1,5%, retirada do excesso de hipoclorito de sódio imergindo os fragmentos em água destilada esterilizada e secagem dos fragmentos em papel de filtro estéril), sendo, posteriormente, cortados em fragmentos menores (cinco mm), misturado o material das três plantas e plaqueados, ao acaso, em três diferentes meios de cultura para o isolamento.



Figura 06: Sintomas em videira observados no campo: (A) folha com clorose, (B) planta com baixa produtividade ou sem nenhum cacho e (C) sistema vascular da planta com pontuações escuras e exsudações, na região do colo.

5.1.2) Isolamento de fitopatógenos da doença de Petri da videira ‘Niagara Rosada’

Os meios de isolamento dos fitopatógenos da doença de Petri da videira ‘Niagara Rosada’ consistiram na utilização de placas de Petri contendo os meios de cultura Ágar-Água (AA), Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e, também, iscas de maçã-verde (BRAYFORD, 1993).

Para a isca com maçã-verde (BRAYFORD, 1993), os fragmentos de maçã foram cortados e, também, passados por desinfestação superficial. Os fragmentos ficaram por cinco minutos na solução de hipoclorito de sódio a 1,5%. Em seguida, as iscas foram colocadas sobre lâminas de vidro e este conjunto foi introduzido no interior de placas de vidro contendo papel de filtro. Todo o conjunto foi previamente esterilizado. Os fragmentos da videira desinfestados e não desinfestados ficaram, portanto, em um sanduíche de fragmentos de maçã-verde, nas placas de vidro. O papel de filtro foi umedecido com água destilada esterilizada, com o intuito de se formar câmara úmida e facilitar a germinação de eventuais estruturas de fungos nos fragmentos. Todo o conjunto ficou incubado, inicialmente, por um período de sete dias. Após isso, os fragmentos de maçã, colonizados por fungos, foram transferidos para placas de vidro contendo o meio de cultura BDA.

Para as metodologias com placas contendo os meios de cultura AA e BDA (BRAYFORD, 1993), os fragmentos de videira desinfestados ou não, foram plaqueados diretamente na superfície destes meios de cultura. Para as placas com AA, após incubação por sete dias, as colônias crescidas foram repicadas, posteriormente, para placas de vidro contendo o meio de BDA (Figura 07).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, contendo três

tratamentos (três métodos de isolamento), oito repetições e cada repetição representada por uma placa de cada meio de isolamento, com quatro fragmentos.

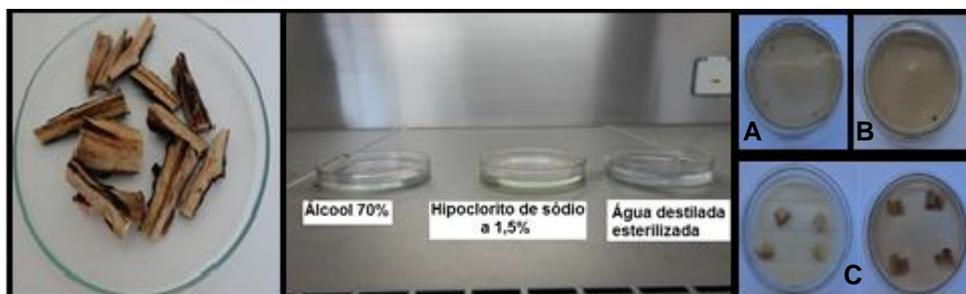


Figura 07: Amostra composta de plantas da videira 'Niagara Rosada' com fragmentos do sistema vascular da região do colo, passadas ou não pelo processo de desinfestação superficial e fragmentos menores plaqueados nos meios de cultura AA (A), BDA (B) e isca de maçã verde (C).

As placas com os três meios de isolamento foram incubadas em estufa tipo BOD, a 23°C, com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Tanto as placas contendo iscas de maçã-verde colonizadas e plaqueadas em meio de cultura BDA, quanto as colônias de AA foram repicadas posteriormente para o meio de cultura BDA, bem como os fragmentos plaqueados diretamente em BDA, ficaram incubadas nestas condições, por um período total de 21 dias - período necessário para a formação da coloração típica das colônias dos fungos no meio. Após esse período, foi efetuada a avaliação de incidência ou não dos fungos e anotada a porcentagem de incidência, tanto por placa, quanto por fragmento (Figura 08).

Para a avaliação correta foi colocado um fragmento da colônia sob uma gota de água destilada em uma lâmina de vidro. Uma lamínula foi depositada sob a colônia e o conjunto foi avaliado em microscópio ótico, com o intuito de se encontrar conídios, conidióforos ou clamidósporos característicos dos fungos da doença de Petri.



Figura 08: Isolamento de patógenos da doença de Petri da videira 'Niagara Rosada' - placas com os três meios de isolamento (BDA, AA e isca de maçã-verde) incubadas em estufa tipo BOD, a 23°C, com fotoperíodo de 12 horas.

5.1.3) Identificação molecular de fungos isolados da videira 'Niagara Rosada', com sintomas de doença de Petri e sua preservação

Para a identificação molecular de isolados de fungos obtidos, extraiu-se o seu DNA, seguindo-se o método CTAB descrito por Doyle; Doyle (1987). A reação em cadeia da polimerase (PCR), para a amplificação da região ITS-5.8S do rDNA, foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (WHITE et al., 1990). Fragmento dos genes codificadores do fator de alongação (EF) foi amplificado com o par de primers EF1 (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e EF2 (GGARGTACCAAGTSATCATGTT) (O'DONNELL et al., 1998), sendo o gene da beta tubulina (β Tubulin) com o par de primers Bt2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e Bt2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) de Glass e Donaldson (1995).

As reações foram efetuadas em termociclador PTC100 (MJ Research) de acordo com 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; Riesner (2006).

O sequenciamento foi realizado pelo método de terminação de cadeia com o reagente

BigDye 3.1 (Applied Biosystems) e sequenciador automático ABI3500 (Applied Biosystems).

Após o sequenciamento, construiu-se a árvore filogenética com a sequência dos isolados mais sequências de diferentes gêneros de fungos incidentes em videira, obtidas no GENBANK/NCBI.

Após a identificação molecular dos fungos, estes foram preservados no método de preservação Castellani, modificado por Figueiredo (1967) e, também, em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA e posterior adição de óleo mineral estéril (Figura 09).



FIGURA 09: Métodos de preservação dos fungos obtidos no isolamento da videira ‘Niagara Rosada’ com sintomas de declínio: (A) Castellani e (B) tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA com adição de óleo Nujol®.

5.1.4) Análise dos dados de ocorrência de doença de Petri na videira ‘Niagara Rosada’

Utilizou-se a análise descritiva para avaliar os dados de ocorrência da doença de Petri em ‘Niagara Rosada’ em propriedades dos municípios de Jundiaí, Jales, São Miguel Arcanjo, Porto Feliz, Vinhedo, Jarinu e Indaiatuba do estado de São Paulo. A doença de Petri foi considerada em determinada localidade se em um único fragmento da planta, plaqueado, de todas as metodologias testadas, houvesse crescimento de uma única colônia de um fitopatógeno da doença de Petri.

Para determinar o melhor meio de cultura de isolamento dos agentes causais aplicou-se a análise estatística não-paramétrica de Kruskal-Wallis, complementada com o teste de múltiplas comparações de Dunn e para verificar a eficácia do processo de desinfestação superficial nas amostras nos diferentes meios testados, aplicou-se a análise não-paramétrica de Mann-Whitney. Todos os testes foram aplicados com 1% de probabilidade.

5.2) Teste de patogenicidade dos fungos obtidos de videira 'Niagara Rosada', com sintomas da doença de Petri

Antes de realizar o teste de patogenicidade, as mudas de videira 'Niagara Rosada', enxertadas no porta-enxerto IAC766, com idade de 1 ano e meio, que foram obtidas da CATI de São Bento do Sapucaí, SP, foram analisadas para saber o nível de sua sanidade. Para tanto, o processo de isolamento foi semelhante ao do item 5.1.2, com a diferença que foram apenas plaqueados fragmentos diretamente no meio de cultura BDA. Após 21 dias de incubação, constatou-se que as mudas estavam saudáveis.

No teste de patogenicidade foi utilizado somente dois isolados, um de *Phaeoconiella chlamydospora* e outro de *Phaeoacremonium aleophilum*, ambos obtidos de propriedade do município de Jundiaí/SP. Estes dois gêneros são os principais agentes causais da doença de Petri. Além disso, estes dois isolados foram utilizados porque ambos foram considerados como padrão de cada gênero e espécie, no levantamento da doença no estado de São Paulo.

Para a produção de inóculo dos fungos *P. chlamydospora* e *P. aleophilum*, foram utilizadas placas de Petri contendo o meio de batata-dextrose-ágar (BDA) + oxitetraciclina (0,05 mg/mL), incubando-se os mesmos em câmara de crescimento a 23°C, com fotoperíodo de 12 horas, por 30 dias.

As mudas de videira foram infectadas artificialmente com o inóculo dos fungos na região do colo, mais precisamente a 15 mm acima da superfície do solo. Para tanto, um ferimento circular na região do colo foi feito com auxílio de um furador metálico de rolhas (0,5 cm de diâmetro) e, em seguida, um disco circular de BDA colonizado pelos fungos foi depositado sob o ferimento (0,5 cm de diâmetro). Gaze estéril umedecida também com água destilada esterilizada foi depositada sob o disco de BDA e tudo foi fixado com parafilme. O tratamento controle consistiu de disco de BDA sem os fungos (Pinto, 2010).

O delineamento do ensaio foi inteiramente ao acaso, contendo dois tratamentos (inoculado e não inoculado) com 10 repetições, sendo a repetição uma muda de 'Niagara Rosada' em saquinho. As mudas foram regadas diariamente e mantidas em casa-de-vegetação sem controle de temperatura, por quatro meses, para propiciar a colonização dos fungos no sistema vascular, segundo metodologia descrita por Pinto (2010).

Os parâmetros de avaliação foram a incidência de sintomas da doença nas mudas e a sua severidade, medida por meio do crescimento do fungo (cm) - estrias escuras no sistema vascular, a partir do ponto de inoculação em direção ao sistema radicular, com o auxílio de uma régua milimétrica (Pinto, 2010).

Os dados do comprimento das estrias dos fungos nas mudas foram analisados estatisticamente pelo programa ASISSTAT, após os dados serem normalizados através da transformação $\sqrt{x+0,5}$, utilizando o teste de Scott-Knott, com nível de 5% de probabilidade.

5.3) Local de colonização natural e predominante dos fungos da doença de Petri, em diferentes partes da videira ‘Niagara Rosada’

5.3.1) Coleta de plantas da videira ‘Niagara Rosada’ com doença de Petri

Três plantas doentes e inteiras de ‘Niagara Rosada’, com dois diferentes porta-enxertos (no caso IAC 766 e Riparia do Traviú), foram coletadas, ao acaso, em uma propriedade vitícola, no município de Jundiaí (23° 07.830’ S e 46° 56.853’ W), São Paulo, com histórico de detecção da doença no local.

5.3.2) Processamento, avaliação e análise estatística dos dados

Fragments do sistema vascular de cada planta da videira ‘Niagara Rosada’ coletada e de três partes diferentes de cada uma delas foram removidos, a saber: colo, parte média (40 cm acima da região do colo) e parte aérea (40 cm acima da parte média) (Figura 10). Os fragmentos foram desinfestados, conforme o item 5.1.2, com a diferença que foram apenas plaqueados no meio de cultura BDA.

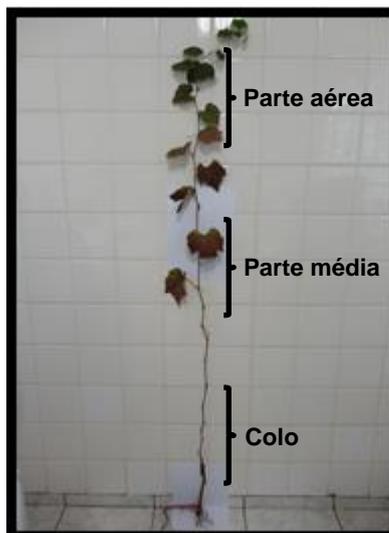


Figura 10: Detalhe das três partes diferentes da videira 'Niagara Rosada' amostradas: colo, parte média (40 cm acima da região do colo) e parte aérea (40 cm acima da parte média).

O estudo da incidência dos fungos da doença de Petri, por placa de Petri, foi realizado para se averiguar em qual parte da planta há a prevalência dos mesmos e se há ou não influência de eventuais porta-enxertos; assim foi feito um delineamento considerando-se dois porta-enxertos com três plantas randomizadas em cada porta-enxerto e avaliadas em três partes (colo, meio e aéreo). Cada repetição das partes das plantas foram representadas por cinco placas de Petri, contendo quatro fragmentos plaqueados, assim totalizando 15 repetições por planta.

As placas com os fragmentos foram incubadas em estufa tipo BOD, a 23°C, com fotoperíodo de 12 h de luz, por um período total de 21 dias.

O percentual do crescimento ou não dos fungos causadores da doença de Petri por placa foi analisado utilizando-se a técnica de variância não-paramétrica para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn (ZAR, 2009), considerando-se o nível de 5% de significância.

5.4) "Screening" para verificar resistência de porta-enxertos para 'Niagara Rosada' ao fungo *Phaeomoniella chlamydospora*

Foi instalado um ensaio em blocos casualizados, contendo, ao todo, seis blocos e cada bloco com nove porta-enxertos: IACs 313 "Tropical": cruzamento do porta enxerto Golia com a espécie *Vitis cinerea*; 572 "Jales": cruzamento entre *V. caribaea* com a variedade de porta enxerto Riparia x Rupestris 101-14 (RR 101-14); 571-6 "Jundiaí":

cruzamento de Pirovano 57 (Bicane x Poeta Matabom) com a espécie tropical *V. caribaea*; 766 "Campinas" - cruzamento do porta-enxerto Ripária do Traviú com a espécie tropical *V. caribaea*; Ripária do Traviú "106-8 Mgt": cruzamento Ripária x Cordifolia-Rupestris n°. 1 De Grasset; Ripária Gloire de Montpellier: originário de sementes de *V. Riparia*; Golia: cruzamento entre (*V. vinífera* x *V. riparia*) com *V. rupestris*; SO4: porta-enxerto *V. berlandieri* - *V. Riparia* e Paulsen: Berlandieri x Rupestris 1103, cruzamento de Berlandieri Rességuier n°. 2 com o porta-enxerto Rupestris Du Lot.) para 'Niagara Rosada', com cinco repetições, sendo a repetição representada por um vaso de dois litros, contendo uma planta inoculada com um isolado agressivo do fungo *P. chlamydospora*. O tratamento testemunha consistiu das mesmas plantas, no mesmo número de repetições, mas sem o fungo, totalizando 540 plantas no ensaio.

Esse ensaio foi instalado em casa-de-vegetação no IAC Frutas/APTA, que fica localizado no município de Jundiaí-SP.

A metodologia de inoculação e de desenvolvimento do patógeno nos porta-enxertos, foram feitas conforme o item 5.2. O parâmetro avaliado foi a medição do comprimento da estria escura causada pelo fungo no sistema vascular, em centímetros, a partir do ponto de inoculação (região do colo) em direção ao sistema radicular e, também, do ponto de inoculação (região do colo) até a parte aérea da planta, com auxílio de uma régua milimétrica (Figuras 11 e 12).

Para comprovar o papel do fungo na patogenicidade, fragmentos das estrias foram retirados de uma planta de cada porta-enxerto e de cada bloco, ao acaso; após processo de desinfestação e plaqueamento, sendo a mesma metodologia adotada no item 5.1.2, com a diferença que foram apenas plaqueado no meio de cultura BDA (quatro repetições/planta). Isto foi feito com o intuito de atestar a incidência de *P. chlamydospora* nas plantas e de se completar os postulados de Kock, para a afirmação de que aquelas estrias nos porta-enxertos foram causadas pelo principal patógeno causador da doença de Petri, o fungo *P. chlamydospora*.



Figura 11: Método de inoculação do fungo *Phaeomoniella chlamydospora* nos porta-enxertos de videira. (A) Ferimento no colo da planta; (B) Disco de micélio contendo o fungo *Phaeomoniella chlamydospora* na gaze umedecida com água destilada; (C) Discos sendo colocados no ferimento no colo da planta; (D) Disco de micélio fixados com parafilme e (E) Plantas inoculadas na casa-de-vegetação, para propiciar a colonização do fungo no sistema vascular, no período de quatro meses.



Figura 12: Comprimento da estria escura em videira causada pelo fungo *Phaeomoniella chlamydospora* no sistema vascular, do ponto de inoculação (colo) até as raízes.

Considerando o bloco como as médias das repetições, os dados de comprimento das estrias escuras por porta-enxerto (cm) foram analisados pela técnica da análise de variância para o experimento em blocos casualizados, complementada com o teste de comparação múltiplas de Tukey (ZAR, 2009), considerando-se o nível de 5% de significância.

5.5) Solarização, Biofumigação e Termoterapia para desinfectar o porta-enxerto de videira IAC 766 de ‘Niagara Rosada’ do fungo *Phaeomoniella chlamydospora* e o efeito destas técnicas no desenvolvimento do sistema radicular

5.5.1) Solarização, Biofumigação e Termoterapia para desinfectar o porta-enxerto de videira IAC 766 de ‘Niagara Rosada’ do fungo *Phaeomoniella chlamydospora*

O mesmo isolado do fungo *P. chlamydospora* utilizado no ensaio do item 5.4 foi multiplicado em meio cultura BDA, por 30 dias, em BOD regulada para 23°C, com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, visando à produção de inóculo.

Mudas saudáveis de videira ‘Niagara Rosada’, com idade de 1 ano e meio, foram plantadas em saquinhos com solo solarizado foram adquiridas na CATI de São Bento do Sapucaí-SP. As mudas foram inoculadas com o isolado do fungo *P. chlamydospora* da mesma maneira que no ensaio do teste de patogenicidade (item 5.2).

Após 4 meses de colonização das mudas, o ensaio propriamente dito foi instalado em condições de laboratório, em microcosmo mantido dentro de estufas tipo BOD, reguladas às temperaturas de 37±2°C e 23±2°C e fotoperíodo de 12 horas de luz (BUENO et al., 2004; AMBRÓSIO, 2006). A temperatura de 37±2°C acelera a decomposição da brássica que foi utilizada no ensaio e, também, simula a temperatura média do solo em campos solarizados,

nos meses de verão, especificamente em Botucatu – SP (BUENO et al., 2004). A época do verão é a mais propícia para instalação da técnica de solarização. Com isso, é possível simular o processo de solarização do solo e solarização + brássica (biofumigação), em condições laboratoriais.

Assim, as parcelas experimentais do ensaio consistiram de microcosmos, previamente desenvolvidos e testados por Bueno et al. (2004) e Ambrósio (2006). Segundo estes autores, o microcosmo constitui-se de dois recipientes de vidro, com capacidade de três litros e meio e com uma tampa vazada por meio de um furo de 15 cm de diâmetro. Essa abertura na tampa permite a passagem de um tubo de silicone que interliga os dois recipientes.

Em um dos recipientes de vidro colocou-se solo de barranco, devidamente caracterizado (Tabela 03) e umedecido (20%) com água destilada esterilizada e com adição ou não de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.) triturada, na proporção de três quilos de solo (dois litros) mais 60 gramas de couve, de forma a proporcionar uma altura de 15 centímetros de material no microcosmo. A caracterização da couve encontra-se na Tabela 04.

Tabela 03. Composição mineral (macro e micronutrientes), pH e matéria orgânica (M.O.) do solo de barranco.

pH	M.O.	P _{resina}	Al ³⁺	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn	
CaCl ₂	g/dm ³	mg/dm ³	mmol/dm ³							V%	mg/dm ³					
4,3	10	12	5	28	1,0	2	2	5	33	15	7	0,14	0,3	9	2,2	0,2

Tabela 04. Composição mineral (macro e micronutrientes) do material de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.).

Macronutrientes							Micronutrientes						Umidade
N	P	K	Ca	Mg	S	C	Fe	Mn	Cu	Zn	B	Al	
g/Kg							mg/Kg						%
30,6	3,3	34,3	32,5	5,8	2,4	396,3	290,5	218,5	11,3	155,6	40,9	387,3	89,2

Além do tratamento contendo solo sem couve incorporada, houve um recipiente sem incorporação de solo e sem incorporação de couve.

Esses microcosmos com os tratamentos foram mantidos em estufa tipo BOD, regulada para temperaturas de 37±2°C e 23±2°C (Figura 13).

Foram quatro tratamentos aplicados na desinfestação das mudas: tratamento 1 = solo

+ couve a 37°C (biofumigação); tratamento 2 = solo – couve a 37°C (solarização); tratamento 3 = 37°C e tratamento 4 = 23°C. Esses tratamentos foram aplicados em períodos de 1, 3 e 6 dias.

Em todos os conjuntos de recipientes de vidro, que formaram o microcosmo, um deles foi ausente de solo de barranco, couve e de água destilada esterilizada. Neste recipiente foi colocado oito mudas sadias de 'Niagara Rosada', enxertadas no porta-enxerto IAC 766, que foram infectadas com *P. chlamydospora*. Destas mudas, quatro foram utilizadas para verificar o efeito dos tratamentos em cada período e a outra metade para verificar o efeito dos tratamentos em cada período mais adição da termoterapia.



Figura 13: Conjunto de dois recipientes de vidros – o microcosmo, com tampas vazadas permitindo a passagem de uma mangueira de silicone interligando os recipientes de vidros e seus tratamentos. Detalhe do microcosmo mantido dentro de estufa tipo BOD, regulada para as temperaturas de $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, visando ao controle do fungo *Phaeomoniella chlamydospora*, em mudas infectadas da videira 'Niagara Rosada'.

Para os tratamentos envolvendo uso de termoterapia (revisados por GRAMAJE; ARMENGOL, 2011), um banho-maria contendo água destilada foi regulado para 51°C . As mudas ficaram totalmente imersas na água por 30 minutos (Figura 14).



Figura 14: Mudanças de videira 'Niagara Rosada', que passaram pelos tratamentos de desinfecção em diferentes períodos e depois submetidas a tratamento adicional de termoterapia em banho-maria com água destilada com temperatura regulada para $51 \pm 1^\circ\text{C}$.

O parâmetro avaliado em todos os tratamentos e em cada período de tempo foi o controle do fungo nas mudas. Para tanto, após a retirada das mesmas de cada tratamento e de cada período de tempo, procedeu-se conforme os itens 5.1.2 e 5.1.3, com a diferença que os fragmentos foram plaqueados apenas no meio de cultura BDA. Após 21 dias de incubação em BOD, a 23°C , com fotoperíodo de 12 horas de luz, contou-se o número de colônias de *P. chlamydospora* desenvolvidas por fragmento (25%), totalizando 100% se em todos os quatro fragmentos houvesse o crescimento do fungo.

Os dados do percentual de crescimento ou não de *P. chlamydospora*, nos fragmentos por placa de Petri, foram analisados estatisticamente através do teste de associação de Goodman, envolvendo contrastes entre e dentro de populações multinominais (GOODMAN 1964; 1965), considerando-se o nível de 5% de significância.

Após a finalização do ensaio, um outro ensaio idêntico foi realizado, diferindo apenas com relação aos períodos de tempo dos tratamentos, sendo neste ensaio os períodos com 7, 14 e 21 dias.

5.5.2) Efeito das técnicas de desinfecção do porta-enxerto IAC 766 para 'Niagara Rosada' no desenvolvimento do sistema radicular

Os tratamentos e a montagem do ensaio foram idênticos aos do item 5.5.1, diferindo apenas nos tempos aplicados nos tratamentos, que foram somente com 7, 14 e 21 dias. Adotou estes períodos de tempos em função do sucesso do controle do fungo nas mudas nestes tempos.

Neste ensaio, ao invés de mudas, oito estacas de videira do porta-enxerto IAC 766 contendo 2 a 3 gemas cada foram colocadas em um dos recipientes de vidro de cada tratamento sem, estarem infectadas com o fungo *P. chlamydospora*.

Após a aplicação dos tratamentos, as estacas foram plantadas no solo de um canteiro com dimensões de 4 x 15 metros. As dimensões entrelinhas foi de 20 cm e entre plantas de 12 cm. Após o plantio, o solo foi umedecido e, seguida, o solo e as estacas foram cobertas com restos de grama podada, com o intuito de manter a umidade e evitar o ressecamento das estacas (Figura 15). Após a germinação das primeiras gemas, os restos de grama foram removidos.



Figura 15: Estacas do porta-enxerto de videira IAC 766, tratadas pelos tratamentos de desinfecção mais termoterapia e que foram plantadas em canteiro, para observar o desenvolvimento do seu sistema radicular.

O parâmetro avaliado nas estacas em cada período após 40 dias do plantio foi a formação ou não do sistema radicular por repetição, por tratamento.

Os dados do percentual de formação de raízes, por repetição por tratamento, foram analisados estatisticamente através do teste de associação de Goodman envolvendo contrastes entre populações multinominais (GOODMAN 1964), considerando-se o nível de 5% de significância.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1) Levantamento de ocorrência da doença de Petri na videira 'Niagara Rosada' no estado de São Paulo

Detalhes das localidades onde se encontrou a doença de Petri e quais os fitopatógenos detectados seguem: a) Vinhedo - predominou apenas *Phaeoconiella chlamydospora*; b) Louveira na propriedade Louveira B, Jundiaí, Jarinu e Porto Feliz - constatou-se *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* sp.; c) municípios de Jales e São Miguel Arcanjo - apenas o *Phaeoacremonium* sp.; d) municípios de Indaiatuba e Louveira - propriedade Louveira A - não houve o aparecimento de nenhum dos fungos (Tabela 05).

Constatou-se que a doença de Petri encontra-se em muitos municípios produtores da uva 'Niagara Rosada', caracterizando a disseminação da doença no estado de São Paulo (Tabela 05).

Em todas as localidades onde se constatou a doença de Petri, a detecção foi em plantas jovens de 'Niagara Rosada', com média de até três anos. Essa observação corrobora com as afirmações de Mostert et al. (2006) e Gatica et al. (2001), pois ambos mencionaram que a doença de Petri ocorre principalmente em vinhedos jovens.

Ambos os fungos apresentaram incidências iguais ao término do levantamento, mas quanto à quantidade dos fungos por fragmentos, *P. chlamydospora* diferenciou-se de *Phaeoacremonium* spp. Isto faz jus à agressividade maior de *P. chlamydospora* frente ao fungo *Phaeoacremonium*, conforme relatos de Halleen et al. (2007), Mostert et al. (2006) e Mugnai et al. (1999).

Pode-se salientar ainda que entre as espécies de *Phaeoacremonium* sp., *P. aleophilum* é a mais amplamente distribuída e mais comum em videiras (SHECK et al., 1998; MUGNAI et al., 1999; MOSTERT et al., 2006). No presente trabalho, essa espécie foi encontrada com maior predominância nos municípios visitados, confirmando os relatos desses autores.

A variedade 'Niagara Rosada' é enxertada em diversos porta-enxertos e está entre a mais cultivada nos municípios do estado de São Paulo. Os porta-enxertos são escolhidos por serem vigorosos, se adaptarem a diferentes solos, alguns se adaptarem às condições ambientais da região Sudeste do Brasil e apresentarem afinidade com a copa (BUENO et al., 2010; HERNANDES et al., 2010).

Os porta-enxertos Ripária do Traviú, IAC 572, IAC 766 e Ripária Gloire

apresentaram-se suscetíveis, tanto para o fungo *P. chlamydospora*, quanto para *Phaeoacremonium* sp. (Tabela 05).

Tabela 05: Ocorrência de *Phaeoacremonium* sp. e / ou *Phaeomoniella chlamydospora* na videira 'Niagara Rosada' enxertada em diferentes porta-enxertos, em oito municípios do estado de São Paulo - Brasil.

Municípios	Porta-enxertos	<i>Phaeoacremonium</i> sp.	<i>Phaeomoniella</i> <i>chlamydospora</i>	Presença da doença
Louveira A	IAC 766	- ¹ (0/192) ²	- (0/192)	-
Louveira B	IAC 572	+ (2/192)	+ (5/192)	+
Vinhedo	IAC 766	- (0/192)	+ (25/192)	+
Jundiaí	Ripária do Traviú	+ (2/192)	+ (35/192)	+
Indaiatuba	Ripária Gloire	- (0/192)	- (0/192)	-
Jarinú	IAC 766	+ (13/192)	+ (5/192)	+
Porto Feliz	Ripária Gloire	+ (6/192)	+ (23/192)	+
São Miguel	Ripária do Traviú	+ (8/192)	- (0/192)	+
Arcanjo	IAC 572	+ (20/192)	- (0/192)	+
Jales				
Total de incidência		6 (51)	5 (93)	

Legenda: ¹+ = detecção dos agentes causais e presença da doença de Petri no município; - = não detecção dos agentes causais e ausência da doença de Petri no município.

²número de fragmentos com crescimento do agente causal pelo número total de fragmentos plaqueados.

Das metodologias utilizadas para isolar os fitopatógenos da doença de Petri, as que apresentaram bom resultado foram nos meios de cultura BDA e AA -- BDA. Na metodologia de isca com maçã verde, o isolamento dos fungos não foi eficiente, pois não houve crescimento dos agentes causais da doença de Petri (Tabela 06). De acordo com Brayford (1993), o patógeno que poderia crescer na isca de maçã verde seria o fungo *Cylindrocarpon* sp., causador da doença pé preto na videira, que apresenta sintomas semelhantes à doença de Petri, pois este fungo pode afetar o sistema radicular como *Phaeomoniella* sp. e *Phaeoacremonium* sp.

Tabela 06: Porcentagem de incidência de *Phaeoacremonium* sp. e / ou *Phaeomoniella chlamydospora* por fragmento retirado do sistema vascular da região do colo da videira 'Niagara Rosada' de plantas de todos os municípios paulistas visitados e que foi plaqueado em meios de cultura diferentes, sendo os fragmentos passados ou não por processo de desinfestação superficial.

Processo de desinfestação superficial	<i>Phaeoacremonium</i> sp.		
	BDA	AA -- BDA	ISCA – BDA
Sim	3,1 ¹ a ² AB ³ (±0,0 ⁴)	4,5 a B (±25,0)	0,0 a A (±0,0)
Não	4,5 a A (±25,0)	5,6 a A (±25,0)	0,0 a B (±0,0)
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>			
Sim	14,6 ¹ a ² A ³ (±50,0) ⁴	13,5 a A (±50,0)	0,0 a B (±0,0)
Não	1,0 b AB (±12,5)	3,1 b B (±37,5)	0,0 a A (±0,0)

Legenda:¹ Média de porcentagem de incidência do agente causal por fragmento de todos os municípios paulistas visitados no respectivo meio de isolamento; ² Letras minúsculas comparam o processo de desinfestação superficial por meio de isolamento segundo o teste de Kruskal-Wallis, complementado com o teste de múltiplas comparações de Dunn com nível de 1% de probabilidade; ³ Letras maiúsculas comparam os diferentes meios de cultura por processo de desinfestação superficial segundo o teste de Mann-Whitney com 1% de probabilidade; ⁴ Mediana e semi-amplitude interquartilica dos dados do percentual de incidência dos fungos nos fragmentos.

Para o fungo *Phaeoacremonium* sp. não houve diferença significativa entre desinfestar ou não as amostras, e os meios BDA e de AA -- BDA também não diferiram entre si. Para *Phaeomoniella* sp., as amostras desinfestadas diferiram das não desinfestadas e os meios BDA e de AA -- BDA foram os melhores (Tabela 06). Para fins práticos, recomenda-se desinfestar as amostras e depois plaquear diretamente em meio de BDA. No método de isca e repicagem para BDA não se isolou os agentes causais da doença de Petri (Tabela 06).

Pinto (2010) realizou vários estudos com *P. chlamydospora* e procedeu isolamento do fungo de material vegetal com desinfestação superficial utilizando solução de álcool a 70%, solução de hipoclorito de sódio a 7% e lavagem do material em água destilada esterilizada, seguido de secagem do mesmo em papel de filtro. O material desinfestado foi plaqueado em meio de cultura BDA e as placas foram mantidas em BOD a 22°C por 15 dias. Os procedimentos de desinfestação do material de São Paulo, como o uso de meio de BDA e a

temperatura foram quase similares aos do trabalho de Pinto (2010). Quanto à temperatura ideal de crescimento dos fungos, Whiting et al. (2001) obtiveram crescimento dos fungos *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* sp. em meio de cultura BDA e incubando-os em BOD em diferentes temperaturas, e constataram que a faixa ideal de crescimento encontra-se de 25°C a 30°C.

Feliciano et al. (2004) verificaram na Califórnia (EUA) a suscetibilidade de três cultivares de videira aos fungos *P. chlamydospora* e *P. aleophilum*. Após os procedimentos, os fungos foram reisolados do sistema vascular dos cultivares, por meio de desinfestação superficial do material vegetal em solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, por três minutos e duas lavagens em água destilada esterilizada. O material desinfestado foi plaqueado em meio de BDA e incubado a 24°C por até 10 dias. Diante destes relatos, os procedimentos de isolamento adotados para os materiais de 'Niagara Rosada' do estado de São Paulo estão de acordo com o que é utilizado no mundo.

6.1.1) Identificação molecular dos patógenos causadores da doença de Petri em videira 'Niagara Rosada'

Em todo o levantamento realizado, foram detectados apenas quatro isolados diferentes dos agentes causais da doença de Petri. No município de Jundiá, obteve-se o isolado típico de *Phaeomoniella* sp. (IBVD 01), detectado em muitas localidades e dois de *Phaeoacremonium* sp. (IBVD 04 e IBVD 05). O isolado IBVD 05 foi detectado em todas as localidades onde se constatou *Phaeoacremonium* sp. Além dos dois isolados típicos de *Phaeoacremonium* (IBVD 04 e IBVD 05), mais um isolado típico deste fungo foi encontrado no município de Jales, o IBVD 03.

No ensaio quanto à verificação do local de colonização natural dos fungos da doença de Petri em 'Niagara Rosada', detectou-se além de *P. chlamydospora*, também o fungo *Phialemonium dimorphosporum* (IBVD 02).

Na região nordeste do Brasil foram encontrados os fungos *Phaeoacremonium aleophilum* e *Phaeomoniella chlamydospora*, por Correia et al. (2012), em plantas de videira da variedade Isabel. Quanto à identificação dos fitopatógenos, Correia et al. (2012) lançaram mão de características morfológicas (Mostert et al., 2006), e na identificação molecular sequenciaram a região ITS e partes do gene da β -tubulina, não utilizando seqüências do gene do fator de alongação (EF).

No presente trabalho, para identificar molecularmente os patógenos encontrados,

foram sequenciadas a região ITS, partes do gene da β -tubulina e do gene do fator de alongação 1- α (EF).

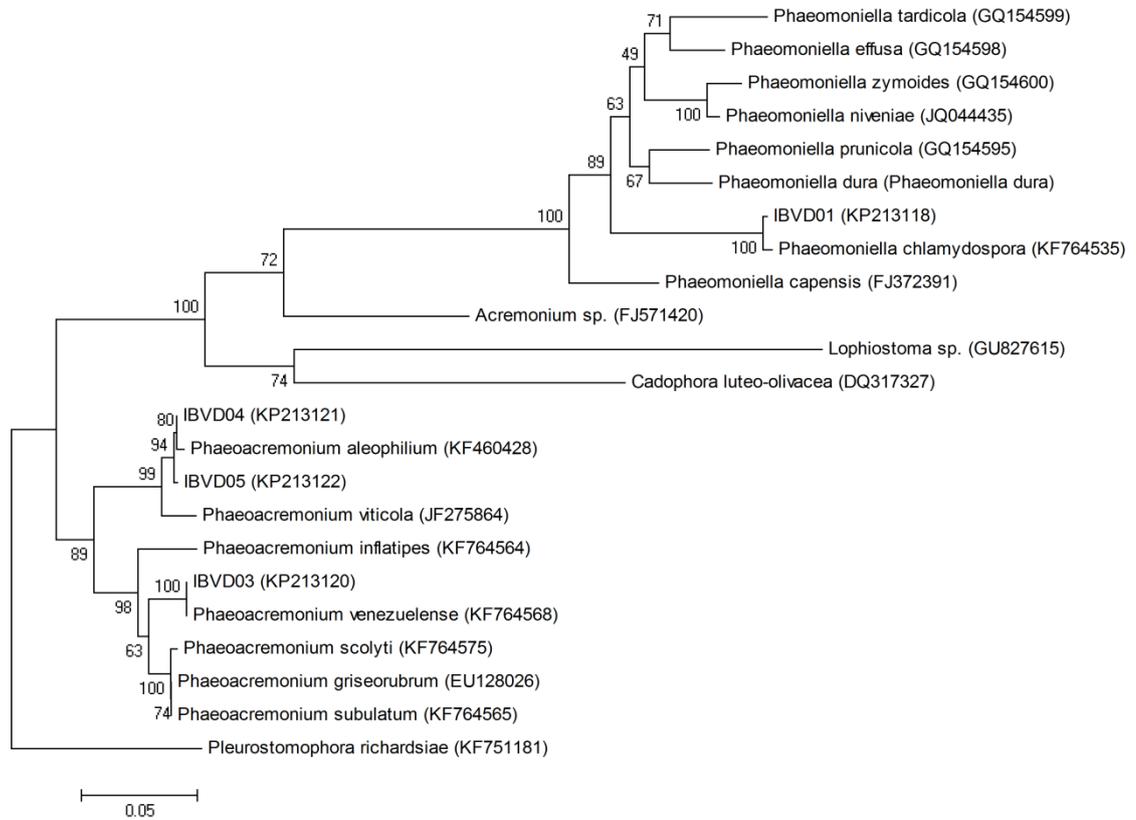


Figura 16: Árvore filogenética gerada por “Neighbour-joining” e construída com base em 1000 réplicas das árvores embasadas no algoritmo de “bootstrap”. Essa árvore ilustra os fungos de videira obtidos nos municípios de São Paulo com fungos de dois gêneros e diversas espécies de videira depositadas no GenBank-NCBI, a partir das seqüências da região ITS-5.8S rDNA dos mesmos. O número nas ramificações representa o valor de 1000 “bootstrap”. O isolado *Pleurostomophora richardsiae* foi utilizado como “outgroup”.

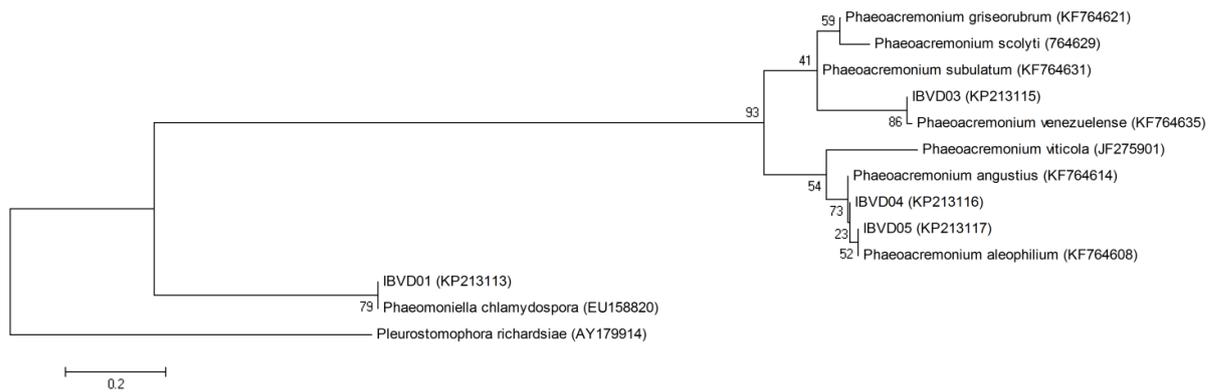


Figura 17: Árvore filogenética gerada por “Neighbour-joining” e construída com base em 1000 réplicas das árvores embasadas no algoritmo de “bootstrap”. Essa árvore ilustra os fungos de videira obtidos nos municípios de São Paulo com fungos de dois gêneros e diversas espécies de videira depositadas no GenBank-NCBI, a partir das seqüências do fator de alongação do gene 1- α dos mesmos. O número nas ramificações representa o valor de 1000 “bootstrap”. O isolado *Pleurostomophora richardsiae* foi utilizado como “outgroup”.

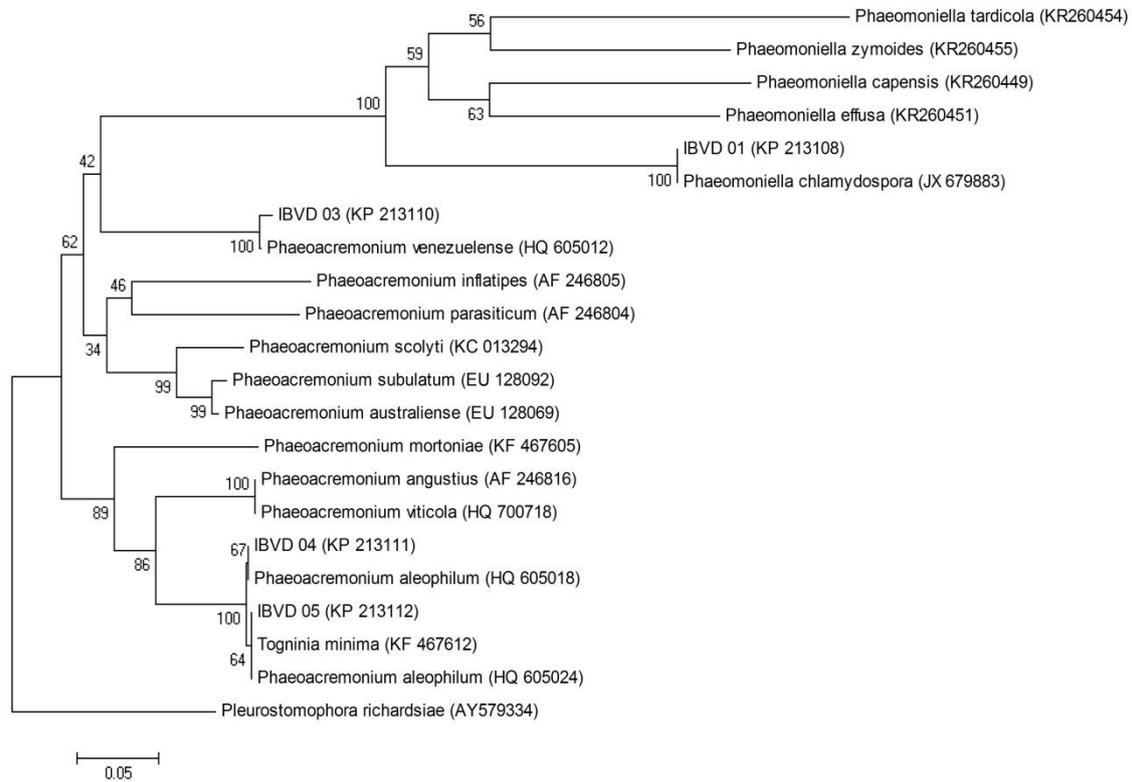


Figura 18: Árvore filogenética gerada por “Neighbour-joining” e construída com base em 1000 réplicas das árvores embasadas no algoritmo de “bootstrap”. Essa árvore ilustra os fungos de videira obtidos nos municípios de São Paulo com fungos de dois gêneros e diversas espécies de videira depositadas no GenBank-NCBI, a partir do gene da β -tubulina dos mesmos. O número nas ramificações representa o valor de 1000 “bootstrap”. O isolado *Pleurostomophora richardsiae* foi utilizado como “outgroup”.

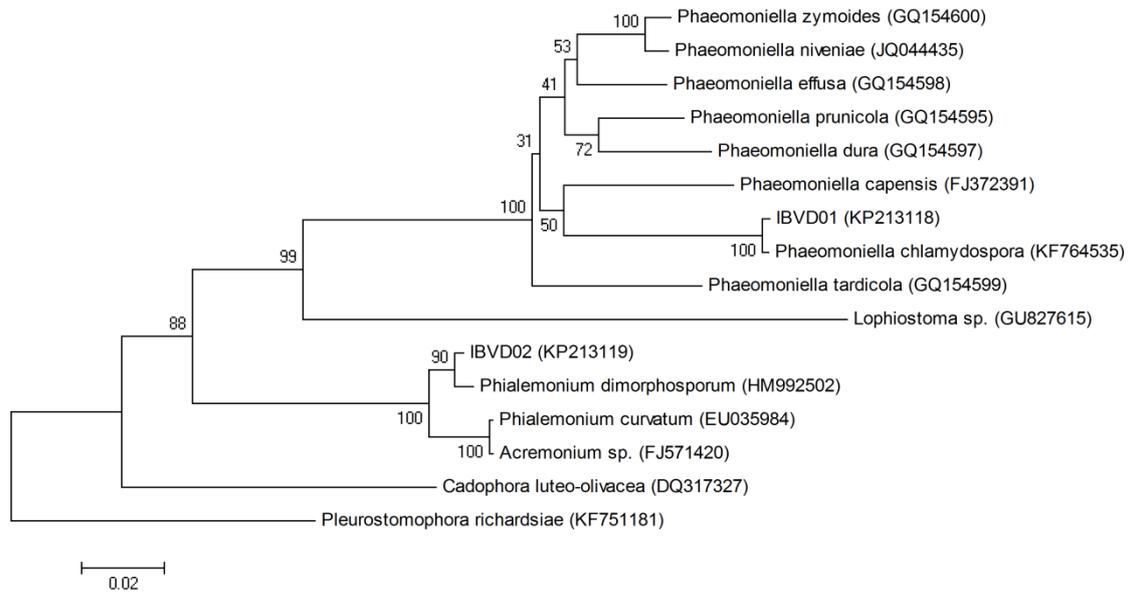


Figura 19: Árvore filogenética gerada por “Neighbour-joining” e construída com base em 1000 réplicas das árvores embasadas no algoritmo de “bootstrap”. Essa árvore ilustra os fungos de videira obtidos nos municípios de São Paulo com fungos de dois gêneros e diversas espécies de videira depositadas no GenBank-NCBI, a partir das seqüências da região ITS-5.8S rDNA dos mesmos. O número nas ramificações representa o valor de 1000 “bootstrap”. O isolado *Pleurostomophora richardsiae* foi utilizado como “outgroup”.

De acordo com a Figura 16, as seqüências da região ITS do isolado IBVD01 (KP213118) apresentaram 100% de similaridade com o isolado *Phaeomoniella chlamydospora* (KF764535). O isolado IBVD03 (KP213120) alinhou-se com o isolado *Phaeoacremonium venezuelense* (KP764588). A respeito dos isolados IBVD04 (KP213121) e IBVD05 (KP213122), as seqüências destes apresentaram similaridade com o isolado *Phaeoacremonium aleophilium* (KF460428), mas essa similaridade não foi tão alta quanto ao do isolado IBVD 01.

Quanto às seqüências do gene do fator de alongação 1- α , a Figura 17 demonstra que as seqüências do isolado IBVD1 (KP213113) alinharam-se 79% com *Phaeomoniella chlamydospora* (EU158820). O isolado IBVD03 (KP213115) apresentou 86% de similaridade com o isolado *Phaeoacremonium venezuelense* (KF764635). Os isolados IBVD04 (KP213116) e IBVD05 (KP213117) apresentaram 52% de similaridade com o isolado *Phaeoacremonium aleophilium* (KF764608).

De acordo com a Figura 18, a seqüência do gene de β -tubulina para o isolado IBVD01 (KP213108) apresentaram 100% de similaridade com o isolado *Phaeomoniella chlamydospora* (JX679883). O isolado IBVD03 (KP213110) alinhou-se 100% com o isolado *Phaeoacremonium venezuelense* (HQ605012). Para as seqüências do gene de β -tubulina,

os isolados IBVD04 (KP213111) apresentou similaridade de 67% com o isolado *Phaeoacremonium aleophilum* (HQ605018) e o IBVD05 (KP213112) mostrou 64% com o isolado *Phaeoacremonium aleophilum* (HQ605024).

Assim, o isolado IBVD 01 foi identificado como *P. chlamydospora*, IBVD 03 como *P. venezulense* e os isolados IBVD 04 e 05 como *P. aleophilum* (Figuras 16, 17 e 18).

De acordo com as sequências da região ITS, o isolado IBVD02 (KP213119) apresentou 90% de similaridade com *Phialemonium dimorphosporum* (HM992502) (Figura 19), finalizando a sua identificação devido ao fato desta espécie não apresentar sequências do gene do fator de alongação e do gene de β -tubulina no GENBANK-NCBI.

Em 1998, o sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal de isolados de *Phaeoacremonium* permitiu constatar grande divergência entre eles (DUPONT et al., 1998). Isto já evidenciava grande número de espécies dentro do gênero. Crous & Gams (2000) por meio de sequenciamento da região ITS e do gene da β tubulina dos isolados relataram pela primeira vez o gênero *Phaeomoniella* e a espécie *P. chlamydospora*.

De acordo com os trabalhos de Dupont et al. (1998) e de Crous; Gams (2000), o sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal dos isolados obtidos de 'Niagara Rosada' nos municípios do estado de São Paulo (Figuras 16 e 19) foi apropriado, mas ajudou parcialmente na identificação dos isolados ao nível de gênero e espécie.

Nos trabalhos de Mostert et al. (2005); Graham et al. (2009) e Gramaje et al. (2009), a partir do sequenciamento do gene de β -tubulina os autores conseguiram obter a identificação dos isolados a nível de gênero e espécie. Quanto aos isolados obtidos nos municípios do estado de São Paulo (Figura 18), o sequenciamento do gene de β -tubulina permitiu uma identificação melhor e definitiva, tanto ao nível de gênero, quanto, principalmente, por espécie.

6.2) Teste de patogenicidade com fungos isolados no levantamento de videiras com sintomas de declínio

O teste de patogenicidade foi realizado com o isolado do fungo *Phaeomoniella* sp. (IBVD01), que foi devidamente identificado como *Phaeomoniella chlamydospora* (Figura 21). Houve 100% de incidência deste fungo nas plantas inoculadas. A severidade média da doença foi de 7,9 cm, do ponto de inoculação (colo) em direção às raízes da planta. O isolado do fungo foi reisolado das plantas inoculadas, comprovando ser o agente causal da doença. Plantas controle não apresentaram doença (Tabela 07).

Além de estrias escuras no sistema vascular da região do colo, outros sintomas foram observados, como ausência de folhas, escurecimento do caule e menor desenvolvimento das plantas, os mesmos sintomas constatados por Pinto (2010). No tratamento controle, além de ausência de estrias escuras, observou-se ocorrência de folhas e nenhuma necrose no caule das plantas (Figura 20), demonstrando a sanidade da planta.

Pinto (2010) utilizou sete isolados de *P. chlamydospora* para a realização do teste de patogenicidade e observou o resultado que não houve diferença entre os isolados, mas sim em relação à testemunha. Após 4 meses, o comprimento médio das estrias escuras variou de 9 mm (0,9 cm) a 17,8 mm (1,7 cm), obtendo uma média de 1,3 cm. Os resultados obtidos pelo método de inoculação de disco de micélio revelaram que a dimensão das estrias foi maior, quando comparados ao método de inoculação com suspensão de esporos (Pinto, 2010).

Comparando os dados do trabalho de Pinto (2010) com o do presente trabalho (Tabela 07), o comprimento médio das estrias escuras provocadas pelo isolado de *P. chlamydospora* nas plantas (7,9 cm) foi maior do que a média dos setes isolados de Pinto (2010), que apresentou uma média de 1,3 cm.

De acordo com Pinto (2010), quando se inocula plantas com discos de micélio, a dimensão das estrias no sistema vascular é superior à obtida com suspensão de esporos.

Segundo os dados do trabalho de Sparapano et al. (2000), que utilizaram um método semelhante ao de disco de micélio, *P. chlamydospora* após 5 meses apresentou uma lesão de cerca de 40 mm (4,0 cm), mas em videira com 6 anos de idade.

Pode-se evidenciar que outros ensaios relacionados com teste de patogenicidade foram feitos utilizando incorporação de inóculo do fungo em substrato de enraizamento de estacas de videira, causando lesões com uma dimensão média de 20 mm (2,0 cm), em um período de 3 meses após a inoculação (ADALAT et al., 2000).

Outro teste de patogenicidade foi realizado com o isolado do fungo *Phaeacremonium* sp. (IBVD 05), identificado como *Phaeacremonium alephilium* (Figura 22). A severidade média da doença causada pelo isolado IBVD 05 nas plantas foi de 5,2 cm, do ponto de inoculação (colo) em direção as raízes da planta (Tabela 07). O fungo foi reisolado das plantas inoculadas, comprovando ser o agente causal da doença.

Aroca; Raposo (2009) realizaram o teste de patogenicidade com várias espécies de *Phaeacremonium* (*P. aleophilum*, *P. angustius*, *P. inflatipes*, *P. krajdenii*, *P. mortoniae*, *P. parasiticum*, *P. scolyti*, *P. venezuelense* e *P. viticola*) e *Phaeomoniella chlamydospora*, pois são suspeitos de causarem as doenças de Esca e de Petri. O teste foi realizado em mudas e em estacas de videira e a inoculação foi pelo método de suspensão de esporos. As mudas foram mantidas em estufa com condições controladas e regadas periodicamente, para evitar

a condição de estresse. Após o tempo de 5 meses de inoculação, as plantas foram avaliadas e observou-se que todas as espécies de *Phaeoacremonium* e *Phaeoconiella chlamydospora* causaram uma descoloração no sistema vascular, mas *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium mortoniae* e *Phaeoacremonium aleophilum* causaram redução do peso da raiz, comparado com as testemunhas. Os sintomas foliares, que incluem clorose intervenal e folhas atrofiadas, foram causados pelos fungos *Phaeoacremonium parasiticum*, *Phaeoacremonium angustius*, *Phaeoacremonium inflatipes* e *Phaeoacremonium venezuelense*.

Hallen et al. (2007) isolaram vários fungos de plantas com doença de Petri (*Acremonium cf. charticola*, *Acremonium cf. ochraceum*, *Cadophora luteo-olivacea*, *Phialemonium cf. curvatum*, *Pleurostomophora richardsiae*, *Phaeoacremonium krajdennii*, *Phaeoacremonium parasiticum*, *Phaeoacremonium subulatum*, *Phaeoacremonium venezuelense* e *Phaeoacremonium viticola*) e inocularam estes fungos juntamente com *P. chlamydospora*, para realizar o teste de patogenicidade. Os ensaios foram realizados tanto em casa-de-vegetação, quanto em campo. Ao término do ensaio, constataram que o fungo *P. chlamydospora* foi o mais agressivo perante os demais. No entanto, os demais patógenos (*Acremonium cf. charticola*, *Acremonium cf. ochraceum*, *Cadophora luteo-olivacea*, *Phialemonium cf. curvatum*, *Pleurostomophora richardsiae*, *Phaeoacremonium krajdennii*, *Phaeoacremonium parasiticum*, *Phaeoacremonium subulatum*, *Phaeoacremonium venezuelense* e *Phaeoacremonium viticola*) também foram capazes de infectar, colonizar e causar lesão, diferindo do ensaio controle.

Em função do relato de ocorrência *P. venezuelense* em humanos por Mostert et al. (2006), não se realizou teste de patogenicidade com o isolado deste fungo (IBVD 03), obtido de 'Niagara Rosada' do município de Jales, SP.

No presente trabalho (Tabela 07, Figuras 21 e 22), no teste de patogenicidade com os isolados de *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* e a testemunha, o fungo *P. chlamydospora* se destacou, confirmando as afirmações de Hallen et al. (2007) sobre este fungo.

Tabela 07. Comprimento (cm) de estrias escuras causadas por *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum* no sistema vascular de mudas da videira 'Niagara Rosada' enxertadas no porta-enxerto IAC 766 e que ficaram mantidas em casa-de-vegetação por quatro meses.

N. Planta	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	Controle
1	7,5	8,5	0,0
2	7,7	2,2	0,0
3	9,5	9,3	0,0
4	9,4	7,0	0,0
5	9,0	7,3	0,0
6	1,0	3,2	0,0
7	9,8	4,5	0,0
8	10,0	1,8	0,0
9	9,3	5,5	0,0
10	6,3	2,7	0,0
Média	7,9 a¹	5,2 b	0,0 c

Legenda: ¹Letras diferentes diferem entre, si segundo o teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade. CV = 25,1%.

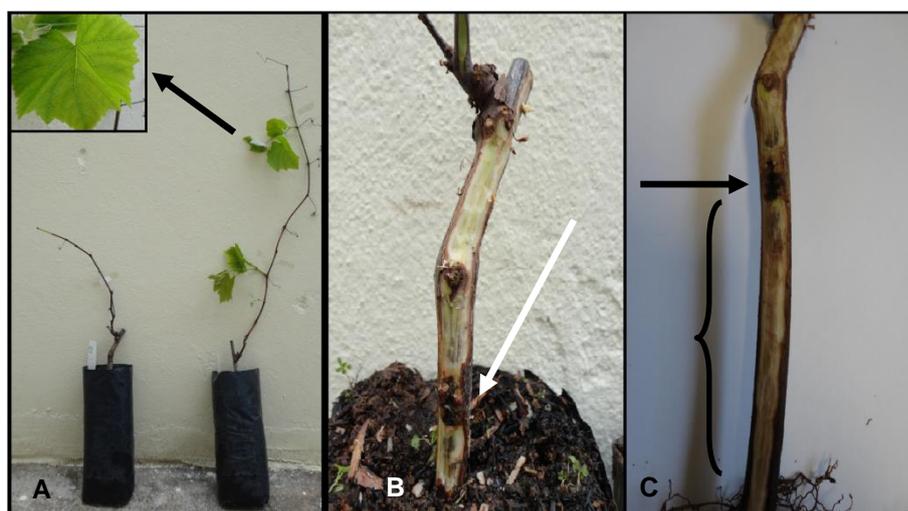


Figura 20: (A) Planta de videira 'Niagara Rosada', enxertada em IAC 766 exibindo sintomas de doença de Petri, com caule fino, escurecido e sem folhas. Ao lado, planta sem o fungo – sadia (controle); (B) Local de inoculação dos fungos – região do colo; (C) Detalhe de estrias escuras no vaso a partir do ponto de inoculação em direção ao sistema radicular (indicação com seta e parêntese).

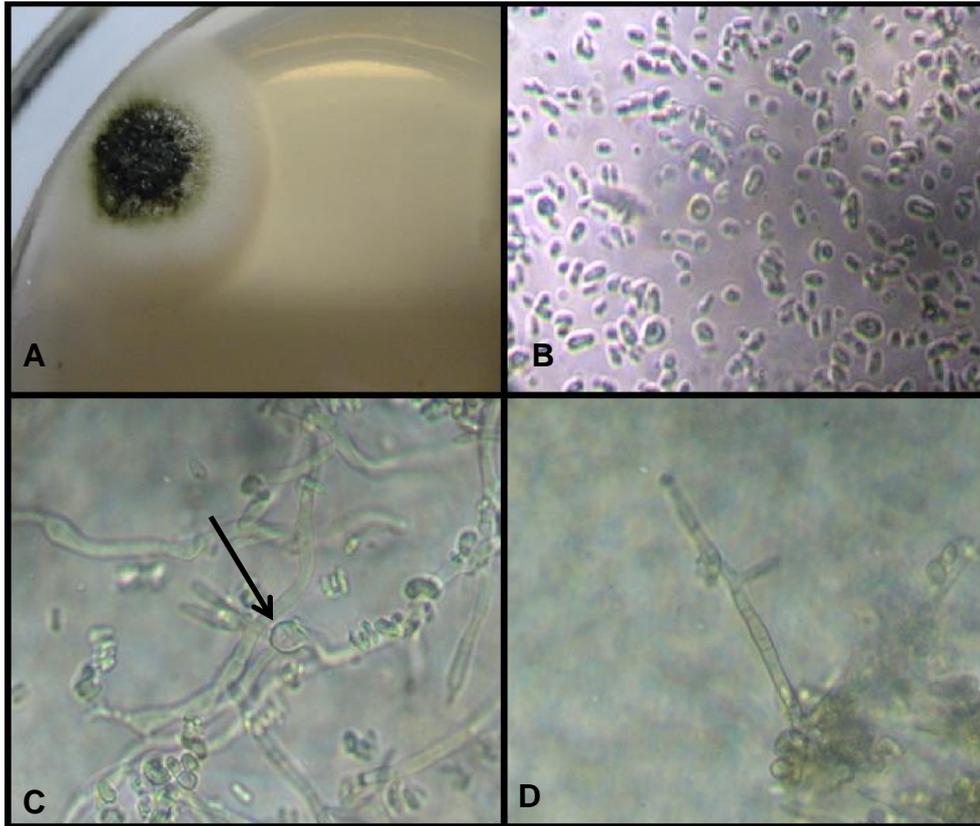


Figura 21: (A) Características morfológicas de um isolado de *Phaeoconiella chlamydospora* (IBVD 01), isolado de videira. Colônia desenvolvida em meio de cultura de batata dextrose ágar (20 dias); (B) Conídios em aumento de 400 x; (C) Clamidósporos em aumento de 400 x (indicação com seta) e (D) conidióforo em aumento de 400 x.

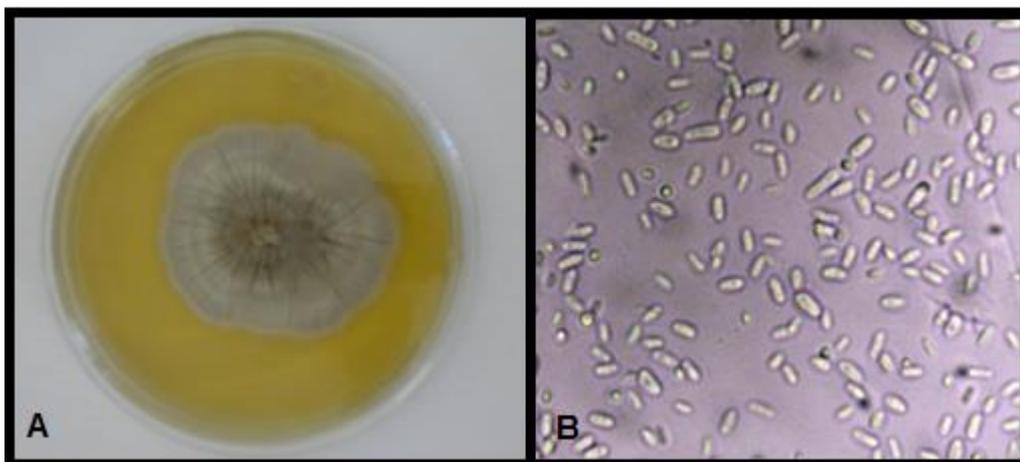


Figura 22: (A) Características morfológicas de um isolado de *Phaeoacremonium aleophilum* (IBVD 05), isolado de videira. Colônia desenvolvida em meio de cultura de batata dextrose ágar (20 dias); (B) Conídios em aumento de 400 x.

6.3) Local de colonização natural dos fungos da doença de Petri, em diferentes partes da videira ‘Niagara Rosada’

Em plantas de videira ‘Niagara Rosada’ coletadas de uma reboleira com suposta incidência da doença de Petri foram detectados dois fungos diferentes responsáveis pela doença: *Phaeomoniella chlamydospora* (IBVD01) e *Phialemonium dimorphosporum* (IBVD02) (Tabela 08).

TABELA 08: Percentual de incidência dos fungos *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phialemonium dimorphosporum* em fragmentos retirados do sistema vascular de diferentes partes de ‘Niagara Rosada’ enxertada em dois diferentes porta-enxertos.

Patógenos	Porta-enxerto	Partes da planta		
		Aérea	Média	Colo
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Ripária do Traviú	0,0 ¹ (±0,0) ¹ a ² A ³	0,0 (±0,0) a A	25,0 (±25,0) a B
	IAC 766	0,0 (±0,0) a A	0,0 (±0,0) a A	50,0 (±50,0) a B
<i>Phialemonium dimorphosporum</i>	Ripária do Traviú	0,0 (±0,0) a A	0,0 (±0,0) a A	0,0 (±12,5) a A
	IAC 766	0,0 (±0,0) a A	0,0 (±0,0) a A	0,0 (±0,0) a A

Legenda: ¹Mediana e semi-amplitude interquartilica dos dados da parte da planta

²Letras minúsculas: comparação de porta-enxertos fixando parte da planta

³Letras maiúsculas: comparação das partes da planta fixando os porta-enxertos

Teste de múltiplas comparações de Dunn com nível de 5% de significância

As plantas de ‘Niagara Rosada’ enxertadas no porta-enxerto Ripária do Traviú apresentaram infecções pelos dois fungos, tendo esses patógenos colonizados apenas a região do colo, com destaque para o fungo *P. chlamydospora*. As plantas enxertadas no porta-enxerto IAC 766 apresentaram infecção somente pelo fungo *P. chlamydospora*, tendo esse fungo colonizado também apenas a região do colo (Tabela 08). Esses dois fungos detectados (Figura 01) estão relacionados com a doença de Petri (MUGNAI et al., 1999; HALLEEN et al., 2007). No Brasil há relatos de ocorrência da doença no Rio Grande do Sul (GARRIDO et al., 2004; ALMANÇA et al., 2013) e no Nordeste (CORREIA et al., 2013).

O fungo *P. dimorphosporum* ficou restrito à região do colo, mas em quantidade muito baixa, que estatisticamente revelou não apresentar diferenças entre as outras partes (Tabela 08).

Halleen et al. (2005) e Hallen et al. (2007) detectaram uma outra espécie de *Phialemonium*, o *Phialemonium curvatum* em tronco de videiras jovens e aparentemente saudáveis na África do Sul. Esses autores comprovaram que esse fungo é capaz de

colonizar, sobreviver e causar lesões no tronco de videiras, por meio de inoculações artificiais. Isto denota que essa doença é causada por um complexo de fungos.

Bettucci et al. (2002) investigaram em diferentes pontos do Rio Paraná-Brasil e do estuário do Rio La Plata a composição de fungos no solo e encontraram vários gêneros de fungos e dentre eles o fungo *Phialemonium dimorphosporum*.

Lorena et al. (2001), por meio de exames microscópicos, relataram que *P. chlamydospora* inicia infecção pelas raízes e requer nove meses para colonizar até 25 cm do sistema vascular do colo das videiras. Esse progresso lento, segundo os autores, deve-se às respostas de defesa das plantas de videira. Os autores comentam que a maior frequência do fungo ocorre na região do colo, e não nas partes superiores da planta. No trabalho de Lorena et al. (2001), o fungo desenvolveu-se desde a raiz até cerca de 25 cm acima do colo. No ensaio para detectar o local de colonização natural e predominante dos fitopatógenos da doença de Petri, o fungo *P. chlamydospora*, em 'Niagara Rosada' enxertada em dois porta-enxertos diferentes ficou restrito a região do colo (Tabela 08), confirmando os relatos de Lorena et al (2001).

Acredita-se que a lenta colonização dos patógenos da doença de Petri é devido, também, ao seu crescimento lento. Para ilustrar isso, as colônias de *P. chlamydospora* em meio extrato de malte (MEA) atingiram um raio de 5-6 mm quando incubadas a 25°C, em 8 dias, na obscuridade (CROUS; GAMS, 2000), enquanto que 18 isolados do fungo do gênero *Cylindrocladium*, quando cultivados em meio Czapeck por 7 dias a 25°C, atingem um raio de até 33-77 mm (Aparecido et al., 2008). Da mesma forma, o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, quando crescido em meio BDA por 7 dias a 20°C no escuro, atinge um raio de 18,3 mm (Teixeira et al., 2001), muito superior ao obtido com *P. chlamydospora*, após o mesmo período de incubação. Assim, a defesa da planta (LORENA et al., 2001) e o lento crescimento (CROUS; GAMS, 2000) de *P. chlamydospora* podem ser dois dos motivos pelos quais *P. chlamydospora* se restringe ao colo das plantas.

Segundo Mostert et al. (2006), Surico et al. (2006) e Quaglia et al. (2009), as principais fontes de inóculo dos fungos da doença de Petri são materiais vegetativos infectados (mudas), solos infestados e o inóculo aéreo. Assim, as mudas devem ser alvo importante no manejo da doença, ou seja, deve-se obter mudas sabidamente saudáveis. Mostert et al. (2006), citando vários autores, relataram que as plantas-mães de porta-enxertos e garfos, que são utilizados no sistema de produção de mudas, encontram-se frequentemente infectados pelos fungos da doença de Petri.

Recentemente, no estado de São Paulo aumentou-se a necessidade de se fazer a enxertia alta e, conseqüentemente, dificultar a entrada do patógeno no local de enxertia. Além do local de enxertia, Oliveira et al. (2004) chamam a atenção da proteção das feridas

de poda, que é outro local de entrada dos fungos, por meio de esporos disseminados pelo vento. Independente do modo de realizar a enxertia, tanto alta quanto baixa, deve-se ter uma proteção deste local, assim como quando é realizada uma poda, para a obtenção de materiais vegetativos (mudas) saudáveis. Por meio destas medidas preventivas, ocorrerá a minimização de inóculo dos patógenos causadores da doença de Petri e do patógeno *Phialemonium dimorphosporum*, em propriedades que apresentam histórico de infestação da doença. Para não ocorrer o risco de contaminação destes patógenos em locais sabidamente saudáveis, aconselha-se o plantio de mudas já certificadas livres dos patógenos citados.

6.4) “Screening” para resistência de porta-enxertos de videira ‘Niagara Rosada’ ao fungo *Phaeoemoniella chlamydospora*

Verificando o comprimento das estrias escuras no sistema vascular da região do colo, em direção à parte aérea das plantas, observou-se que os porta-enxertos mais resistentes ao fungo *P. chlamydospora* e sem diferenças entre eles foram o Ripária Gloire, Ripária do Traviú, IAC 766, SO4, Paulsen 1103 e Golia. Os mais suscetíveis e sem diferenças entre si foram o IAC 571-6 e IAC 313. O material mais suscetível de todos foi o IAC 572 (Tabela 09).

Não houve uma correlação positiva ($r=0,586$ com $p < 0,01$) entre as medidas dos comprimentos das estrias escuras formadas do colo para a parte aérea e do colo para as raízes, provocadas pelo fungo *P. chlamydospora* que foi inoculado artificialmente nos diferentes porta-enxertos (Tabela 09).

Com relação ao tratamento testemunha, não se observou nenhuma estria escura no sistema vascular, nos dois pontos de avaliação dos porta-enxertos, ou seja, do colo para a parte aérea e do colo para o sistema radicular. Sendo assim, os dados da testemunha não foram incluídos nas análises.

Em estudo anterior, o fungo *P. chlamydospora* colonizou preferencialmente a região do colo das videiras Niagara Rosada enxertadas, tanto no porta-enxerto Ripária do Traviú, quanto no IAC 766, em comparação as outras partes das plantas como a parte aérea (Tabela 09). Por meio de exames microscópicos, Lorena et al. (2001) verificaram que *P. chlamydospora* inicia a infecção pelas raízes e requer nove meses para colonizar até 25 cm do sistema vascular do colo das videiras. Face ao exposto, pode-se sugerir que o comprimento das estrias escuras formadas pelo fungo a partir do colo em direção a raiz

como um parâmetro mais confiável para avaliação da resistência de plantas de videira ao fungo *P. chlamydospora* comparado ao comprimento das estrias a partir do colo em direção a parte aérea. No presente trabalho (Figura 23), os melhores resultados com as medições das estrias escuras do colo em direção das raízes não foi ao acaso, foi segundo as informações de Lorena et al. (2001). Com isso, a avaliação de porta-enxertos resistentes ao fungo *P. chlamydospora* pode ser padronizada: inoculando-se o fungo na região do colo e avaliando-se as estrias escuras provocadas pelo fungo, do ponto de inoculação (colo) em direção ao sistema radicular das plantas. Soma-se a isso o fato de que as estrias acima do colo das plantas enxertadas podem ter os seus comprimentos influenciados proporcionalmente pela altura ou desenvolvimento da parte aérea da planta, que é característica do cultivar do porta-enxerto. Isso foi observado no presente estudo para os porta-enxertos IAC 572, IAC 571-6 e IAC 313, os quais apresentaram os maiores desenvolvimentos da parte aérea e os maiores comprimentos das estrias acima do colo (Tabela 09).

Assim, com base nos comprimentos das estrias escuras formadas a partir do colo para as raízes, o porta-enxerto mais resistente ao fungo *P. chlamydospora* foi o Golia e o IAC 313 o mais suscetível (Tabela 09).

TABELA 09: Lesões (centímetros) provocadas pelo fungo *Phaeomoniella chlamydospora* nas regiões do colo-raiz e colo-parte aérea no sistema vascular dos diferentes porta-enxertos.

Porta-enxerto	Colo-Raiz	Colo- Parte Aérea
Ripária Gloire	11,46 ¹ ± 1,14 ² bc ³	9,94 ¹ ± 3,07 ² a ³
Ripária do Traviú	9,65 ± 2,59 ab	9,69 ± 4,44 a
IAC 766	9,50 ± 2,13 ab	9,67 ± 4,84 a
IAC 572	12,94 ± 1,05 bc	29,65 ± 6,93 c
IAC 571-6	11,68 ± 2,40 bc	19,72 ± 6,52 b
IAC 313	13,83 ± 0,58 c	22,84 ± 6,30 bc
SO4	9,39 ± 2,70 ab	9,58 ± 4,36 a
Paulsen	9,95 ± 2,84 ab	7,78 ± 3,78 a
Golia	7,66 ± 2,08 a	5,72 ± 1,46 a
Valor p	p < 0,01	p < 0,01

Legenda: ¹Média e ²Desvio padrão dos comprimentos das lesões

³Letras iguais na coluna não diferem entre si segundo o teste de Tukey a 5% de significância.

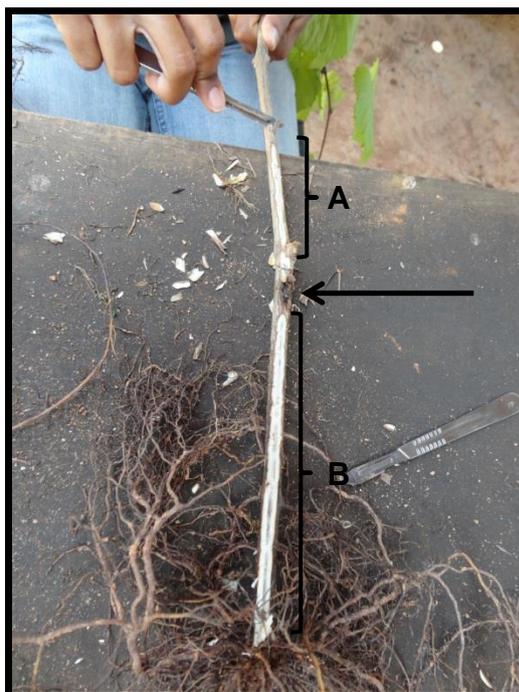


Figura 23: (A) Estrias escuras do colo em direção à parte aérea; ponto de inoculação indicado pela seta (colo); (B) Estrias escuras do colo em direção as raízes.

Mostert et al. (2006) fizeram uma revisão sobre espécies de *Phaeoacremonium* envolvidas na doença de Petri e na Esca. Dentre os tópicos abordados na revisão há um sobre resistência do hospedeiro. Neste, os autores comentam que dentre os estudos não há nenhum porta-enxerto ou copa que tenha mostrado alta resistência ou imunidade à doença de Petri ou Esca. Atestando as afirmações de Mostert et al. (2006), nenhum dos porta-enxertos testados no presente trabalho foi imune ao fungo *P. chlamydospora*, mas alguns apresentaram moderada resistência (Tabela 09).

Segundo Gramaje e Armengol (2011), resultados de experimentos com inoculação artificial têm demonstrado diferenças na suscetibilidade de porta-enxertos e copa, principalmente para os patógenos da doença de Petri. Isto foi constatado no presente estudo, conforme dados da Tabela 09.

Em um trabalho onde se inoculou artificialmente, através de suspensão de esporos, os porta-enxertos 1103 Paulsen e 110 Richter (*V. rupestris* x *V. berlandieri*) e cultivares *V. vinifera* (Chardonnay e Anglianico) com *P. chlamydospora*, constatou-se uma maior suscetibilidade nos porta-enxertos do que nas cultivares. O cultivar Anglianico registrou o nível mais baixo de danos, já os porta-enxertos apresentaram um nível alto de dano (ZANZOTTO et al., 2008). Resultados similares foram obtidos na Austrália, onde sete porta-enxertos [Ramsey, 99 Richter, Schwarzmann (*Vitis riparia* x *Vitis rupestris*), Kober 5BB (*Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*), P 1103, 101-14 Millardet e SO4] foram mais suscetíveis a *P.*

chlamydospora do que os cultivares de *V. vinifera* (Merlot, Cabernet Sauvignon, Pinot Noir, Shiraz PT10 e Shiraz PT23) (WALLACE et al., 2004).

Díaz et al. (2009) inocularam os porta-enxertos 3309 C, 1103 P, 101-14 MG, Kober 5BB e SO4 e no cultivar *V. vinifera* cv. Carménère com uma suspensão de conídios de *Phaeomoniella chlamydospora* e de *Phaeoacremonium aleophilium*. Os porta-enxertos que mostraram menor suscetibilidade foram o 1103 P (*V. berlandieri* x *V. rupestris*) e 101-14 MG (*V. riparia* x *V. rupestris*). O SO4 foi o que teve a maior suscetibilidade e já o Kober 5BB e 3309 tiveram uma suscetibilidade intermediária perante os que apresentaram menor suscetibilidade (1103 P e 101-14 MG).

Eskalen et al. (2001) verificaram a suscetibilidade de vários porta-enxertos frente ao fungo *P. chlamydospora*. As estrias escuras no sistema vascular das plantas foram medidas, após um ano da inoculação. Dentre os materiais, 99R (*V. rupestris* x *V. berlandieri*), 39-16 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*), Freedom (Dogridge x Couderc 1613), Ripária Gloire, 140Ru (*V. rupestris* x *V. berlandieri*), 16-16 e 1103 (*V. berlandieri* x *V. rupestris*) destacaram-se como os mais suscetíveis. Segundo Eskalen et al. (2001) não há um material totalmente resistente ao fungo *P. chlamydospora*.

De acordo com os dados do comprimento das estrias formadas a partir do colo para raiz (Figura 02), os porta-enxertos Ripária Gloire, Ripária do Traviú, IAC 766, IAC 571-6, Paulsen 1103 e SO4 apresentaram um nível de resistência semelhante entre si, diferindo significativamente do IAC 313, IAC 572 e Golia, sendo que os dois primeiros (IAC 313 e IAC 572) apresentaram a maior suscetibilidade e o último (Golia) a maior resistência ao fungo *P. chlamydospora*. A semelhança entre os porta-enxertos mais resistentes ao fungo deve-se ao fato de terem a participação das espécies *Vitis riparia*, *V. rupestris* ou *V. berlandieri* em suas origens, sugerindo à herança genética destas espécies de *Vitis* como responsáveis pela resistência ao fungo *P. chlamydospora*. Segundo Gramaje et al. (2010), plantas originadas do cruzamento de *V. riparia* x *V. berlandieri* (SO4) podem ser menos suscetível aos patógenos da doença de Petri. Além disto, os dados do presente trabalho (Tabela 09) estão de acordo com os comentários de Gramaje; Armengol (2011), ou seja, há diferenças na suscetibilidade dos materiais frente aos fitopatógenos da doença de Petri.

Nas avaliações do presente trabalho (Tabela 09), os porta-enxertos IAC 572, IAC 313 e IAC 571-6 foram bastante suscetíveis ao fungo *P. chlamydospora*. Esses porta-enxertos tiveram uma maior importância uma vez que são amplamente utilizados, principalmente na viticultura brasileira do estado de São Paulo (IAC 572) e do Vale do São Francisco (IAC 313) (DONÁ et al., 2013). De forma geral, esse estudo ressalta, além da importância de se ter um porta-enxerto com algum nível de resistência aos fungos da doença de Petri, de se utilizar, também, material vegetativo (muda) sadio para evitar o

aumento da incidência desta doença nas regiões produtoras. No entanto, há limitações nas técnicas correntes para desinfestar e atestar a sanidade dos materiais vegetativos (MUNDY & MANNING, 2010), o que implica em desenvolvimento de novas metodologias, principalmente na disponibilização de mudas sadias para os produtores.

6.5) Solarização, Biofumigação e Termoterapia para desinfecção do porta-enxerto IAC 766 de 'Niagara Rosada' contendo *Phaeomoniella chlamydospora* e o efeito destas técnicas no desenvolvimento do seu sistema radicular

De acordo com os dados da Tabela 10, os tratamentos Solo+Couve a 37°C (biofumigação), Solo-Couve a 37°C (solarização) e 37°C, aplicados nos períodos de 1, 3 e 6 dias e seguidos de complemento adicional de termoterapia causaram apenas a diminuição do percentual do fungo nas mudas e não a sua total eliminação.

Ao analisar os tratamentos com os períodos de 7, 14 e 21 dias, verifica-se que os tratamentos sem complemento da termoterapia não possibilitaram a desinfecção das plantas já que não houve a eliminação do fungo nos fragmentos do sistema vascular amostrados na região do colo. Os tratamentos complementados com a termoterapia reduziram significativamente o percentual de incidência do fungo nas plantas, eliminando totalmente o fungo *P. chlamydospora* para as combinações envolvendo os tratamentos biofumigação e temperatura de 37°C mais acréscimo de termoterapia (Tabela 11).

TABELA 10: Porcentagem de incidência de *Phaeomoniella chlamydospora* em fragmentos do sistema vascular da região do colo de mudas de 'Niagara Rosada' enxertadas no porta-enxerto IAC 766, submetidas a diferentes tratamentos por diferentes períodos de tempo, com e sem complemento da termoterapia.

Tratamento	Termoterapia 51°C/30 minutos	Tempo de exposição aos tratamentos (dias)	Frequência e Sobrevivência (%)
Solo + Couve sob 37°C "Biofumigação"	Sem	1	11,0 a ¹ A ² β ³
		3	10,0 a A α
		6	51,0 b C β
Solo - Couve sob 37°C "Solarização"	Sem	1	19,0 ¹ a AB α
		3	13,0 a A β
		6	29,0 a B β
37°C Testemunha (sem solo e sem couve)	Sem	1	8,0 a A α
		3	46,0 b B β
		6	30,0 b B β
23°C Testemunha absoluta	Sem	1	30,0 b B β
		3	43,0 b B β
		6	9,0 a A α
Solo + Couve sob 37°C "Biofumigação"	Com	1	1,0 a A α
		3	4,0 a A α
		6	6,0 a AB α
Solo - Couve sob 37°C "Solarização"	Com	1	9,0 a A α
		3	1,0 a A α
		6	1,0 a A α
37°C Testemunha (sem solo e sem couve)	Com	1	3,0 ab A α
		3	0,0 a A α
		6	13,0 b BC α
23°C Testemunha absoluta	Com	1	5,0 a A α
		3	0,0 a A α
		6	24,0 b C β

Legenda: ¹80 repetições por tratamento e para cada período de avaliação; ²Letras minúsculas: comparação de períodos diferentes fixando a termoterapia e o tratamento; ³Letras maiúsculas: comparação de tratamentos fixando a termoterapia e o período; ⁴Letras gregas: comparação de termoterapia fixando o tratamento e o período. As comparações foram embasadas segundo o teste de associação de Goodman com 5% de significância.

Ao observar a ação dos tratamentos com o acréscimo da termoterapia, observou-se um efeito aditivo e significativo da termoterapia na desinfecção das plantas contendo o fungo, principalmente quando se observa os tratamentos solo + couve a 37°C (biofumigação) e somente 37°C associados à termoterapia. Estes tratamentos chegaram a eliminar totalmente o fungo nas plantas, nos períodos de tempo com 7, 14 e 21 dias (Tabela 11).

Estudando o efeito da simulação da solarização do solo com materiais vegetais (biofumigação) sobre o crescimento micelial de diferentes fungos fitopatogênicos habitantes de solo, Basseto et al. (2011) constataram que a principal causa do efeito fungicida, ou seja, a morte do micélio dos fungos *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, *Rhizoctonia solani* AG 4 HGI e *Sclerotium rolfii*, foi a temperatura alta (37°C) associada ao período de exposição a ela e não aos gases fungitóxicos gerados pela biofumigação. Basseto et al. (2012) ao avaliarem o efeito da simulação da solarização do solo com materiais vegetais (biofumigação) na sobrevivência de estruturas de resistência de fitopatógenos de solo, verificaram que a biofumigação reduziu significativamente a sobrevivência das estruturas de resistência de todos os fungos estudados, como *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, *R. solani* AG 4 HGI, *S. rolfii* e *Macrophomina phaseolina*.

Considerando as asserções de Basseto et al. (2011) e Basseto et al. (2012) e o fato do fungo *P. chlamydospora* produzir a mesma estrutura de resistência do fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2 pode-se, em hipótese, inferir que a eliminação de *P. chlamydospora* nas mudas de 'Niagara Rosada' nos tratamentos solo + couve a 37°C (biofumigação) e somente 37°C, seguidos de termoterapia, deveu-se à interação de gases fungitóxicos, gerados pela biofumigação e tempo de exposição às temperaturas altas de 37°C da BOD e de 51°C da água do banho-maria da termoterapia (Tabela 11).

Gramaje et al. (2008) verificaram a termoterapia aplicada em condições *in vitro* sobre os fitopatógenos da doença de Petri, quando testaram várias temperaturas, de 49 até 54°C, em três tempos de exposição: 30, 45 e 60 minutos. Após a aplicação da técnica, concluíram que na faixa de temperatura de 51-52°C houve drástica redução da germinação de conídios e crescimento micelial de *P. chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* e *P. parasiticum*, mas não a eliminação dos mesmos. Sendo assim, chamam a atenção para o fato de se usar temperaturas acima de 51°C para tratar os materiais de propagação de videira.

Rooney; Gubler (2001) utilizaram a técnica de termoterapia em mudas de videira dormentes de três cultivares de *Vitis vinifera*, Cabernet Sauvignon, Pinot noir e Thompson Seedless, para eliminar os fungos *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium inflatipes*, nas condições de 51°C por 30 minutos. Estes autores não obtiveram bom

resultado, pois não houve a total eliminação ou até mesmo a diminuição dos patógenos dos materiais.

Fourie; Halleen (2004) afirmaram que apenas a utilização da técnica de termoterapia não elimina os agentes patogênicos da doença de Petri, mas se as mudas de videira dormentes forem mergulhas em formulações de Benomil e/ ou *Trichoderma*, integradas com a termoterapia, poderia resultar em uma total eliminação dos patógenos. No entanto, isto necessita de mais pesquisas.

De acordo com Waite; Morton (2007), a técnica de termoterapia utilizando o padrão de tratamento de 50°C por 30 minutos não é considerada eficiente para o controle de algumas pragas endógenas e agentes patogênicos de videira, ou seja, não há a total eliminação dos mesmos.

Whiting et al. (2001) e Rooney; Gluber (2001) relataram que a termoterapia de 51°C, por 30 minutos, não é suficiente para reduzir ou eliminar totalmente *P. chlamydospora* e *P. inflatipes* de materiais dormentes de videira. Essa afirmação e as de Gramaje et al. (2008), de Fourie; Halleen (2004) e de Waite; Morton (2007) estão de acordo com os resultados do presente trabalho, no tratamento onde as mudas do porta-enxerto IAC 766 enxertadas em 'Niagara Rosada' ficaram no microcosmo sem solo e sem couve em BOD a 23°C por 7, 14 e 21 dias e após cada tempo passou por posterior complemento de termoterapia a 51°C por 30 minutos. Neste tratamento, observou-se que o fungo *P. chlamydospora* não foi totalmente eliminado do material (Tabela 11).

À exceção de Fourie; Halleen (2004), poucos autores associaram outros tratamentos com termoterapia para eliminar os fitopatógenos da doença de Petri, em material de propagação de videira. Tal associação traz resultados satisfatórios quanto à total eliminação, conforme os dados da Tabela 11.

Tabela 11: Frequência de ocorrência e percentual de sobrevivência de *Phaeoconiella chlamydospora* em fragmentos do sistema vascular da região do colo de mudas de ‘Niagara Rosada’ enxertadas no porta-enxerto IAC 766 e submetidos a tratamentos de desinfecção, nos tempos com 7, 14 e 21 dias, com e sem complemento de termoterapia.

Tratamento	Termoterapia 51°C/30 minutos	Tempo de exposição aos tratamentos (dias)	Frequência e Sobrevivência (%)
Solo+Couve: 37°C “Biofumigação”		7	25,0 ¹ b ² B ³ β ⁴
		14	6,3 a AB α
		21	7,5 ab A α
Solo-Couve: 37°C “Solarização”		7	20,0 a B β
		14	1,3 a A α
		21	45,0 b B β
37°C Testemunha (sem solo e sem couve)	Sem	7	2,5 a A α
		14	16,3 a B β
		21	15,0 a A β
23°C Testemunha Absoluta		7	0,0 a A α
		14	13,8 b AB α
		21	2,5 ab A α
Solo+Couve: 37°C “Biofumigação”		7	0,0 a A α
		14	0,0 a A α
		21	0,0 a A α
Solo-Couve: 37°C “Solarização”		7	0,0 a A α
		14	0,0 a A α
		21	1,3 a A α
37°C Testemunha (sem solo e sem couve)	Com	7	0,0 a A α
		14	0,0 a A α
		21	0,0 a A α
23°C Testemunha absoluta		7	2,5 a A α
		14	2,5 a A α
		21	1,3 a A α

Legenda: ¹80 repetições por tratamento e para cada período de avaliação; ²Letras minúsculas: comparação de períodos diferentes fixando a termoterapia e o tratamento; ³Letras maiúsculas: comparação de tratamentos fixando a termoterapia e o período; ⁴Letras gregas: comparação de termoterapia fixando o tratamento e o período.

Todas as comparações foram embasadas segundo o teste de Goodman com 5% de significância.

Ao observar o efeito dos melhores tratamentos de desinfecção de mudas contra *P. chlamydospora*, associados ou não à termoterapia, em futuros danos nestas mudas, constatou-se que os tratamentos solo + couve a 37°C (biofumigação) e somente 37°C até com 14 dias de tratamento mais complemento de termoterapia não causam problemas no enraizamento das estacas do porta-enxerto IAC 766 (Figuras 25 e 26). Nestes tratamentos, as estacas apresentaram em média 75% de formação de raízes (Tabela 12).

Na Austrália, materiais de videira utilizados no viveiro são tratados rotineiramente com termoterapia (50°C por 30 minutos) e muitos fungos e bactérias são inibidos sem causar danos na germinação destes materiais (WAITE, 1998).

Nessa linha de danos em materiais tratados com termoterapia, Gramaje et al. (2009) testaram cinco porta-enxertos: 41 B Mgt., 140 Ruggeri, 161-49 Couderc, 1103 Paulsen e 110 Richter e quatro combinações copa / porta-enxerto: Bobal / 1103 P, Merlot / 110 R, Tempranillo / 110 R e Tempranillo / 161-49 C e todos passaram pelo processo de termoterapia, em diferentes temperaturas e tempos de exposição a essas temperaturas e posterior tratamento em água fria, para que interrompesse o aquecimento, visando verificar a viabilidade destas videiras e sobrevivência dos fitopatógenos da doença de Petri. De acordo com os resultados, com exceção da temperatura de 54°C, a termoterapia até 53°C não implicou em danos no desenvolvimento destes materiais e ainda houve eliminação dos fitopatógenos na planta, principalmente quando se analisa os dados para o fungo *P. chlamydospora*.

No entanto, Gramaje; Armengol (2011) são mais cautelosos e não descartam danos térmicos às partes meristemáticas de explantes de videira, pela termoterapia. Segundo ainda Anonymous (1998), a termoterapia implica em redução drástica de fitopatógenos de videira e chega até a eliminá-los. Essa técnica deve ser aplicada corretamente, procurando expor o material a ser tratado em uma temperatura ideal e a um certo tempo a essa temperatura, pois em condições inapropriadas a termoterapia pode causar dano até em material vigoroso (Anonymous, 1998).

Os níveis aceitáveis de 75% de formação de raízes nas estacas do porta-enxerto IAC 766 em certos tratamentos (Tabela 12) vão de encontro com as afirmações de Waite (1998) e de Gramaje et al. (2009), ou seja, a termoterapia em condições adequadas pode eliminar *P. chlamydospora* no material de videira e não causar nenhum dano no seu desenvolvimento.



Figura 24: Estacas de videira do porta-enxerto IAC 766 tratadas pelos tratamentos de desinfecção nos períodos de 7, 14 e 21 dias com adicional ou não de termoterapia, sendo posteriormente plantadas em solo de canteiro para verificar o seu desenvolvimento e, principalmente, a emissão de raízes.

Tabela 12: Porcentagem de formação de raízes em estacas do porta-enxerto IAC 766 de 'Niagara

Rosada' submetidas a tratamentos de desinfecção em diferentes períodos de tempo, com e sem complemento de termoterapia.

Tratamento	Termoterapia 50°C/30 min.	Tempo de exposição aos tratamentos (dias)		
		7	14	21
Solo + Couve sob 37°C	Sem	100,0 ¹ a ² A ³ β ⁴	100,0 a A β	25,0 a A α
	Com	75,0 a A β	75,0 a A β	0,0 a A α
“Biofumigação”				
Solo - Couve sob 37°C	Sem	75,0 a A α	100,0 a A α	50,0 a AB α
	Com	50,0 a A α	75,0 a A α	50,0 a AB α
“Solarização”				
37°C testemunha (sem solo e sem couve)	Sem	75,0 a A α	50,0 a A α	100,0 b B α
	Com	100,0 a A β	75,0 a A αβ	25,0 a A α
23°C testemunha absoluta	Sem	100,0 a A α	100,0 a A α	100,0 a B α
	Com	75,0 a A α	100,0 a A α	100,0 a B α

Legenda: ¹Quatro repetições por tratamento e para cada período de avaliação; ²Letras minúsculas: comparação de termoterapia (sem e com) fixando o tratamento e o período; ³Letras maiúsculas: comparação de tratamentos fixando a termoterapia e o período; ⁴Letras gregas: comparação de períodos diferentes (7, 14 e 21 dias) fixando tratamento e termoterapia. As comparações foram embasadas segundo o teste de associação de Goodman com 5% de significância.

A aplicação por 21 dias dos tratamentos biofumigação com e sem complemento de termoterapia e temperatura de 37°C mais complemento de termoterapia causou dano significativo às estacas, resultando em 0%; 25% e 25% de formação de raízes nos tratamentos citados (Tabela 12 e Figura 27). O tratamento termoterapia (50°C por 30 minutos) testado isoladamente (23°C com termoterapia) não afetou o enraizamento das estacas, mas em contrapartida não eliminou o fungo *P. chlamydospora* das plantas (Tabelas 11 e 12). Danos podem ocorrer em partes de videira quando tratada por longo período com termoterapia utilizando temperaturas ≥ 50 °C, conforme relatos de Gramaje et al. (2009) e Gramaje; Armengol (2011).



Figura 25: Estacas de videira do porta-enxerto IAC 766 do período de 7 dias. (A) 23°C; (B) 37°C; (C) solo (S)+couve (C): 37°C; (D) S-C: 37°C sem termoterapia e (E) 23°C; (F) 37°C; (G) S+C: 37°C; (H) S-C: 37°C com termoterapia.



Figura 26: Estacas de videira do porta-enxerto IAC 766 do período de 14 dias. (A) 23°C; (B) 37°C; (C) solo (S)+couve (C): 37°C; (D) S-C: 37°C sem termoterapia e (E) 23°C; (F) 37°C; (G) S+C: 37°C; (H) S-C: 37°C com termoterapia.



Figura 27: Estacas de videira do porta-enxerto IAC 766 do período de 21 dias. (A) 23°C; (B) 37°C; (C) solo (S)+couve (C): 37°C; (D) S-C: 37°C sem termoterapia e (E) 23°C; (F) 37°C; (G) S+C: 37°C; (H) S-C: 37°C com termoterapia.

Os tratamentos biofumigação ou temperatura de 37°C devem ser aplicados por 14 dias seguindo-se do tratamento adicional de termoterapia a 50°C por 30 minutos, com o intuito de eliminar o fungo *P. chlamydospora* das estacas sem comprometer o enraizamento. Essas estacas saudáveis e normais podem ser utilizadas pelos viveiristas para a geração de plantas mães saudáveis, das quais serão retiradas as mudas garantidamente saudáveis, solucionando problemas apontados em estudos anteriores como a transmissão de fungos da doença de Petri em materiais propagativos por meio do uso de plantas mães doentes (Mostert et al., 2006) bem como do fato da termoterapia poder eliminar o fungo *P. chlamydospora* das plantas mas causar danos fisiológicos nas mesmas (Whiting et al., 2001; Rooney; Gluber, 2001; Gramaje et al., 2009; Gramaje; Armengol, 2011).

7. CONCLUSÕES

A doença de Petri ocorre e está disseminada em todo o estado de São Paulo nos cultivos da videira ‘Niagara Rosada’;

A espécie de *Phaeocremonium* prevalente foi *P. aleophilum*. No município de Jales, além de *P. aleophilum* detectou-se, também, a espécie *P. venezuelense*;

A única espécie de *Phaeomoniella* identificada foi *P. chlamydospora*;

Isolou-se mais *P. chlamydospora* do que *Phaeocremonium*, sendo a eficiência melhor para isto retirando-se fragmentos dos vasos do colo das plantas, seguido de desinfestação superficial e plaqueamento de fragmentos em meio de cultura Batata Dextrose Ágar.

No teste de patogenicidade, *Phaeomoniella* sp. foi mais severo do que *Phaeocremonium* sp. Os fungos foram re-isolados das plantas doentes, completando os postulados de Koch e oficializando a doença em ‘Niagara Rosada’ no estado de São Paulo – Brasil;

O local de colonização dos fungos *P. chlamydospora* e *Phaeomoniella dimorphosporum* foi o no colo das plantas de Niagara Rosada;

O porta-enxerto Golia foi o mais resistente ao fungo *P. chlamydospora* e IAC 313, IAC 571-6 e IAC 572 os mais suscetíveis e a herança genética das espécies *Vitis riparia* e *V. rupestris* pode ser a responsável pela resistência de alguns porta-enxertos, orientando programas de melhoramento genético que visem à obtenção de novos materiais resistentes, principalmente ao fungo *P. chlamydospora*;

A técnica de biofumigação (S+C sob 37°C) e a temperatura de 37°C, aplicadas por 7 e 14 dias, seguidas por posterior complemento de termoterapia, são promissoras na eliminação de *P. chlamydospora* no porta-enxerto IAC 766 de ‘Niagara Rosada’ e não causam danos no enraizamento do porta-enxerto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADALAT, K.; WHITING, C.; ROONEY, S.; GUBBLER, W.D. Pathogenicity of three species of *Phaeoacremonium* spp. on grapevine in California. **Phytopathologica Mediterranea**, v.39, 2000, p.92-99.

ALMANÇA, M. A. K.; ABREU, C. M.; SCOPEL, F. B.; BENEDETTI, M.; HALLEEN, F.; CAVALCANTI, F. R. **Evidências morfológicas da ocorrência de *Phaeomoniella chlamydospora* em videiras no estado do Rio Grande do Sul**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013 (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico 134), 5 p.

AMBRÓSIO, M. M. Q. **Sobrevivência de fitopatógenos de solo em microcosmo e em campo solarizado submetido a fermentação acelerada de diferentes materiais orgânicos**. 2006. 110 f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônomicas. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

AMBRÓSIO, M. M. Q.; BUENO, C. J.; PADOVANI, C. R.; SOUZA, N. L. Controle de fitopatógenos do solo com materiais vegetais associados à solarização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, n. 3, p. 354-358, 2008.

AMORIM, L.; KUNIYUKI, H. Doenças da videira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 1997. p. 736-757.

ANONYMOUS. *National Vine Accreditation Scheme*. Australian Vine Improvement Association Inc., Victoria, Australia.1998.

ANSARAH, M. G. dos R. **Turismo e segmentação de mercado: novos segmentos**. 2005.

APARECIDO, C. C., FURTADO, E. L.; FIGUEIREDO, M. B. Caracterização morfofisiológica de isolados do gênero *Cylindrocladium*. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 1, p. 38-47, 2008.

AROCA, A.; RAPOSO, R. Pathogenicity of *Phaeoacremonium* species on grapevines. **Journal of Phytopathology**, v. 157, p. 413–419, 2009.

BARBERCHECK, M. Control of *Meloidogyne javanica* in dormant grapevine nursery stock. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 18, n. 1, p. 39-40, 1986.

BASSETO, M. A.; BUENO, C. J.; CHAGAS, H. A.; ROSA, D. D.; PADOVANI, C. R.; FURTADO, E. L. Efeitos da simulação da solarização do solo com materiais vegetais sobre o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.3, p.116-120, 2011.

BASSETO, M. A.; BUENO, C. J.; AUGUSTO, F.; PEDROSO, M. P.; FURLAN, M. F.; PADOVANI, C. R.; FURTADO, E. L.; SOUZA, N. L. Solarização em microcosmo: efeito de materiais vegetais na sobrevivência de fitopatógenos de solo e na produção de voláteis. **Summa Phytopathologica**, v.38, n.2, p.123-130, 2012.

BETTUCCI, L.; MALVAREZ, I.; DUPONT, J.; BURY, E.; ROQUEBERT, M.F. Parana river delta wetlands soil microfungi. **International Journal of Soil Biology**. v.46, n. 6, p.606-623, 2002.

BRAYFORD, D. *Cylindrocarpon*. In: Singleton, L.L., Mihail, J.D. & Rush, C.M. (Eds.) **Methods for research soilborne phytopathogenic fungi**. St Paul. APS Press. 1993. pp.103-106.

BRUEHL, G. W.; KAISER, W. J. Some effects of water potential upon endophytic *Acremonium* spp. in culture. **Mycologia**, v. 88, p. 809-815, 1996.

BUENO, S.C.S (coordenação) et al. **Vinhedo Paulista**. Campinas, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral – CATI, 2010.265 p.

CAMARGO, L.E.A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.) Manual de Fitopatologia. V.1: Princípios e Conceitos. São Paulo. Agronômica Ceres. 1995. pp.729-760.

CHICAU, G. Doença de petri e pé negro da videira. **Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas**. 2006.

CORREIA, K. C.; CÂMARA, M. P. S.; BARBOSA, M. A. G.; SALES Jr., R.; AGUSTÍ-BRISACH, C.; GRAMAJE, D.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ABAD-CAMPOS, P.; ARMENGOL, J.; MICHEREFF, S. J. **Fungal species associated with trunk diseases of table grapes in Northeastern Brazil**. In: PROCEEDINGS OF THE 8th INTERNATIONAL WORKSHOP ON GRAPEVINE TRUNK DISEASES: ESCA AND GRAPEVINE DECLINES. 18–21 June, Valencia, Spain, 2012.

CONDE, C.; SILVA, P.; FONTES, N.; DIAS, A.C.P.; TAVARES, R.M.; SOUSA, M.J.; AGASSE, A.; DELROT, S.; GERÓS, H. Biochemical changes throughout grape Berry development and fruit and wine quality. **Food**, London, v.1, n.1, p.1-22, 2007.

CROUS, P. W.; GAMS, W. *Phaeoconiella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. **Phytopathologia Mediterranea**. South Africa, v.39, n.1, p. 112-118, 2000.

DÍAZ, A. G, ESTERIO, M., AUGERI, J., Effects of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine rootstocks. *Ciencia e Investigación Agraria*, v. 36 (3), p. 381-390, 2009.

DONÁ, S.; KANTHACK, R.A.D.; TECCHIO, M.A. Diferentes porta-enxertos e o desenvolvimento inicial da videira 'Niágara Rosada' na região paulista do médio Paranapanema. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 10, n. 1, 2013.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

DUPONT, J.; LALOUI, W.; ROQUEBERT, M.F. Partial ribosomal DNA sequences show an important divergence between *Phaeoacremonium* species isolated from *Vitis vinifera*. **Mycological Research**, v.102, p.631-637, 1998.

DUNCAN, A. Glucasinolates. In: D' MELLO, J. P.; DUFFUS, C. M.; DUFFUS, J. H. (Eds.). **Toxic substances in crop plants**. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2001, p. 127-147.

EDWARDS, J.; PASCOE, I. Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v. 33, n. 2, p. 273–279, 2004.

ESKALEN, A.; GUBLER, W. D. Association of spores of *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium inflatipes*, and *Pm. aleophilum* with grapevine cordons in California. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 40, n. 3, p. 429-432, 2001.

FAO, 2013. Organização das Nações Unidas para a agricultura e alimentação Disponível em: < <http://www.faostat.fao.org/> >. Acesso em: 10 mar. 2016

FIGUEIREDO, M.B. Estudo sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patogênicos em plantas. **O Biológico**, São Paulo, v.33, p.9-13, 1967.

FOURIE, P. H.; HALLEEN, F. Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 88, n. 11, p. 1241–5, 2004.

GAMLIEL, A.; STAPLETON, J. J. Characterization of antifungal volatile compounds involved from solarized soil amended with cabbage residues. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, p. 899-905, 1993 (a).

GAMLIEL, A.; STAPLETON, J. J. Effect of soil amendment with chicken compost or ammonium phosphate and solarization on pathogen control, rhizosphere microorganisms and lettuce growth. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, p. 886-891, 1993 (b).

GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R.; GOMES, V. N. Fungos Associados com o Declínio e Morte de Videiras no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, vol. 29, n. 3, p.322-324, 2004.

GATICA, M.; CESARI, C.; MAGNIN, S.; DUPONT, J. *Phaeoacremonium* species and *Phaeomoniella chlamydospora* in vines showing hoja de malvon and young vine decline symptoms in Argentina. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 40, n. 3, p. S317–324, 2001.

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

GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1323–1330, 1995.

GOODMAN, L.A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. **Annals of Mathematical Statistics**. v. 35, p. 716-725, 1964.

GOODMAN, L.A. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. **Technometrics**. v. 7, p. 247-254, 1965.

GRAHAM, A. B., JOHNSTON, P. R., WEIR, B. S. Three new *Phaeoacremonium* species on grapevines in New Zealand. **Australasian Plant Pathology**. 2009, 38, 505–513.

GRAMAJE, D.; GARCÍA-JIMENEZ, J.; ARMENGOL, J. Sensitivity of Petri disease pathogens to hot-water treatments *in vitro*. **Annals of Applied Biology**, v. 153, p.95-103, 2008.

GRAMAJE, D., ARMENGOL, J., MOHAMMADI, H., BANIHASHEMI, Z., MOSTERT, L. Novel *Phaeoacremonium* species associated with Petri disease and esca of grapevine in Iran and Spain. **Mycologia**. 2009(a), p. 920–929.

GRAMAJE, D., ARMENGOL, J., SALAZAR, D., LOPÉZ-CORTÉS, I., GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Effect of hot-water treatments above 50°C on grapevine viability and survival of Petri disease pathogens. **Elsevier** .2009(a), p. 280-285.

GRAMAJE, D.; ALANIZ, S.; ABAD-CAMPOS, P.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Effect of hot-water treatments *in vitro* on conidial germination and mycelial growth of grapevine trunk pathogens. **Annals of Applied Biology**, v. 156, p. 231-241, 2010.

GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management Strategies. **Plant Disease**, v. 95, n. 9, p. 1040-1055, 2011.

GUBLER, W.D.; URBES-TORRES, J.R.; TROUILLAS, F.P.; HERCHE, R.; STRIEGLER, R.; CARTRIGHT, R.D.; KREIDDY, J.; RUPE, J.C. **Grapevine Trunk Diseases: Etiology, Epidemiology and Control**. In: Proceedings of the symposium on advances in vineyard pest management. Institute for continental climate viticulture and enology. University of Missouri Extension, 2010, 88p.

HALLEEN, F.; VAN NIEKERK, J.; MOSTERT, L.; FOURIE, P.; CROUS, P. Trunk disease pathogens associated with apparently healthy nurse grapevines. **Wynboer**, p. 12-14, 2005.

HALLEEN, F.; MOSTERT, L.; CROUS, P. Pathogenicity testing of lesser-known vascular fungi of grapevines. **Australasian Plant Pathology**, v.36, n.3, p. 277-285, 2007.

HERNANDES, J. L.; MARTINS, F. PEDRO JÚNIOR, M. J. **Uso de portaenxertos- Tecnologia simples e fundamental na cultura da videira**. 2010. Artigo em Hypertexto. Disponível em: < http://www.infobibos.com/Artigos/2010_2/PortaEnxertos/index.htm >. acesso em: 20 fev.2016.

IBGE – instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2015. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>. Acesso em: 11 fev. 2016.

IBGE – instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2016. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>. Acesso em: 05 mar. 2016.

KATAN, J.; GREENBERGER, A.; ALON, H.; GRINSTEIN, A. Solar heating by polyethylene mulching for the control of disease caused by soilborne pathogens. *Phytopathology*, St. Paul, v. 66, p. 683-688, 1976.

LODHA, S.; SHARMA, S. K.; AGGARWAL, R. K. Solarization and natural heating of irrigated soil amended with cruciferous residues for improved control of *Macrophomina phaseolina*. **Plant Pathology**, London, v. 46, p. 186-190, 1997.

LORENA, T.; CALAMASSI, R.; MORI, B.; MUGNAI, L.; SURICO, G. *Phaemoniella chlamydospora*-grapevine interaction: histochemical reactions to fungal infection(1). **Phytopathologia Mediterranea**. Itália, 40, 2001.p 400-406.

LOSSO, F. B.; PEREIRA, R. M. F. do A.O Turismo e a Produção de Vinhos Finos na Região de São Joaquim (SC): Notas Preliminares. in: VI Seminario de Pesquisa em Turismo do Mercosul, Caxias do Sul, RS, Brasil, 2010.

MAIA, J.D.G; CAMARGO, U.A. O Cultivo da videira Niágara Rosada no Brasil. Brasília, DF: EMbrapa, 2012. 1 ed 301 p.

MELLO, L.M.R. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2012**. 2013. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot137.pdf>>. Acesso em: 26 fev. 2016.

MELLO, L.M.R. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2014**. 2015. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1025934/1/ComunicadoTecnico175.pdf>>. Acesso em: 26 fev. 2016.

MORRA, M. J.; KIRKEGAARD, J. A. Isothiocyanate release from soil-incorporated brassica tissues. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 34, p. 1683-1690, 2002.

MOSTERT, L., GROENEWALD, J. Z., SUMMERBELL, R. C., ROBERT, V., SUTTON, D. A., PADHYE, A. A., CROUS, P. W. Species of *Phaeoacremonium* associated with infections in humans and environmental reservoirs in infected woody plants. **Journal of clinical microbiology**. p. 1752–1767, V. 43, N. 4, 2005.

MOSTERT, L.; HALLEEN, F.; FOURIE, P.; CROUS, P. W. A review of *Phaeoacremonium* species involved in Petri disease and esca of Grapevines. **Phytopathologia Mediterranea**. South Africa , v. 45, p. 12-29, 2006.

MUNDY, D. C., MANNING, M. A. Ecology and management of grapevine trunk diseases in New Zealand: a review. *New Zealand Plant Protection*, v. 63, p. 160-166, 2010.

MUGNAI, L.; GRANITI, A.; SURICO, G. Esca (black measles) and brown wood-streaking two old and elusive diseases of grapevine. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, n. 5, p. 404-417, 1999.

O'DONNELL K.; KISTLER, H.C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R.C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 2044-2049, 1998.

OLIVEIRA, H.; REGO, C.; NASCIMENTO, T. Decline of Young grapevine caused by fungi. **Acta Horticulturae**, v.652, 2004, p.295-304.

PINTO, P. S. G. C. **Doença de Petri da Videira: Avaliação da eficácia de fungicidas na proteção de feridas de poda**. 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônômica) - Instituto Superior de Agronomia/Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2010.

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

QUAGLIA, M.; COVARELLI, L.; ZAZZERINI, A. Epidemiological survey on esca disease in Umbria, central Italy. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 48, n. 1, p. 84-91, 2009.

RAMIREZ-VILLAPUDUA, J.; MUNNECKE, D. E. Control of cabbage yellows (*Fusarium oxysporum* f.sp. *couglutinans*) by solar heating of field soil amended with dry cabbage residues. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, p. 289-295, 1988.

REGO, M. C.; PÁDUA, A.; CARVALHO, A.; OLIVEIRA, H. Contributo para o estudo da espécie *Cylindrocarpon destructans* (Zin.) Scholten Declínio e Morte de Plantas de Videira 39 em material vitícola nacional. In: SIMPÓSIO DE VITIVINICULTURA DO ALENTEJO, 4., 1998, Évora, Portugal. Actas... [S.l.: s.n.], 1998. v. 1, p. 129-135.

ROONEY, S. N.; GUBLER, W. D. Effect of hot water treatments on eradication of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from dormant grapevine wood. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 40, p.467-472, 2001.

ROONEY, S. N.; ESKALEN, A.; GUBLER, W. D. Recovery of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from soil and grapevines tissue. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 40, n. 3, p. 351-356, 2001.

ROSA, E. A. S.; HEANEY, R. K.; FENWICK, G. R. Glucosinolates in crop plants. *Horticultural Reviews*, New York, v. 19, p. 99-215, 1997.

SCHECK, H.J.; VASQUEZ, S.J.; GUBLER, W.D. First report of black-foot disease, caused by *Cylindrocarpon obtusisporum* of grapevine in California. **Plant Disease**, v. 82, p. 448, 1998.

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

da SILVA, P. C. G., CORREIA, R. C. Caracterização social e econômica da videira. 2004. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira/socioeconomia.htm>>. Acesso em 10 ago. 2015

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R.; JÚNIOR, A. G. Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil. **Circular Técnica**. Bento Gonçalves, n. 56, dez. 2005.

de Souza, J.S.I. Viticultura brasileira: principais variedades e suas características, Piracicaba: FEALQ. 368 p. 2002.

SOUZA, N. L. Solarização do solo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 20, n. 2, p. 3-15, 1994.

SOUZA, N. L. Interação entre solarização e incorporação prévia de matéria orgânica no solo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 1, p. 142-145, 2004.

SOUZA, N. L.; BUENO, C. J. Sobrevivência de clamidósporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2 e *Sclerotium rolfsii* em solo solarizado incorporado com matéria orgânica. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 2, p. 153-160, 2003.

SPARAPANO, L.; BRUNO, G.; GRANITI, A. Effects on plants of metabolites produced in culture by *Phaeacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 39, 169-177, 2000.

SUBBARAO, K. V.; HUBBARD, J. C. Interactive effects of broccoli residue and temperature on *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil and on wilt in cauliflower. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, n. 12, p. 1303-1310, 1996.

SURICO G. L.; MUGNAI, L.; MARCHI, G. Older and more recent observations on esca: a critical overview. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 45, p. S68-S86, 2006. Suplemento.

TEIXEIRA, H.; CHITARRA, L.G.; ARIAS, S.M.S.; MACHADO, J.C. Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 6, p. 1314-1320, 2001.

VON BROEMBSSEN S.; MARAIS, P. G. Eradication of *Phytophthora cinnamomi* from grapevine by hot water treatment. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 10, n. 1, p. 25-27, 1978.

WAITE, H. The effects of hot water treatment on the mortality of grapevine propagules. **The Australian Grapegrower and Winemaker** 414a, p.114–116, 1998.

WAITE, H. MORTON, L. Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 46, p. 5-17, 2007.

WALLACE, J.; EDWARDS, J.; PASCOE, I. G.; MAY, P. *Phaeomoniella chlamydospora* inhibits callus formation by grapevine rootstock and scion cultivars. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 43, p. 151-152, 2004.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SHINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic, 1990. p.315-322

WHITEMAN, S. A.; STEWARD, A.; RIDGWAY, H. J.; JASPERS, M. V. Infection of rootstock mother-vines by *Phaeomoniella chlamydospora* results in infected young grapevines. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v. 36, n. 2, p. 198-203, 2007.

WHITING, E. C.; KHAN, A.; GUBLER, W. D. Effect of temperature and water potential on survival and mycelial growth of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. **Plant Disease**. California, v. 85, n.2, p.195-201, 2001.

ZANZOTTO, A.; GARDIMAN, M.; LOVAT, L. Effect of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* sp. on *in vitro* grapevine plants. **Sci. Hortic.** v. 116, p. 404-408, 2008.

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