



Técnicas de desinfecção combinadas ou não com tratamento com água quente sobre o fungo *Phaeomoniella chlamydospora* e sobre estacas de videiras infectadas com o patógeno

FABIANA BRAMBATTI

Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio

Técnicas de desinfecção combinadas ou não com tratamento com água quente sobre o fungo *Phaeomoniella chlamydospora* e sobre estacas de videiras infectadas com o patógeno

Fabiana Brambatti

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. César Júnior Bueno

São Paulo

2019

Fabiana Brambatti

Técnicas de desinfecção combinadas ou não com tratamento com água quente sobre o fungo *Phaeomoniella chlamydospora* e sobre estacas de videiras infectadas com o patógeno

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Orientador: Professor Dr. César Júnior Bueno

São Paulo

2019

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

Assinatura: _____ Data: ____/____/____

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

Brambatti, Fabiana.

Técnicas de desinfecção combinadas ou não com tratamento com água quente sobre o fungo *Phaeoconiella chlamydospora* e sobre estacas de videiras infectadas com o patógeno. / Fabiana Brambatti. - São Paulo, 2019.

51 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2019D.FB018

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: César Júnior Bueno.

Versão do título para o inglês: Disinfection techniques combined or not with hot water treatment on *Phaeoconiella chlamydospora* and on pathogen-infected grapevine cuttings.

1. *Phaeoconiella chlamydospora* 2. Tratamento com água quente 3. Videira 4. Biofumigação I. Brambatti, Fabiana II. Júnior Bueno, César III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2019/018

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Fabiana Brambatti

Título: Técnicas de desinfecção combinadas ou não com tratamento com água quente sobre o fungo *Phaeomoniella chlamydospora* e sobre estacas de videiras infectadas com o patógeno

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

Aprovado em: 30/05/2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. César Junior Bueno

Instituição : Instituto Biológico

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Jesus Guerido Töfoli

Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr^a. Margarida Fumiko Ito

Instituição: Instituto Agrônomo de Campinas, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade, Fitopatologia.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus avós, que por meio da agricultura familiar, derramaram seu suor na terra e conseguiram sustentar seus filhos e os sonhos de uma vida digna.

AGRADECIMENTOS

À força maior que rege o universo;

À minha família pelo apoio, carinho e compreensão pela minha ausência, durante todo o período de realização da pós graduação;

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

Aos funcionários do Instituto Biológico de Campinas, o senhor Alcides pela constante ajuda com as mudas de videira e a Stella e a Rose pelo carinho;

A CAPES e ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos que proporcionou me dedicar ao presente trabalho;

Ao meu orientador o pesquisador Dr. César Júnior Bueno pelos ensinamentos, paciência e bondade durante essa trajetória;

A todos os amigos que conheci nesta linda caminhada científica e que fizeram meus dias mais felizes;

Aos amigos do laboratório de Bioquímica Fitopatológica de São Paulo, Gustavo, Samuel, Carlos, Pedro, Alexsander, Amanda, Patrícia, Mariane, Uiara, Matheus, que muito me ajudaram durante os testes de biologia molecular e proporcionaram momentos de lazer e amizade que sempre levarei em minhas memórias ;

Aos amigos dos laboratórios de Campinas, ao casal Julie e Fernando e sua linda filha Sara , Érika, Natalie, Rafaelly, Flávio e Renata, pelo companheirismo, amizade, carinho além do meio científico;

E a todos, que forma direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho;

Agradeço.

RESUMO

BRAMBATTI, Fabiana. **Técnicas de desinfecção combinadas ou não com tratamento com água quente sobre o fungo *Phaeomoniella chlamydospora* e sobre estacas de videiras infectadas com o patógeno.** Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 2019.

No Brasil, o estado do Rio Grande do Sul se destaca quanto à produção de uva no País. Uma das principais doenças da cultura da videira é a doença de Petri. Essa doença é causada por uma combinação de vários fungos, destacando-se *Phaeomoniella chlamydospora*. Dentre as principais fontes de inóculo dos fitopatógenos da doença de Petri destaca-se o plantio de mudas contaminadas. O tratamento padrão de desinfecção de estacas de porta-enxertos de videira para produção de mudas e matrizes é o HWT (*heat water treatment*, 50°C por 30 minutos), porém a sua eficácia ainda é contestada no mundo. Essa eficácia é duvidosa em estudos sobre o fungo também. Assim, os objetivos do presente estudo foram: 1) Verificar o efeito direto de diferentes temperaturas em banho-maria (HWT) sobre o fungo *P. chlamydospora* e o reflexo no seu crescimento em meio de cultura; 2) Verificar o efeito de diferentes tratamentos de desinfecção [biofumigação = solo + couve a 40°C; temperaturas de 40°C e 23°C, tudo em microcosmo], em diferentes períodos (7; 14 e 21 dias), com e sem tratamento adicional com água quente (HWT – 51°C por 30 minutos), sobre o fungo *P. chlamydospora* e o reflexo no seu crescimento em meio de cultura; 3) Verificar o efeito de diferentes tratamentos de desinfecção [biofumigação = solo + couve a 40°C; temperaturas de 40°C e 23°C, tudo em microcosmo] com diferentes períodos de uso destes tratamentos (7, 14 e 21 dias), com e sem tratamento adicional com água quente (HWT – 51°C por 30 minutos) sobre estacas do porta-enxerto de videira IAC 7666 infectadas com *P. chlamydospora* e o reflexo na eliminação do fungo na planta sem afetá-la fisiologicamente, principalmente quanto a formação de raízes. Os resultados obtidos nos ensaios demonstraram que temperaturas altas (55-70°C) aplicadas diretamente sobre o fungo inviabilizaram o seu crescimento em meio de cultura. As técnicas de biofumigação a 40°C e a temperatura de 40°C agindo por

até 14 dias e combinadas ou não com HWT, quando aplicadas diretamente sobre o fungo, inviabilizaram o seu crescimento em meio de cultura. As técnicas de biofumigação a 40°C e a temperatura de 40°C agindo por até 21 dias e combinadas com HWT, eliminaram o fungo no interior do tecido vegetal de videira sem comprometer o seu enraizamento. Posto isto, havendo a constatação da eficiência das técnicas de biofumigação a 40°C e temperatura de 40°C combinadas com HWT na eliminação do fungo *P. chlamydospora* em estacas de videira por análise molecular, essas novas ferramentas serão divulgadas e devem ser utilizadas em estacas de videiras infectadas, para posterior disponibilização desses materiais de videira sadios para produtores de muda.

PALAVRAS-CHAVE: *Phaeomoniella chlamydospora*. Tratamento com água quente. Videira. Biofumigação.

ABSTRACT

BRAMBATTI, Fabiana. **Disinfection techniques combined or not with hot water treatment on *Phaeomoniella chlamydospora* and on pathogen-infected grapevine cuttings.** Dissertation (master's in plant and Animal Health, Food and Environmental Safety in the Agribusiness) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 2019.

In Brazil, the state of Rio Grande do Sul is featured as grape production in the country. One of the main diseases of the vine crop is Petri disease. This disease is caused by a combination of various fungi, most notably *Phaeomoniella chlamydospora*. The planting of contaminated vine cuttings stands out as one of the main sources of disease inoculum. The standard disinfection treatment of grapevine propagation material is HWT (heat water treatment, 50°C for 30 minutes), but its effectiveness is still disputed worldwide. The objectives of the present study were: 1) To verify the direct effect of different temperatures in hot water Treatment (HWT) conditions on *P. chlamydospora* and the evidence on its growth in culture medium; 2) Verify the effect of different disinfection treatments: [biofumigation = soil + cabbage at 40°C; temperatures of 40°C and 23°C, all in microcosm], at different periods (7; 14 and 21 days), with and without additional treatment with hot water (HWT - 51°C for 30 minutes), on *P. chlamydospora* and the evidence on its growth in culture medium; 3) Verify the effect of different disinfection treatments [biofumigation = soil + cabbage at 40°C; temperatures of 40°C and 23°C, all in microcosm] with different periods of use of these treatments (7, 14 and 21 days), with and without additional hot water treatment (HWT - 51°C for 30 minutes) on grapevine cuttings IAC 766 infected with *P. chlamydospora* and the evidence in the elimination of the fungus in the plant without affecting it physiologically, mainly regarding the formation of roots. The achieved results showed that high temperatures (55-70°C) applied directly on the fungus made it impossible to grow in culture medium. Biofumigation techniques at 40°C and at 40°C, acting for up to 14 days and combined or not with HWT, when applied directly to the fungus, prevented its growth in culture medium. Biofumigation techniques at 40 ° C and 40 ° C for up to 21 days combined with HWT eliminated the fungus within the vine plant tissue without compromising its rooting.

That said, as the efficiency of biofumigation techniques at 40 ° C and 40 ° C combined with HWT has been found to eliminate *P. chlamydospora* fungus in vine cuttings by molecular analysis, these new tools will be disseminated and should be used in infected vine cuttings. for later making these healthy vine materials available to nursering producers.

KEYWORDS: Grapevines. Petri disease. *Phaeoconiella chlamydospora*. Biofumigation.

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 9 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 11 |
| 2.1 | Objetivo geral..... | 11 |
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 11 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 12 |
| 3.1 | Viticultura..... | 12 |
| 3.2 | Doença de Petri em Videira..... | 14 |
| 3.2.1 | Sintomatologia da doença de Petri em videira..... | 15 |
| 3.2.2 | Meios de disseminação da doença de Petri em videira..... | 17 |
| 3.2.3 | Medidas de controle da doença de Petri..... | 18 |
| 3.3 | Produção de Mudanças de videira – Tratamento com água quente (HWT, heat water treatment)..... | 19 |
| 3.3.1 | Produção de Mudanças de videira - Solarização e Biofumigação..... | 21 |
| 4 | Material e Métodos..... | 23 |
| 4.1 | Primeiro ensaio – Tratamento com água quente em banho maria regulado para diferentes temperaturas, por 30 minutos, diretamente sobre o fungo <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> | 23 |
| 4.2 | Segundo Ensaio – Técnicas de desinfecção de mudas de videira testadas diretamente sobre o fungo <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> | 24 |
| 4.3 | Terceiro Ensaio – Desinfecção de estacas do porta-enxerto IAC 766 de videira, inoculadas artificialmente com o fungo <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> | 26 |
| 4.4 | Quarto Ensaio – Efeito fisiológico em estacas do porta-enxerto IAC 766 de videira tratadas com técnicas de desinfecção..... | 30 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 33 |
| 5.1 | Primeiro ensaio – Tratamento com água quente em banho maria regulado para diferentes temperaturas, por 30 minutos, diretamente sobre o fungo <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> | 33 |
| 5.2 | Segundo Ensaio – Técnicas de desinfecção de mudas de videira testadas diretamente sobre o fungo <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> | 34 |
| 5.3 | Terceiro Ensaio – Desinfecção de estacas do porta-enxerto IAC 766 de videira, inoculadas artificialmente com o fungo <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> | 37 |
| 5.4 | Quarto Ensaio – Efeito fisiológico em estacas do porta-enxerto IAC 766 de videira tratadas com técnicas de desinfecção..... | 39 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 42 |

7 REFERÊNCIAS..... 43

1. INTRODUÇÃO

O Brasil encontra-se no 19º lugar no mundo, quanto à produção oriunda do cultivo de videiras. A produção nacional em 2018 foi de 1.592.230 toneladas de uva, com área plantada de 75.480 ha. O rendimento médio da cultura no mesmo ano foi de 21.592 Kg/ha (IBGE, 2019).

A maior parte da produção brasileira está concentrada no estado do Rio Grande do Sul, com uma produção de 822.689 toneladas em 2018, em uma área plantada de 47.383 ha. Outros estados produtores destacam-se também na produção de videiras como Pernambuco, com uma produção de 423.382 t e São Paulo com uma produção de 128.327 t (Tabelas 01 e 02) (IBGE, 2019).

TABELA 1 - Produção de uva no Brasil, em toneladas.

| Estado/Ano | 2015 | 2016 | 2017 | 2018 |
|--------------------|------------------|----------------|------------------|------------------|
| Rondônia | 197 | 201 | 187 | 187 |
| Piauí | 168 | 240 | 240 | 51 |
| Ceará | 940 | 760 | 708 | 422 |
| Paraíba | 2.196 | 2.636 | 2.620 | 2.600 |
| Pernambuco | 237.367 | 242.967 | 621.170 | 423.382 |
| Bahia | 77.408 | 77.322 | 56.504 | 75.378 |
| Minas Gerais | 12.615 | 11.224 | 13.685 | 15.763 |
| Espírito Santo | 2.327 | 2.509 | 3.468 | 3.090 |
| Rio de Janeiro | 101 | 258 | 302 | 170 |
| São Paulo | 142.631 | 140.613 | 133.261 | 128.327 |
| Paraná | 69.035 | 52.749 | 53.345 | 54.000 |
| Santa Catarina | 69.118 | 33.267 | 65.196 | 61.256 |
| Rio Grande do Sul | 876.215 | 413.735 | 956.887 | 822.689 |
| Mato Grosso do Sul | 105 | 97 | 78 | 72 |
| Mato Grosso | 981 | 1.351 | 1.002 | 1.297 |
| Goiás | 4.008 | 3.729 | 1.650 | 2.121 |
| Distrito Federal | 1.890 | 1.386 | 1.700 | 1.425 |
| Brasil | 1.497.302 | 985.074 | 1.912.034 | 1.592.230 |

Fonte: IBGE (2019)

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

| Estado/Ano | 2015 | 2016 | 2017 | 2018 |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Rondônia | 27 | 27 | 25 | 25 |
| Piauí | 7 | 10 | 10 | 8 |
| Ceará | 38 | 36 | 36 | 23 |
| Paraíba | 122 | 132 | 132 | 130 |
| Pernambuco | 6.814 | 6.974 | 8.437 | 8.976 |
| Bahia | 2.861 | 2.858 | 1.961 | 2.154 |
| Minas Gerais | 856 | 830 | 895 | 1.212 |
| Espírito Santo | 148 | 154 | 196 | 250 |
| Rio de Janeiro | 7 | 16 | 17 | 22 |
| São Paulo | 7.803 | 7.699 | 7.348 | 7.233 |
| Paraná | 4.465 | 4.212 | 3.664 | 3.600 |
| Santa Catarina | 4.846 | 4.737 | 4.426 | 4.257 |
| Rio Grande do Sul | 49.739 | 49.226 | 48.397 | 47.383 |
| Mato Grosso do Sul | 13 | 8 | 8 | 8 |
| Mato Grosso | 51 | 56 | 50 | 53 |
| Goiás | 150 | 146 | 71 | 89 |
| Distrito Federal | 79 | 63 | 68 | 57 |
| Brasil | 78.026 | 77.187 | 75.774 | 75.480 |

Fonte: IBGE (2019)

A cultura da videira é afetada por inúmeras doenças, principalmente aquelas causadas por fungos. Dentre estas, destaca-se a doença de Petri, relatada pela primeira vez no mundo 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 de solo, sendo os mais importantes o fungo *Phaeomoniella chlamydospora* e várias espécies de *Phaeoacremonium* (SCHECK et al., 1998).

As principais fontes de inóculo dos fitopatógenos da doença de Petri são materiais de propagação vegetativa infectados (mudas), o próprio processo de propagação para formação das mudas, solos infestados e o inóculo aéreo (MOSTERT et al., 2006; AROCA et al., 2010). As plantas-mãe de porta-enxertos e garfos encontram-se geralmente infectados por fungos (REGO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2004; PINTO et al., 2005; AROCA et al., 2010), originando estacas como fontes de inóculo, especialmente para os patógenos da doença de Petri.

O tratamento padrão de estacas de porta-enxertos dormentes e de explantes de videira consiste em submergi-las em água quente (HWT, *heat water treatment*), a 50°C, por 30 minutos. Publicações do início da última década parecem assegurar que tratamentos com HWT com essa duração seguramente inibem a maioria dos patógenos fúngicos e bacterianos das estacas, e não danificam as suas gemas ou brotos.

A combinação ideal de tempo e temperatura de tratamento com água quente, embora intensivamente estudada e debatida, ainda não é um consenso entre os pesquisadores que utilizam a tecnologia ao redor do mundo, visando a desinfetar estacas de videira. O protocolo de 50°C por 30 minutos de tratamento com HWT em estacas de videiras tem sido mencionado como padrão (WAITE & MAY, 2005). No entanto, pesquisas demonstram que esse binômio pode não ser efetivo para controlar todos os patógenos (HABIB et al., 2009; SERRA et al., 2009).

Há poucos estudos acerca do efeito do HWT diretamente sobre o fungo *P. chlamydospora* e sobre o desenvolvimento de estacas tratadas com a técnica. Assim, estudos são necessários com o HWT para tratar estacas de videiras infectadas, principalmente com os fungos fitopatogênicos da doença de Petri, e também, verificar o efeito do seu uso diretamente sobre os patógenos, bem como sobre o desenvolvimento de estacas tratadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Desinfetar estacas de videira infectadas artificialmente com o fungo *Phaeoconiella chlamydospora*, sem afetar o seu enraizamento após o plantio.

2.2 Específicos

Verificar o efeito de diferentes temperaturas, em banho-maria (HWT), sobre o fungo *P. chlamydospora* e o reflexo no seu crescimento em meio de cultura;

Testar as técnicas de desinfecção de estacas de videiras, como a biofumigação a 40°C e a temperatura de 40°C, associadas ou não ao tratamento adicional com HWT, sobre o fungo *P. chlamydospora* e o reflexo no seu crescimento em meio de cultura;

Testar as técnicas de desinfecção de estacas de porta-enxerto de videiras (biofumigação a 40°C e a temperatura de 40°C), associadas ou não com tratamento adicional com HWT, para eliminar o fungo *P. chlamydospora*, sem danificá-las fisiologicamente, para posterior uso em sistema de produção de mudas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. 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 europeia, sendo utilizada nas mais diversas variedades para produção de vinhos 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 os 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 têm 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 variáveis 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 (copa), apresentando 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).

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 vinho, suco de uva, espumante e até mesmo cosmético (xampu, condicionador e cremes para a pele) (ANSARAH, 2005).

Esse 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). O cultivo da vinha e a produção de vinhos também despertam grande potencial para as pessoas 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).

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’. A produção, basicamente da variedade ‘Niagara Rosada’, destina-se ao consumo *in natura*, mas também há a produção de vinhos artesanais, sucos e até aguardentes dos resíduos das bagas com o uso dessa variedade e de outras. A produção com a ‘Niagara Rosada’ está concentrada nas regiões leste e sudoeste do estado, abrangendo os municípios de Jundiaí, Vinhedo, Louveira, Indaiatuba, Sorocaba, Porto Feliz, São Miguel do Arcanjo e em Jales, na região norte do estado (BUENO et al., 2010; MELLO, 2013; IBGE, 2019).

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

3.2 Doença de Petri em Videira

A cultura da videira é afetada por inúmeras doenças, principalmente aquelas causadas por fungos. Dentre estas, destaca-se a doença de Petri, relatada pela primeira vez no mundo 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. Essa doença é causada por uma combinação de vários fungos de solo, sendo os mais importantes o fungo *Phaeoconiella chlamydospora* e várias espécies de *Phaeoacremonium* (SCHECK et al., 1998).

Há relatos de dezessete espécies de *Phaeoacremonium* encontradas em videira. Destas, *P. minimum* (*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, GRAMAJE et al., 2015).

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*. Ensaios em mudas envolvendo inoculação artificial com estes 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 ; WHITING et al., 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, também já foi detectada a doença de Petri também na variedade ‘Niagara’ (FERREIRA et al., 2018).

3.2.1 Sintomatologia da doença de Petri em videira

A doença de Petri ocorre principalmente 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. Além disto, há interrupção de crescimento e morte da planta. Chamamos esse quadro sintomatológico de 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 de estacas doentes, incluem cloroses internervais, necroses das extremidades e murchas, que podem resultar em desfolha prematura (SCHECK et al. 1998; CORREIA et al., 2012) (Figura 01).

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 02). 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 (Figura 02). 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 01: Sintomas da doença de Petri em videira. À esquerda – Detalhe dos sintomas nas plantas. À direita, detalhe em folhas. Fonte: SCHECK et al. (1998).



Figura 02: Detalhe dos sintomas da doença de Petri, em videira, no sistema vascular da região do colo do porta enxerto de videira IAC 766, onde se pode observar estrias escuras. Fonte: Arquivo pessoal

3.2.2 Meios de disseminação da doença de Petri em videira

Os fungos associados às doenças “de Petri” e “Esca” (*Phaeoacremonium* spp., *Phaeoconiella 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).

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 parcialmente 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* no interior dos tecidos da copa da planta. Por hipótese, esporos são carregados com o fluido do xilema, em plantas matrizes infectadas, as quais podem oferecer varas contaminadas. Por exemplo, num monitoramento de vinte meses, ramos infectados retirados próximos ao ápice da planta passaram de percentuais reduzidos, próximos de zero para 53% de infecção (WHITEMAN et al., 2007).

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.

As principais fontes de inóculo dos fitopatógenos da doença de Petri são materiais de propagação vegetativa infectados, como as mudas, o próprio processo de propagação para formação das mudas, solos infestados e o inóculo aéreo (MOSTERT et al., 2006; AROCA et al., 2010). As plantas-mãe de porta-enxertos e garfos encontram-se geralmente infectados (REGO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2004; PINTO et al., 2005; AROCA et al., 2010), originando estacas como fontes de inóculo, especialmente para os patógenos da doença de Petri. Além dessas fontes, estudos citados por Rego et al. (1998) mostraram que a forma mais favorável para a disseminação do patógeno consiste no intercâmbio de material propagativo infectado (mudas), a partir de plantas matrizes de enxerto e porta-enxerto (cavalo).

Portanto, o foco sobre as mudas deve ser prioritário, procurando desenvolver técnicas que possibilitem a desinfecção de estacas de porta-enxertos, principalmente com *P. chlamydospora*, e assim disponibilizar, para os produtores, plantas-mãe de porta-enxertos saudáveis para o sistema de produção de mudas.

3.2.3 Medidas de controle da doença de Petri

Até o presente momento não há medidas curativas eficientes 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 de Petri. 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).

Kotze et al. (2011) avaliaram bioprodutos comerciais à base de *Trichoderma* spp. e alguns isolados e, também, o fungicida benomyl, visando a proteção da videira contra patógenos de tronco, pela aplicação dos antagonistas e dos patógenos nos ferimentos de poda, em condições de laboratório e de campo.

Nos ensaios de campo, após sete dias da aplicação dos produtos e dos isolados antagonistas nos ferimentos de poda, inocularam suspensões de esporos dos fungos fitopatogênicos *Neofusicoccum australe*, *N. parvum*, *Diplodia seriata*, *Eutypa lata*, *Phomopsis viticola*, *P. chlamydospora* e *Lasiodiplodia theobromae*.

As avaliações foram realizadas oito meses após a inoculação, com a maioria dos agentes de biocontrole apresentando eficácia semelhante ou superior ao observado para o fungicida benomil. Observaram que o isolado de *T. atroviride* USPP-T1, em particular, foi bastante efetivo, reduzindo a incidência de *P. viticola*, *E. lata*, *P. chlamydospora*, *N. australe*, *N. parvum*, *D. seriata* e *L. theobromae* em 69;76; 77; 78; 80; 85 e 92%, respectivamente.

O trabalho de Kotze *et al.* (2011) foi o primeiro relato de proteção biológica de ramos com ferimentos de poda contra o grupo de fungos de tronco de videira.

Há outros métodos de controle da doença, mas que focam mais precisamente no sistema de produção de mudas, utilizando principalmente o tratamento de estacas com água quente.

3.3 Produção de Mudas de videira – Tratamento com água quente (HWT, heat water treatment)

O tratamento padrão de estacas de porta-enxertos dormentes e de explantes de videira consiste em submergi-las em água quente (HWT, *heat water treatment*) a 50°C durante 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 das estacas, e não danificam as suas gemas e brotos.

A combinação ideal de tempo e temperatura de tratamento com água quente, embora intensivamente estudada e debatida, ainda não é um consenso entre os pesquisadores que utilizam a tecnologia ao redor do mundo. O protocolo de 50°C por 30 minutos de tratamento térmico tem sido mencionado como um padrão (GRAMAJE; ARMENGOL, 2011). No entanto, pesquisas demonstraram que esta combinação pode não ser efetiva para controlar todos os patógenos (HABIB *et al.*, 2009; SERRA *et al.*, 2009).

De acordo com Serra *et al.* (2011), o tratamento de estacas com água quente a 50°C por 30 minutos é uma prática comum na atualidade, entre produtores de mudas mais tecnificados. Segundo Waite *et al.* (2013), diversos estudos têm sido realizados para avaliar

o efeito da aplicação de tratamento com água quente, de curta ou longa duração, em material propagativo de videiras sobre os patógenos associados às doenças de tronco.

A variação de temperatura e a diversidade genética dos fungos, associados às doenças de tronco da videira, sugerem que temperaturas acima de 50°C, em locais mais quentes, são mais eficazes contra as doenças do tronco, como em estudos realizados em Valência, na Espanha, por Gramaje et al. (2009) e Gramaje e Armengol (2011). O contrário também, que temperaturas inferiores a 50°C podem ser eficazes na redução de patógenos em regiões mais frias, como na Nova Zelândia (BLEACH et al., 2013).

Em um ensaio realizado por Whiting et al. (2001) utilizando diferentes temperatura e tempos com HWT, os isolados de *Phaeoacremonium* spp. e *P. chlamydospora* foram mantidos em meio de cultura BDA Difco com 0,1 µg/ml de tetraciclina (BDA-tet) a 22°C. Pedacos com 5 mm de diâmetro foram cortados da borda principal das colônias em BDA-Tet e colocado no centro de placas de Petri, contendo 1% de extrato de malte Difco e ágar (MEA). Os fungos *Phaeoacremonium* spp. e *P. chlamydospora* não foram inativados quando submetidos à temperatura de 37°C. No entanto, depois de 15 minutos a 51°C, a germinação conidial deles foi inibida.

O tratamento com água quente pode influenciar a viabilidade e a qualidade do material vegetativo tratado e esse efeito pode variar com fatores como a cultivar, as condições de crescimento (clima da região de cultivo), o desenvolvimento da planta matriz, o tipo de material utilizado pelo viveirista (estacas ou mudas enraizadas), as condições de armazenamento, a hidratação das estacas antes do plantio e as condições de crescimento após a formação do calo (CROCKER & WAITE, 2004; WAITE & MAY, 2005). É necessária a atenção com possíveis efeitos negativos sobre o desenvolvimento da brotação e o crescimento de porta-enxertos e mudas enxertadas como os observados na cv. Negroamaro sobre Paulsen 1103 e Ruggeri 140, tratadas a 50°C por 45 minutos na Itália (HABIB et al., 2009).

As injúrias causadas pelo tratamento com água quente são reportadas como menos comuns em regiões de clima quente, comparado a regiões frias. Isto se deve ao alto nível de termotolerância creditado a videiras cultivadas em regiões quentes, comparadas com aquelas cultivadas em regiões frias (CROCKER & WAITE, 2004). Isso foi atribuído à sintetização de 'proteínas de choque térmico' pelas plantas durante um clima quente, o que as fazem persistir em dormência e as protegem durante o tratamento com água quente (CROCKER & WAITE, 2004).

Em estudo realizado por Lerin (2017), a faixa limite de tolerância à temperatura que não causa nenhum efeito sobre a formação de raízes em videira foi de 45°C (mínimo) até 52°C (máximo). Essa faixa vai de encontro com estudos realizados em outros países utilizando o tratamento com água quente (HWT) sobre estacas de videiras infectadas com fungos. Por exemplo, Fourie & Hallen (2004) na África do Sul utilizaram temperaturas $\geq 50^\circ\text{C}$ em HWT; Waite & May (2005) na Austrália testaram as mesmas temperaturas de Fourie & Hallen (2004) e GRAMAJE et al. (2010) que testaram a faixa de temperatura de 50 a 53°C em HWT na Espanha.

As condições climáticas onde as videiras são cultivadas têm influência na combinação de tempo e temperatura para utilização do HWT. Em climas frios, podem ser utilizadas temperaturas mais baixas como 48°C por 30 minutos (GRAHAM, 2007), em climas moderados 50°C por 30 minutos (WAITE & MORTON, 2007) e 53°C por 30 minutos para climas quentes (GRAMAJE et al., 2009a). Na Itália, num experimento conduzido por três anos, o tratamento com água quente a 52°C por 45 minutos demonstrou redução nas perdas após o plantio a um nível aceitável (zero a 20%) comparado com a testemunha (MANNINI, 2007). Em ensaio realizado por Lenin (2017) para o isolado de *Pcl. chlamydospora* (CMM 4340), não houve inibição total em nenhuma das combinações de temperatura e tempo avaliadas, obtendo-se 50% de redução do crescimento micelial somente a partir de 60°C, por 30 minutos.

Dessa forma, parece que a questão do tratamento com água quente (HWT) em propágulos de plantas de videira há contradições e precisa de validação, visando a sua recomendação como uma estratégia integrada de manejo da doença, principalmente no sistema de produção de mudas. Estudos com HWT e outros sobre o fungo e suas estruturas também devem ser realizados para entender o porquê do controle ou não.

3.3.1 Produção de Mudas de videira - Solarização e Biofumigação

A solarização é um método desenvolvido por Katan et al (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 desta técnica de controle e que, ainda, diminui o tempo necessário para o processo, é a prévia incorporação de partes vegetais de culturas específicas ao solo, seguida de solarização (GAMLIEL; STAPLETON, 1993a; SOUZA; BUENO, 2003; SOUZA, 2004; 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, 1993a), 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, 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).

A solarização e a solarização com brássicas (biofumigação) podem ser simuladas em recipientes de vidro mantidos em condições de estufa BOD, chamados de microcosmos. Essa metodologia foi desenvolvida e testada por Bueno et al. (2004), Ambrósio et al. (2008) e Basseto et al. (2011), não existindo estudos com essas técnicas para o controle dos fitopatógenos da doença de Petri, em estacas de porta-enxerto de videira. Da mesma forma, não existem estudos para avaliar o efeito da combinação destas técnicas com tratamento com água quente (HWT) para verificar se há aumento na eficiência do controle da doença de Petri em estacas de videira e possíveis danos fisiológicos bem como sobre estruturas dos fitopatógenos.

4. Material e Métodos

Os ensaios dos itens 4.1; 4.2 e 4.3 foram realizados no laboratório de Controle Biológico de Pragas e no Laboratório de Fitopatologia, ambos localizados no Centro Avançado de Pesquisas em Proteção Plantas e Saúde Animal do Instituto Biológico (CAPSA), em Campinas, São Paulo. O ensaio em estufa agrícola do item 4.4 foi realizado no Núcleo de Produção de Mudas da Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado de São Paulo, em São Bento do Sapucaí/SP.

4.1 Primeiro ensaio – Tratamento com água quente em banho maria regulado para diferentes temperaturas, por 30 minutos, diretamente sobre o fungo *Phaeomoniella chlamydospora*

Um isolado do fungo *P. chlamydospora* (IBSP01) foi obtido da micoteca do Laboratório de Fitopatologia do CAPSA. Esse isolado é proveniente de material de videira “Niagara Rosada” enxertada no porta-enxerto Ripária do Traviú, de uma propriedade de Jundiaí – São Paulo – Brasil (23° 07.830’ S e 46° 56.853’ W). Seu inóculo foi feito em meio BDA incubado em BOD a 23°C, por 30 dias, sob fotoperíodo de 12 horas. Em seguida, fragmentos do fungo foram cortados em formatos retangulares de 1 cm de largura e 2 cm de comprimento e colocados no interior de tubos de ensaio esterilizados. Após prontos, os tubos (três repetições por temperatura) foram colocados na água do banho-maria digital, regulado para cada temperatura por 30 minutos (Figura

03). As temperaturas testadas foram: 50°C; 55°C; 60°C; 65°C e 70°C. A metodologia utilizada foi adaptada de Whinting (2001).



Figura 03: Banho-maria regulado para 50°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e em seguida tubos contendo fragmentos do fungo *Phaeoconiella chlamydospora* imersos na água quente por 30 minutos. **Fonte:** Arquivo pessoal.

Após os tratamentos em água quente com diferentes temperaturas, os fragmentos de BDA contendo o fungo foram cortados em fluxo laminar em pedaços menores (5 mm) e plaqueados cada um deles no centro da superfície de placas de Petri contendo o meio de BDA. Foram feitas cinco placas para cada tubo de ensaio de cada temperatura. Placas de BDA contendo pedaços menores (5 mm) do inóculo do fungo, sem passar por tratamento de temperatura, foram preparadas como controle. Todas as placas foram incubadas em BOD regulada para 23°C, com fotoperíodo de 12 horas, por 30 dias. A avaliação consistiu em medir o diâmetro da colônia do fungo *P. chlamydospora* com o auxílio de régua milimétrica. Para tanto, duas medidas perpendiculares foram feitas e a média foi utilizada para informar a diâmetro da colônia. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com seis tratamentos e três repetições.

Os dados de crescimento (cm) do fungo nos tratamentos foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$ e em seguida aplicou-se o teste de Tukey com 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o Sisvar 5.4 da DEX/Universidade Federal de Lavras – UFLA.

4.2 Segundo Ensaio – Técnicas de desinfecção de mudas de videira testadas diretamente sobre o fungo *Phaeoconiella chlamydospora*

Utilizou-se o mesmo isolado, *P. chlamydospora* (IBSP01), bem como a produção do inóculo foi a mesma do ensaio 4.1. Após a produção, foram cortados em fragmentos retangulares de 1 cm de largura e 2 cm de comprimento e colocados no interior de tubos de ensaio esterilizados. Foram feitos seis tubos por tratamento. O delineamento experimental adotado neste ensaio foi o inteiramente ao acaso, com três tratamentos sendo empregados em microcosmos (Basseto et al., 2011): Tratamento 1 = um dos frascos do microcosmo contendo solo + couve e o outro frasco contendo os seis tubos de ensaio com o fungo, sendo tudo mantido em estufa tipo BOD a 40°C (biofumigação); Tratamento 2 = um dos frascos do microcosmo com água destilada e o outro frasco contendo os seis tubos de ensaio com o fungo, sendo tudo mantido em estufa tipo BOD a 40°C; e Tratamento 3 = um dos frascos do microcosmo com água destilada e o outro contendo os seis tubos de ensaio com o fungo, sendo tudo mantido em estufa tipo BOD a 23°C. Os microcosmos são interligados por mangueira de plástico que possibilita a passagem do ar de um frasco para o outro. Os tratamentos foram incubados em BOD por períodos de 7; 14 e 21 dias. O ensaio e o delineamento foram idênticos ao do item 4.3 (Figura 04).



Figura 04: Detalhe de um vidro do microcosmo contendo tubos de ensaio com fragmentos de BDA contendo o fungo *Phaeomonilla chlamydospora* e tudo incubado em BOD a 40 ou 23°C \pm 2°C. **Fonte:** Arquivo pessoal.

Após finalizar os tratamentos em cada período pré-estipulado de 7; 14 e 21 dias, os seis tubos de ensaio contendo o fungo foram removidos de cada microcosmo e metade deles, de cada tratamento, foram submetidos a tratamento adicional com água quente em banho-maria, regulado para 50°C por 30 minutos (HWT). Em seguida, os fragmentos de BDA com *P. chlamydospora* dos tubos de ensaio de cada tratamento tratados ou não com HWT de cada tempo, foram plaqueados em placas de Petri contendo o meio de BDA. De cada tubo foram feitas cinco placas de BDA contendo um fragmento do fungo de 5 mm.

As placas foram incubadas em BOD regulada para 23°C, com fotoperíodo de 12 horas, por 30 dias. A avaliação do ensaio consistiu em medir o diâmetro da colônia do fungo *P. chlamydospora* com auxílio de régua milimetrada. Para tanto, duas medidas perpendiculares foram feitas e a média foi utilizada para informar a diâmetro da colônia. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com seis tratamentos e cinco repetições.

Os dados de crescimento do fungo nos tratamentos foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$ e em seguida aplicou-se o teste de Tukey com 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o Sisvar 5.4 da DEX/Universidade Federal de Lavras – UFLA.

4.3 Terceiro Ensaio – Desinfecção de estacas do porta-enxerto IAC 766 de videira, inoculadas artificialmente com o fungo *Phaeomoniella chlamydospora*

Mudas do porta – enxerto IAC 766 de videira foram produzidas no Núcleo de Produção de Mudas da Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado de São Paulo, em São Bento do Sapucaí-SP. Quando prontas, as mesmas foram levadas para o Laboratório de Fitopatologia, do Centro Avançado de Pesquisas em Proteção Plantas e Saúde Animal, do Instituto Biológico (CAPSA), em Campinas-SP.

O isolado e o inóculo do fungo seguiu o mesmo protocolo do item 4.1.

As mudas dos porta-enxertos IAC 766 de videira foram inoculadas com o isolado do fungo. O método de inoculação de *P. chlamydospora* adotado foi o mesmo descrito por Pinto (2010), Díaz et al. (2009) e Eskalen et al. (2001), que consiste em ferir a base do porta-enxerto das plantas com um furador metálico de rolhas, 4 cm acima do solo, e em seguida depositar um disco de meio de BDA colonizado com o fungo sobre o ferimento circular feito com o furador, selando-se tudo com gaze estéril embebida em água destilada autoclavada mais parafilme (Figuras 05 e 06). Após isso, as mudas permaneceram em condições de casa-de-vegetação, por quatro meses, visando o desenvolvimento do fungo no seu sistema vascular.



Figura 05. Inoculação do fungo *Phaeoconiella. chlamydospora* em videira: à esquerda - furador metálico fazendo ferimento no colo da muda; centro – detalhe da marcação feita na região do colo da planta com o furador; à direita – detalhe do ferimento expondo o sistema vascular da planta na região do colo. Fonte: Arquivo pessoal

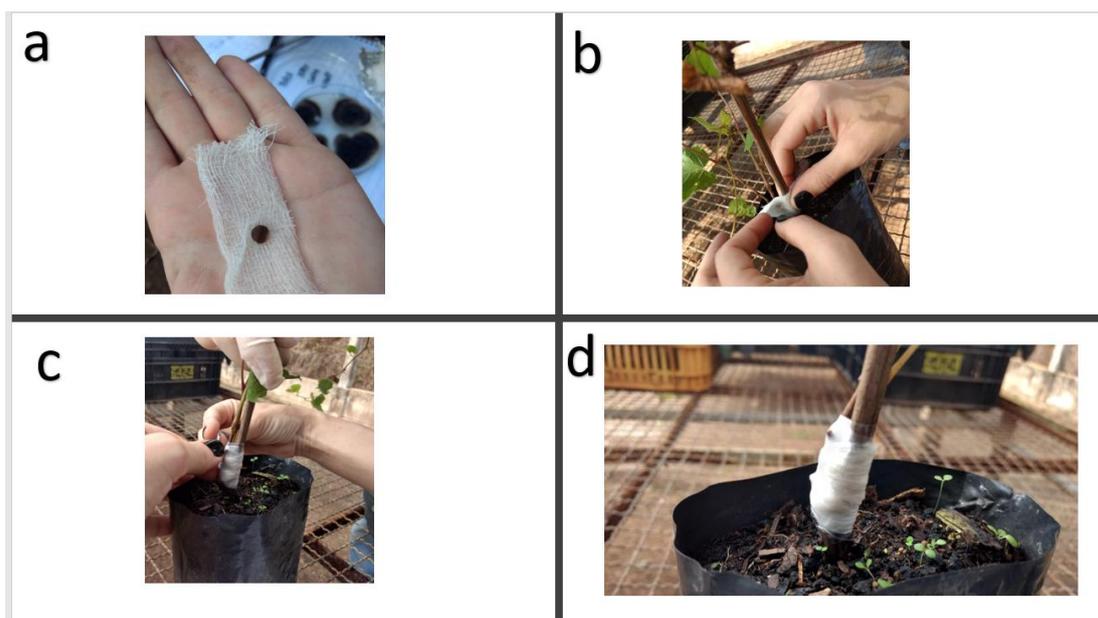


Figura 06. Metodologia de inoculação do fungo em videira: (a) disco de BDA contendo o fungo *Phaeoconiella chlamydospora* sob a gaze; (b) gaze estéril embebida em água destilada autoclavada sendo envolta no colo ferido com o disco de BDA contendo o fungo; (c) envolvimento da gaze com parafilme; (d) detalhe final do sistema de inoculação. **Fonte:** Arquivo pessoal

Após os quatro meses, as mudas foram removidas do solo dos saquinhos, lavadas em água corrente e podadas na altura da região de enxertia, amarradas em conjunto de 18

mudas e, em seguida, colocadas em um dos frascos de vidro do microcosmo (Basseto et al., 2011) (Figura 7).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente ao acaso, com três tratamentos sendo empregados em microcosmos (Basseto et al., 2011): Tratamento 1 = um dos frascos do microcosmo contendo solo + couve e o outro frasco contendo as 18 estacas do porta-enxerto infectadas com o fungo *P. chlamydospora*, sendo tudo mantido em estufa tipo BOD a 40°C (biofumigação); Tratamento 2 = um dos frascos do microcosmo com água destilada e o outro frasco com as 18 estacas do porta-enxerto infectadas com o fungo, sendo tudo mantido em estufa tipo BOD a 40°C; e Tratamento 3 = um dos frascos do microcosmo com água destilada e o outro contendo 18 estacas do porta enxerto infectadas com o fungo, sendo tudo mantido em estufa tipo BOD a 23°C.

As estufas tipo BOD foram reguladas às temperaturas de 40±2°C e 23±2°C e com fotoperíodo de 12 horas. As estacas foram tratadas nestes tratamentos por três períodos de tempo com 7; 14 e 21 dias.

O solo utilizado nos microcosmos foi obtido em uma localidade próxima ao Departamento de Melhoramento Genético de Café, na fazenda Santa Eliza, do Instituto Agrônômico em Campinas – SP, coordenadas geodésicas 22° 52'16.64" S ; 47° 05'04.70"O. O solo retirado foi devidamente analisado, conforme dados da tabela 3. Esse solo foi previamente umedecido com água destilada esterilizada, na proporção de 20%.

Tabela 3. Composição mineral [macro e micronutrientes, pH e matéria orgânica (MO)] do solo utilizado (Fazenda Santa Eliza – IAC – coordenadas 22°52'16.64" S; 47°05'04.70" O).

| pH | O. M. | P _{resin} | Al ³⁺ | H+Al | K | Ca | Mg | SB | CTC | V% | S | B | Cu | Fe | Mn | Zn |
|-------------------|-------------------|--------------------|----------------------|------|-----|----|----|----|-----|--------------------|---|------|-----|----|-----|-----|
| CaCl ₂ | g/dm ³ | mg/dm ³ | mmol/dm ³ | | | | | | | mg/dm ³ | | | | | | |
| 5,1 | 14 | 17 | - | 16 | 1,6 | 21 | 4 | 27 | 43 | 62 | - | 0,10 | 3,1 | 7 | 7,6 | 0,4 |

O solo do local amostrado é classificado como Latossolo Vermelho Distroférico típico, textura argilosa (OLIVEIRA et al., s/ ano).

A couve (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.) utilizada nos microcosmos foi obtida na Central de Abastecimento de Campinas S.A (CEASA) e sua análise quanto a macro e micro nutrientes encontra-se na tabela 4. Essa couve foi primeiramente triturada

com faca e depois adicionados 75 gramas do material triturado no solo, na proporção de três quilos de solo (dois litros e meio) (Basseto et al., 2011).

Tabela 4. Composição mineral (macro e micronutrientes) da couve utilizada no ensaio.

| N | P | K | Ca | Mg | S | C | Fe | Mn | Cu | Zn | B | Al | Humidity |
|-----------------------|-----|------|------|-----|------|---|------------------------|-------|-----|------|------|----|----------|
| Macronutrients (g/Kg) | | | | | | | Micronutrients (mg/Kg) | | | | | | % |
| 44,4 | 3,6 | 53,7 | 34,4 | 4,6 | 17,7 | - | 330 | 227,7 | 0,6 | 22,3 | 37,7 | - | - |

Após cada período dos tratamentos nas estufas tipo BOD, as 18 estacas do porta-enxerto foram removidas de cada microcosmo, sendo que nove delas, de cada tratamento, foram submetidas a tratamento adicional com água quente em banho-maria regulado para 50°C por 30 minutos (HWT) (GRAMAJE et al., 2009).

O parâmetro avaliado em todos os tratamentos e em cada período, incluindo os tratamentos com acréscimo de HWT, foi a incidência do fungo *P. chlamydospora* no sistema vascular da base das estacas. Para tanto, fragmentos desta região foram retirados e desinfestados superficialmente por imersão, por 30 segundos, em uma solução de álcool a 70%; um minuto em uma solução de hipoclorito de sódio a 1,5% e lavagem em água destilada autoclavada. Após, os fragmentos foram secos em papel de filtro esterilizado, sendo em seguida cortados em pedaços menores de 5 mm e plaqueados na superfície do meio de BDA. Cinco placas por estaca de cada tratamento, com cada placa contendo quatro fragmentos plaqueados.

As placas foram incubadas em BOD regulada para 23°C, com fotoperíodo de 12 horas, por 21 dias. A avaliação das placas consistiu na contagem do percentual de fragmentos exibindo colônia do fungo *P. chlamydospora*.

Além do isolamento do fungo do interior do tecido vegetal em meio de cultura, o mesmo foi detectado diretamente no tecido vegetal, extraindo-se o DNA total (fungo+vegetal) e realizando PCR quantitativo, com primer específico do fungo do gene do fator de alongação.

Para a identificação molecular de isolados de fungos obtidos, extraiu-se o seu DNA, seguindo-se o método CTAB, descrito por 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 (GGARGTACCAGTSATCATGTT) (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). Na reação da PCR foi adicionado o produto Propidium monoazide, com o intuito de verificar se o fungo está vivo ou morto no tecido tratado com diferentes tratamentos (CRESPO-SEMPERE et al., 2013).

Os dados do percentual de incidência do fungo nos fragmentos dos diferentes tratamentos foram analisados pelo teste de associação de Goodman, para contrastes entre proporções binomiais (GOODMAN, 1964) considerando-se nível de 5% de significância.

4.4 Quarto Ensaio – Efeito fisiológico em estacas do porta-enxerto IAC 766 de videira tratadas com técnicas de desinfecção

Estacas sadias do porta - enxerto IAC 766 de videira foram adquiridas no Núcleo de Produção de Mudanças, da Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado de São Paulo, em São Bento do Sapucaí/SP. As mesmas foram levadas para o Laboratório de Fitopatologia do CAPSA, em Campinas-SP.

O experimento foi montado de maneira idêntica ao do item 4.3, diferindo apenas no fato das estacas do porta - enxerto IAC766 de videira não terem sido inoculadas com o fungo *P. chlamydospora* (Figura 07).



Figura 07: Microcosmos contendo em um dos vidros água destilada e no outro estacas sadias de videira, sendo tudo incubado em BOD a 40°C ou 23°C ± 2°C. **Fonte:** Arquivo pessoal.

Após finalizar os tratamentos nas estacas em cada período pré-estipulado, as 20 estacas do porta-enxerto IAC 766 de videira colocadas em um dos vidros do microcosmo foram removidas e metade delas, de cada tratamento, foram submetidas ao tratamento adicional com água quente, em banho-maria regulado para 50°C ± 1°C, por 30 minutos (HWT) (GRAMAJE et al., 2009 (Figura 08)).



Figura 08: Estacas do porta - enxerto IAC 766 de videira recebendo tratamento adicional com água quente (HWT), em banho-maria regulado para 50°C, por 30 minutos. **Fonte:** Arquivo pessoal.

Após os tratamentos adicionais ou não com água quente, todas as estacas seguiram para o Núcleo de Produção de Mudanças da Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado de São Paulo, em São Bento do Sapucaí-SP, onde foram plantadas em caixa de areia dentro de estufa agrícola, de acordo com o protocolo padrão de enraizamento de mudas do referido núcleo. As estacas tratadas foram introduzidas até 1/3 do seu tamanho na areia, deixando 2/3 para fora. As estacas foram plantadas no espaçamento de 5 cm entre plantas e 7 cm entre linha. Além disso, a distância entre os tratamentos foi de 8 cm (Figura 09).



Figura 09: Estacas do porta-enxerto IAC 766 de videira tratadas e plantadas em caixa de areia dentro de estufa agrícola do Núcleo de Produção de Mudanças da Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado de São Paulo, em São Bento do Sapucaí/SP. **Fonte:** Arquivo pessoal.

Ao completar 30 dias de plantio na caixa de areia, as estacas foram retiradas e analisadas quanto a formação ou não de raízes.

Os dados do percentual de mudas com formação de raízes, nos diferentes tratamentos, foram analisados pelo teste de associação de Goodman, para contrastes entre proporções binomiais (GOODMAN, 1964), considerando-se nível de 5% de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Primeiro ensaio – Tratamento com água quente em banho maria, regulado para diferentes temperaturas, por 30 minutos diretamente sobre o fungo *Phaeomoniella chlamydospora*

De acordo com os dados da Tabela 5, as temperaturas de 55°C; 60°C; 65°C e 70°C, com variação de $\pm 2^\circ\text{C}$, aplicadas em banho maria durante 30 minutos cada, agiram diretamente nas estruturas do fungo e inviabilizaram totalmente o crescimento micelial, no meio de cultura BDA. Porém, a temperatura de 50°C por 30 minutos não inviabilizou o crescimento do fungo. Esse crescimento foi menor em relação ao controle (Figura 10).

Tabela 5. Efeito direto de diferentes temperaturas, em banho-maria, no fungo *Phaeomoniella chlamydospora* e o reflexo no crescimento em meio de cultura BDA.

| Temperaturas ($^\circ\text{C}$) / Crescimento micelial (cm) | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|----------|
| 50 | 55 | 60 | 65 | 70 | Controle |
| 1,0 ¹ B | 0,0 A | 0,0 A | 0,0 A | 0,0 A | 3,7 C |

¹Média de 3 tubos com 4 placas (repetições) contendo um disco de micélio de *P. chlamydospora*, totalizando 12 placas (repetições) por tratamento (temperaturas e controle). Letras maiúsculas iguais não diferem entre si, segundo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

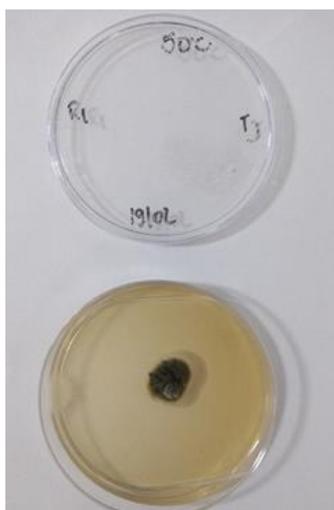


Figura 10: Crescimento da colônia de *Phaeomoniella chlamydospora*, com 30 dias de incubação em BOD a 23°C, com fotoperíodo de 12 horas, após ter sido tratado com água quente a 50°C, durante 30 minutos, em banho maria. **Fonte:** arquivo pessoal

Diante dos resultados da Tabela 5, propõe-se as seguintes inferências:

- 1) O tratamento HWT (51°C por 30 minutos) sozinho não deve inviabilizar o desenvolvimento do fungo *P. chlamydospora* no tecido vegetal de videira.

Segundo relatos de Habib et al. (2009) e Serra et al. (2009), o HWT (50°C por 30 min.) pode não ser efetivo para controlar todos os patógenos de videira.

- 2) Somente temperaturas mais altas podem inibir o fungo, mas essas temperaturas podem danificar fisiologicamente as estacas de videiras, refletindo em não enraizamento ou crescimento inadequado.

Segundo Gramaje et al. (2009a), temperaturas maiores que 50°C em HWT, em locais mais quentes, são mais eficazes contra doenças do tronco em videiras.

Um fato curioso observado (dados preliminares e não exibidos) é que estruturas mais velhas do fungo (centro da colônia) são mais suscetíveis ao efeito de altas temperaturas, enquanto estruturas mais novas (borda da colônia) são mais resistentes. No entanto, estudos mais rigorosos serão necessários para assegurar tal observação.

5.2 Segundo ensaio – Técnicas de desinfecção de mudas de videira testadas diretamente sobre o fungo *Phaeomoniella chlamydospora*

De acordo com os dados da Tabela 6, os tratamentos biofumigação a 40°C e a temperatura de 40°C aplicados por 7 e 14 dias inibiram o crescimento do fungo *P. chlamydospora* no meio de cultura BDA. A interação destes tratamentos com HWT também exibiram total inibição do crescimento do fungo. Os tratamentos 23°C por 7 e 14 dias sem HWT não inibiram o crescimento do fungo, mas esse crescimento diminuiu com 14 dias de tratamento. Os tratamentos 23°C aplicados por 7 e 14 dias com HWT também não inibiram o fungo e não apresentaram diferenças entre si. Já os tratamentos 23°C por 7 dias com e sem HWT apresentaram diferenças entre si quanto ao crescimento do fungo.

Os tratamentos de desinfecção aplicados por 21 dias e associados ou não com HWT causaram 100% de ressecamento do meio de cultura contendo as estruturas do fungo. Os dados destes tratamentos foram descartados.

Tabela 6. Efeitos de diferentes tratamentos de desinfecção, em diferentes períodos, com e sem tratamento adicional com água quente (HWT) no fungo *Phaeoconiella chlamydospora* e o reflexo no crescimento em meio de cultura BDA.

| Tratamentos | HWT | Períodos (dias) | |
|-----------------------------|--------------|----------------------|---------|
| | | 7 | 14 |
| | 51°C/30 min. | | |
| Solo + Couve a 40°C | Sem | 0,0 ¹ a A | 0,0 a A |
| “Biofumigação” | Com | 0,0 a A | 0,0 a A |
| Sem solo e sem couve a 40°C | Sem | 0,3 a A | 0,0 a A |
| | Com | 0,0 a A | 0,0 a A |
| Sem solo e sem couve a 23°C | Sem | 3,2 c B | 2,9 b A |
| | Com | 1,5 b A | 2,6 b A |

¹Média de três tubos com o fungo, com cinco placas (repetições) contendo um disco do fungo de cada tubo, totalizando 15 placas (repetições) por tratamento; Letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si, segundo teste de Tukey com 5% de probabilidade; Letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si, segundo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

Diante dos resultados da Tabela 6, propõe-se as seguintes inferências:

- 1) A combinação dos tratamentos temperatura de 40°C e biofumigação a 40°C com HWT pode agir melhor nas estruturas de *P. chlamydospora* dentro do tecido vegetal da videira.

De acordo com alguns pesquisadores, a solarização 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 vêm sendo utilizadas e que melhora a solarização e que, ainda, diminui o tempo de tratamento da solarização, é a prévia incorporação de partes vegetais de culturas específicas ao solo, seguida de solarização (biofumigação) (GAMLIEL; STAPLETON, 1993a; SOUZA, 2004; SOUZA; BUENO, 2003; AMBRÓSIO, 2006; AMBRÓSIO et al.; 2008).

Segundo Ambrósio et al. (2008), a produção de compostos voláteis fungitóxicos é capaz de ajudar na inviabilização das estruturas de resistência de fitopatógenos habitante de solo.

Ao estudar o desempenho da técnica da biofumigação a 37°C em microcosmo com diferentes materiais vegetais e incubação em diferentes períodos de tempo (7, 14 e 21 dias) sobre o micélio de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI e de *Sclerotium rolfsii*, Basseto et al. (2011) constataram efeito fungistático e fungicida sobre o micélio de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, de *R. solani* AG-4 HGI e de *S. rolfsii*. Para *M. phaseolina*, os tratamentos foram inócuos. O efeito fungicida ocorreu aos 21 dias de tratamento para *F. oxysporum* e *R. solani* e aos 28 dias para *S. rolfsii*. No presente estudo, a biofumigação a 40°C com e sem HWT causou efeito fungicida sobre o fungo *P. chlamydospora*, tanto com 7, quanto com 14 dias de tratamento (Tabela 6).

- 2) O tratamento HWT sozinho pode não controlar o fungo no interior do tecido vegetal (temperatura de 50°C – Tabela 5 e tratamento sem solo e sem couve a 23°C por 7 e 14 dias, seguido de tratamento adicional com HWT – Tabela 6).

Fourier e Hallen (2004) comentam também que o HWT não elimina e sim reduz a incidência dos fitopatógenos da doença de Petri em estacas de videira. Essa constatação é corroborada com os resultados obtidos no presente estudo com HWT a 51°C por 30 minutos sobre as estruturas de *P. chlamydospora* (Tabelas 5 e 6).

Reforçando novamente sobre os relatos de Habib et al. (2009) e de Serra et al. (2009) a cerca de que o HWT (50°C por 30 min.) pode não ser efetivo para controlar todos os patógenos de videira.

5.3 Terceiro Ensaio – Desinfecção de estacas do porta -enxerto IAC 766 de videira, inoculadas artificialmente com o fungo *Phaeomoniella chlamydospora*

De acordo com os dados da Tabela 7, somente o tratamento com a temperatura de 23°C aplicado por 7; 14 e 21 dias sem HWT diferiu dos demais tratamentos quanto ao percentual de crescimento do fungo *P. chlamydospora*, a partir de fragmentos de plantas plaqueados no meio de cultura BDA.

Os tratamentos 23°C aplicados por 7; 14 e 21 dias seguidos ou não de HWT diferiram entre si, ou seja, o tratamento adicional com HWT implicou em redução significativa do fungo no tecido vegetal em comparação com a ausência de HWT. Outra constatação foram as diferenças no percentual de incidência do fungo no tecido vegetal de videira entre os períodos testados no tratamento com a temperatura de 23°C por 7; 14 e 21 dias sem HWT.

Tabela 7. Porcentagem de incidência de *Phaeomoniella chlamydospora* em fragmentos retirados do sistema vascular, da parte basal do porta-enxerto IAC 766 de videira, submetido a diferentes tratamentos de desinfecção, por diferentes períodos, com tratamento adicional ou não com água quente (HWT).

| Tratamentos | HWT | Períodos dos tratamentos (dias) | Incidência (%) |
|---------------------------------------|--------------|---------------------------------|------------------------|
| Solo + Couve a 40°C “Biofumigação” | 51°C/30 min. | 7 | 0,0 ¹ a A α |
| | | 14 | 2,5 a A α |
| | | 21 | 0,0 a A α |
| Sem solo e sem couve a 40°C | Sem | 7 | 1,3 a A α |
| | | 14 | 2,5 a B α |
| | | 21 | 3,8 a A α |
| | | 7 | 16,3 b B α |

| | | |
|---------------------------------------|----|-------------------|
| Sem solo e sem couve a 23°C | 14 | 47,5 b B γ |
| | 21 | 32,5 b B β |
| <hr/> | | |
| Solo + Couve a 40°C “Biofumigação” | 7 | 0,0 a A α |
| | 14 | 0,0 a A α |
| | 21 | 0,0 a A α |
| <hr/> | | |
| Sem solo e sem couve a 40°C | 7 | 0,0 a A α |
| | 14 | 0,0 a A α |
| | 21 | 0,0 a A α |
| <hr/> | | |
| Sem solo e sem couve a 23°C | 7 | 2,5 a A α |
| | 14 | 0,0 a A α |
| | 21 | 0,0 a A α |

Com

Letras minúsculas: comparação de tratamento fixados períodos e HWT; Letras maiúsculas: comparação de HWT fixados tratamentos e períodos; Letras gregas: comparação de períodos fixados tratamentos e HWT. As comparações foram feitas com base no Teste de associação de Goodman, para contrastes entre proporções binomiais (Goodman, 1964) com 5% de significância.

¹Média de 4 plantas com 5 placas (repetições) contendo 4 fragmentos de cada planta, totalizando 80 fragmentos analisados por tratamento.

Apesar de não haver diferenças entre os tratamentos 40°C e biofumigação a 40°C aplicados por 7; 14 e 21 dias com e sem HWT (Figura 11) e 23°C aplicado por 7; 14 e 21 dias com HWT, os únicos tratamentos que apresentaram 100% de redução de incidência do fungo *P. chlamydospora* nos fragmentos foram a temperatura de 40°C e a biofumigação a 40°C aplicados por 7; 14 e 21 dias seguidos de tratamento adicional com HWT (Tabela 7). Ferreira et al. (2018) também constataram 100% de redução de incidência do fungo *P. chlamydospora* em fragmentos do porta-enxerto IAC 766 de videira tratados com biofumigação a 37°C e a temperatura de 37°C, aplicados por 7; 14 e 21 dias seguidos de HWT.



Figura 11: À esquerda, estacas de videira do porta enxerto IAC 766 inoculadas com *Phaeoconiella. chlamydospora* em microcosmo contendo solo + couve (biofumigação) incubado em BOD a 40°C por 21 dias. À direita, detalhe da área de inoculação do fungo e as estrias escuras ao longo do tecido vegetal. **Fonte:** arquivo pessoal

O tratamento temperatura de 23°C aplicado por 14 e 21 dias seguido de tratamento adicional com HWT (51°C por 30 min.) causou 100% de redução de incidência do fungo *P. chlamydospora* nos fragmentos do porta-enxerto IAC 766 plaqueados no meio de BDA (Tabela 7). Esse tratamento se assemelha ao tratamento HWT de Gramaje & Armengol (2012), diferindo apenas no fato das mudas ficarem por até 21 dias sem solo e depois serem submetidas ao HWT. Esse tratamento contraria as afirmações de Habib et al. (2009) e de Serra et al. (2009) de que o binômio tempo e temperatura pode não ser efetivo para controlar todos os patógenos de videira. Fica um estudo a ser testado no futuro, ou seja, colher estaca infectada de videira e armazená-la por um certo período sem solo e depois tratá-la com HWT, com o objetivo de eliminar o fungo

5.4 Quarto Ensaio – Efeito fisiológico em mudas de ‘Niágara Rosada’ enxertada no porta-enxerto IAC 766 quando tratadas com técnicas de desinfecção

De acordo com os dados da Tabela 8, não houve em nenhum tratamento diferenças entre o tratamento adicional ou não com HWT em relação ao percentual de enraizamento

das mudas tratadas. Diferenças entre tratamentos ocorreram somente no período de 14 dias. Houve diferença entre os períodos testados quanto ao enraizamento das mudas em alguns tratamentos, como solo + couve a 40°C (biofumigação) sem HWT e sem solo e sem couve a 40°C sem HWT.

Tabela 8. Porcentagem de mudas do porta-enxerto IAC 766 de videira, com raízes plenamente desenvolvidas, que foram tratadas com diferentes tratamentos de desinfecção, em diferentes períodos, com e sem tratamento adicional com água quente (HWT).

| Tratamentos | HWT 51°C/30 min. | Períodos (dias) | | |
|---------------------------------------|---------------------|-------------------------|-------------|--------------|
| | | 7 | 14 | 21 |
| Solo + Couve a 40°C “Biofumigação” | Sem | 90,0 ¹ a A β | 100,0 a B β | 40,0 a A α |
| | Com | 80,0 a A α | 60,0 a A α | 80,0 a A α |
| Sem solo e sem couve a 40°C | Sem | 90,0 a A β | 30,0 a A α | 60,0 a A α β |
| | Com | 90,0 a A α | 60,0 a A α | 70,0 a A α |
| Sem solo e sem couve a 23°C | Sem | 80,0 a A α | 60,0 a A α | 70,0 a A α |
| | Com | 100,0 a A α | 80,0 a AB α | 80,0 a A α |

¹Média de 10 mudas analisadas. Letras minúsculas: Sem HWT x Com HWT fixados tratamento e período; Letras maiúsculas: 23°C x 40°C x Biofumigação fixados HWT e período; Letras gregas: 7; 14 e 21 dias (períodos) fixados tratamentos e HWT. As comparações foram feitas de acordo com o teste de associação de Goodman, para contrastes entre proporções binomiais (Goodman, 1964) com 5% de significância.

O enraizamento do material diante dos tratamentos aplicados vai de encontro à afirmação de Crocker & Waite (2004), de que injúrias causadas por HWT são menos comuns em videiras cultivadas em regiões de clima quente. Esse motivo deve-se ao alto nível de termotolerância creditado às videiras cultivadas em regiões quentes, quando comparadas com aquelas cultivadas em regiões frias, segundo relatos de Crocker & Waite (2004). Especificando com mais detalhe, a sintetização de ‘proteínas de choque térmico’

pelas plantas durante um clima quente, as fazem entrar em dormência e as protegem durante o tratamento com água quente, de acordo com Crocker & Waite (2004).

Havendo calo radicular ou raízes, as estacas emitem brotos e folhas. No presente estudo não se buscou 100% de estacas com calo radicular ou 100% de estacas com formação de raízes. O objetivo do trabalho foi eliminar o fungo *P. chlamydospora* em estacas de videira infectadas e permitir que algumas delas desenvolvam normalmente com o intuito de ser uma futura estaca mãe, para gerar um novo matrizeiro que irá disponibilizar materiais sadios para a produção de mudas sadias.

Ferreira et al. (2018) verificaram que com 21 dias de tratamento, a biofumigação a 37°C mais HWT não permitiu o enraizamento de nenhuma estaca do porta-enxerto IAC 766 de videira, ao passo que o tratamento temperatura de 37°C mais HWT permitiu apenas 25% de enraizamento das estacas. No presente estudo (Tabela 8), os tratamentos biofumigação a 40°C e somente a temperatura de 40° aplicados por 7; 14 e 21 dias combinados ou não com HWT não apresentaram redução drástica no enraizamento das mudas do porta-enxerto IAC 766 enxertada com 'Niágara Rosada'. No estudo de Ferreira et al. (2018) ainda, as estacas tratadas foram podadas em ambas as extremidades com canivete de poda, antes do seu plantio na caixa de areia, ficando uma estaca com 2-3 gemas, enquanto que no presente estudo as mudas tratadas foram plantadas diretamente na caixa de areia, em estufa agrícola, sem sofrer qualquer tipo de estresse ou poda.

Verificando-se os parâmetros incidência do fungo *P. chlamydospora* versus formação de sistema radicular nas mudas nos tratamentos 40°C e biofumigação a 40°C, aplicados por 7; 14 e 21 dias, seguidos de tratamento adicional com HWT, observa-se que estes tratamentos eliminaram o fungo do tecido vegetal sem comprometer o enraizamento do material (Tabelas 7 e 8 e Figura 12) .

Observando-se ainda os dados das Tabelas 5; 6 e 7 quanto ao efeito dos tratamentos sobre o fungo *P. chlamydospora* fora ou dentro de tecido vegetal, constatou-se que a interação de tratamentos de desinfecção com HWT é vital para o controle do fungo, quer seja diretamente ou dentro do tecido vegetal.



Figura 12: Detalhe do sistema radicular formado em estacas do porta-enxerto IAC 766 tratadas com biofumigação a 40°C por 7 dias com tratamento adicional de HWT. Fonte: arquivo pessoal

6. CONCLUSÕES

- Temperaturas altas de 55°C a 70°C aplicadas diretamente no fungo *Phaeomoniella chlamydospora* inviabilizam o seu crescimento em meio de cultura;
- As técnicas de biofumigação a 40°C e temperatura de 40°C agindo por até 14 dias e combinadas ou não com HWT, quando aplicadas diretamente no fungo, inviabilizam o seu crescimento em meio de cultura;
- As técnicas de biofumigação a 40°C e a temperatura de 40°C agindo por até 21 dias e combinadas com HWT eliminam o fungo no interior do tecido vegetal de videira, sem comprometer o seu posterior enraizamento.

Havendo a constatação da eficiência das técnicas de biofumigação a 40°C e temperatura de 40°C combinadas com HWT na eliminação do fungo *P. chlamydospora* em estacas de videira por análise molecular, essas novas ferramentas serão divulgadas e devem ser utilizadas em estacas de videiras infectadas, para posterior disponibilização desses materiais de videira sadios para produtores de muda.

7. REFERÊNCIAS

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 Agronômicas. 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.

ANSARAH, M. G. dos R. Turismo e segmentação de mercado: novos segmentos. In: TRIGO, Luiz Gonzaga Godoi et al (Eds.). Análises regionais e globais do turismo brasileiro. São Paulo: Roca, 2005.

BLEACH, C.; JONES, E.; RIDGWAY, H.; JASPERS, M. Hot water treatment to reduce incidence of black foot pathogens in young grapevines grown in cool climates. **Phytopathologia Mediterranea**, v.52, n.2, p.347–358, 2013.

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.

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, C.J, AMBRÓSIO, M.M.Q, SOUZA, N.L, CERESINI, P.C (2004) Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotium rolfsii* em microcosmo simulando solarização com prévia incorporação de couve (*Brassicae oleracea* var. *acephala* L.). **Summa Phytopathologica** 30:356-363.

BUENO, S.C.S 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

CRESPO-SEMPERE, A. et al. VeA e LaeA transcriptional factors regulate ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 166, n. 3, p. 479-486, Sept. 2013

DÍAZ, GA; ESFERIO, M; AUGER, J; Effects of *Phaeoconiella chlamyospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine rootstocks. **Ciencia e Investigación Agraria** 36:381-390, 2009.

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

EDWARDS, J.; PASCOE, I. Occurrence of *Phaeoconiella chlamyospora* 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.

FERREIRA, Ana Beatriz Monteiro et al. Colonization of vines by Petri disease fungi, susceptibility of rootstocks to *Phaeomoniella chlamydospora* and their disinfection. **Arquivos do Instituto Biológico**, [s.l.], v. 85, p.1-10, 1 nov. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000882017>.

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.

GRAHAM A. Hot water treatment of grapevine rootstock cuttings grown in a cool climate. **Phytopathologia Mediterranea** v.46, p.124, 2007.

GAMLIEL, A.; STAPLETON, J. J. Characterization of antifungal volatile compounds involved from solarizes 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.

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

GRAMAJE, D., GARCÍA-JIMÉNEZ J, ARMENGOL, J. Grapevine rootstock susceptibility to fungi associated with Petri disease and esca under field conditions. **American Journal of Enology and Viticulture** 61:512-520, 2010.

GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J.; SALAZAR, D.; LÓPEZ-CORTÉS, I.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Effect of hot-water treatments above 50°C on grapevine viability and survival of Petri disease pathogens. **Crop Protection**, v.28, p. 280–285, 2009a.

GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J.; SALAZAR, D.; LÓPEZ-CORTÉS, I.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Effect of hot water treatment above 50°C on grapevine viability and survival of Petri disease pathogens. **Crop Protection**, v.28, p. 280-285, 2009.

GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification and management strategies. **Plant Disease** 95:1040–1055, 2011.

GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J. Effects of hot-water treatment, post-hot-water-treatment cooling and cold storage on the viability of dormant grafted grapevines under field conditions. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.18, p.158–163, 2012.

GRAMAJE D, MOSTERT, L.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W *Phaeoacremonium*: from esca disease to phaeohyphomycosis. **Fungal Biology** 119:759-783, 2015.

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, 88p., 2010.

HABIB, W.; PICHIERI, A.; MASIELO, N.; POLLASTRO, S.; FARETRA, F. Application of hot water treatment to control *Phaeomoniella chlamydospora* in grapevine plant propagation materials. **Phytopathologia Mediterranea**, v.48, p.186, 2009.

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.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2018. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 02 mai. 2019.

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

KOTZE, C.; VAN NIEKERK, J.; MOSTERT, L.; HALLEN, F.; FOURIE, P.; 2011. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. **Phytopathologia Mediterranea** 50, S247-S263.

LERIN, Sabrina. **Termoterapia no controle de fungos causadores de doenças de tronco em videira**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. . 2017, 114f

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. *Phaeomoniella 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 Seminário de Pesquisa em Turismo do Mercosul, Caxias do Sul, RS, Brasil, 2010.

MANNINI, F. Hot water treatment and field coverage of mother plant vineyards to prevent propagation material from phytoplasma infections. **Bulletin of Insectology**, v. 60, p. 311–312, 2007

MELLO, L.M.R. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2012. 2013.** Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot137.pdf>>. Acesso em: 23 nov. 2018.

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, HALLEN, F.; FOURIE, P, CROUS, P.W (2006) A review of *Phaeoacremonium* species involved in Petri disease and esca of Grapevines. **Phytopathologia Mediterranea** 45:12-29.

MUGNAI, L.; GRANITI, A.; SURICO, G. Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevine. **Plant Disease**, v. 83, p. 404-416, 1999.

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

PETRI, L.; Osservazioni sopra Le alterazioni del legno della vite in seguito a ferite. **Le Stazioni Sperimentali Agrarie Italiane** v.45:501-547, 1912.

PINTO, P.S.G. **Doença de Petri da Videira: Avaliação da eficácia de fungicidas na proteção de feridas de poda.** MSc Thesis, Instituto Superior de Agronomia/Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 2010

PINTO, R.; RODRIGUES, T.; NASCIMENTO, T.; REGO, C.; OLIVEIRA, H.(2005) Microflora associada ao declínio de plantas-mãe de porta-enxertos de videira. In A Produção Integrada e a Qualidade e Segurança Alimentar. 1:191-199.

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. *coughlutinans*) 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.

REGO, C.; NASCIMENTO, T.; OLIVEIRA, H.; Characterisation of *Cylindrocarpon destructans* isolates from grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* V.40, S343-S350. 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.

SERRA, S.; MANNONI, M.A.; LIGIOS, V.; DEMONTIS, A. Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* in grapevine planting material. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 48, p. 177, 2009

SERRA, S.; MANNONI, M. A.; LIGIOS, V.; FIORI, P. P. Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* on grapevine planting material in Sardinia and its control with combined

hot water and cyproconazole treatments. **Phytopathologia Mediterranea**, v.50, p.S61-S76, 2011.

SCHECK, H.; VASQUEZ, S.; FOGLE, D.; GUBER, D.W (1998) Grape growers report losses to black-foot and grapevine decline. *California Agriculture* 52:19-23.

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.

SUBBARAO, K. V.; HUBBARD, J. C. Interactive effects of broccoli residue and temperature on *Verticillium dahliae* microesclerotia 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. Supplemented.

WAITE, H.; MAY, P. The effects of hot water treatment, hydration and order of nursery operations on cuttings of *Vitis vinifera* cultivars. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 44, p. 144–152, 2005.

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.

WAITE, H.; GRAMAJE, D.; WHITELAW-WECKERT, M.; TORLEY, P.; HARDIE, J. Soaking grapevine cuttings in water: a potential source of cross contamination by micro-organisms. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 52, n.2, p. 359–368, 2013.

WHITEMAN, S. A.; STEWARD, A.; RIDGWAY, H. J.; JASPERS, M. V. Infection of rootstock mother-vines by *Phaeoconiella 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. (2001) Effect of temperature and water potential on survival and mycelial growth of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. *Plant Disease* 85:195-201.