

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Área de concentração: Fruticultura de Clima Temperado



Tese

Termoterapia no controle de fungos causadores de doenças de tronco em videira

Sabrina Lerin

Pelotas, 2017

Sabrina Lerin

Termoterapia no controle de fungos causadores de doenças de tronco em videira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Fruticultura de Clima Temperado).

Orientador: Paulo Celso de Mello Farias

Co-orientadores: Marcos Botton
Marcus André Kurtz Almança

Pelotas, 2017

Sabrina Lerin

Termoterapia no controle de fungos causadores de doenças de tronco em videira

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 20 de fevereiro de 2016, às 8:30 horas.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Paulo Celso de Mello Farias (Orientador)
Doutor em Ciências pela Universidade de São Paulo

Prof. Dra. Candida Renata Jacobsen Farias
Doutora em Fitossanidade pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Fabiano Simões
Doutor em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Vagner Brasil Costa
Doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Robson Ryu Yamamoto
Doutor em Ciências pela University of Tsukuba/Japan

**Dedico este trabalho aos meus pais e todos os
agricultores que na terra derramam seu suor e
dela conseguem seu digno sustento.**

Agradecimentos

A Deus,

Aos meus pais José e Ivone pelo amor e incentivo para seguir minha caminhada;

A minha irmã Fernanda pelo amor e companheirismo,

Ao meu namorado Cristiano pelo amor e compreensão,

Aos meus colegas e amigos da Embrapa Uva e Vinho: Aline Nondillo, Aline Guindani, Caroline Galzer, Cléber Baronio, Inana Schutze, Jeovana Ceresa, Joel Pasinato, Lígia Bortoli, Marcelo Zanelatto, Morgana Baldin, Ruben Machota Jr., Simone Andzeiewski, Vitor Pacheco e à laboratorista Vânia Sganzerla pela amizade, pela ajuda nos experimentos e pela parceria.

Aos meus colegas e amigos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul: Bruna Pacini, Danton Magri, Júlio Tonello, Lucas Comachio, Luísa Zuchi, Maíke Oliveira, Mariane Tedesco, Renata Ril e à laboratorista Cíntia de Deus pela amizade e pela ajuda nos experimentos,

Aos meus amigos da pousada da Embrapa Uva e Vinho pela amizade e parceria,

Aos meus colegas e amigos do grupo da fruticultura da UFPel pela amizade,

Aos meus amigos do coração que mesmo de longe estiveram torcendo por mim,

Aos meus orientadores Paulo Celso de Mello Farias, Marcos Botton e Marcus André Kurtz Almança pela motivação, pelos ensinamentos e paciência,

A Daniel Santos Grohs e ao Dr. Henrique Pessoa dos Santos pelo apoio para realização dos experimentos, pela colaboração, pelos ensinamentos,

Ao professor José Carlos Fachinello (*in memoriam*) pelos ensinamentos,

Ao professor Sami Jorge Michereff pela colaboração com isolados em um dos experimentos.

Ao IFRS – *Campus* Bento Gonçalves e à Embrapa Uva e Vinho por disponibilizar espaço e recursos para o desenvolvimento do trabalho e aos funcionários pelo auxílio durante os trabalhos,

A UFPel pelo ensino público, gratuito e de qualidade,

Aos viveiristas pela colaboração ao cederem material para estudo,

A Capes pela concessão da bolsa de estudos de doutorado,

A todos que de alguma forma estiveram presentes em minha caminhada meu sincero agradecimento.

“ Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota no mar,
mas o mar seria menor se lhe faltasse um gota.”

Madre Teresa de Cálcuta

Resumo

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

As doenças de tronco da videira constituem-se em um dos principais entraves da viticultura mundial, devido aos prejuízos e danos causados, desde a produção de mudas, passando pelo estabelecimento e desenvolvimento do vinhedo. A utilização do tratamento de água quente é uma técnica utilizada com sucesso fora do Brasil no controle destes patógenos. Objetivou-se avaliar o efeito da utilização do tratamento de água quente sobre o material propagativo e o controle de patógenos causadores de doenças de tronco na videira. A tese compreende quatro artigos desenvolvidos entre os anos de 2014 e 2016 na Embrapa Uva e Vinho e no Instituto Federal do Rio Grande do Sul – *Campus* Bento Gonçalves. O Artigo 1 intitulado “Levantamento de fungos associados à morte de plantas em mudas comerciais de videira com e sem tratamento de água quente” trata da verificação da presença de fungos causadores de doenças de tronco em mudas comerciais de videira provenientes de viveiros de três cidades: Bento Gonçalves, Garibaldi e Vacaria tratadas a 50°C por 30 minutos ou não, avaliadas durante três anos. Verificou-se redução da incidência de fungos ao longo dos anos e nas mudas que receberam tratamento de água quente, com destaque para a redução de “*Cylindrocarpon*” spp. O Artigo 2 intitulado “Modelo para quantificação do efeito fisiológico do tratamento de água quente em cultivares de videira” refere-se à quantificação através de modelo matemático do efeito da aplicação do tratamento de água quente sobre a fenologia, brotação e emissão de raiz de seis cultivares de videira. Foi possível agrupar as cultivares através de suas respostas às variáveis analisadas em um único grupo, o que facilita a utilização da técnica. O Artigo 3 intitulado “Efeito do tratamento de água quente na viabilidade de fungos associados a doenças de tronco de videira” relata a avaliação da sensibilidade de 12 isolados patogênicos associados a doenças de tronco na videira ao tratamento de água quente *in vitro*. Observou-se diferença de sensibilidade ao tratamento de água quente entre os isolados, sendo “*Cylindrocarpon*” spp., *Botryosphaeria* spp. e *Campylocarpon fasciculare* os mais sensíveis aos tratamentos. O Artigo 4 intitulado “Tratamento de água quente no controle de *Botryosphaeria* spp. inoculada artificialmente em estacas de videira” trata da avaliação de combinações de tempo e temperatura de tratamento de água quente, definidas com base nos resultados dos artigos 2 e 3, em estacas de Bordô inoculadas artificialmente com o patógeno. Observou-se que a combinação necessária para reduzir a severidade do patógeno nas estacas foi maior que a registrada para controlar e inibir totalmente o patógeno *in vitro*. Conclui-se que o uso do tratamento de água quente é promissor no controle de patógenos causadores de doenças de tronco na videira no Brasil.

Palavras-chave: declínio e morte de plantas, viveiro, fitopatógenos, tratamento com água quente.

Abstract

LERIN, Sabrina. **Thermotherapy to control of grapevine trunk diseases associated fungi**. 2017, 114f. Thesis (Doctoral degree) – Postgraduate Program in Agronomy, Federal University of Pelotas, Pelotas.

The grapevine trunk diseases constitute one of the main obstacles of the world viticulture, due to the damages and damages caused, from the production of seedlings, through the establishment and development of the vineyard. The hot water treatment is a technique used successfully outside Brazil in the control of these pathogens. The aim of this study was evaluate the effect of the hot water treatment on propagation material and on control of grapevine trunk diseases pathogens. The thesis comprises four articles developed between the years 2014 and 2016 at Embrapa Grape and Wine and the Federal Institute of Rio Grande do Sul/*Campus* Bento Gonçalves. Article 1 entitled "Survey of fungi associated with plant death in commercial seedlings of vine with and without hot water treatment" is aimed at verifying the presence of fungi that cause trunk diseases in commercial vine cuttings from three nurseries: Bento Gonçalves, Garibaldi and Vacaria treated at 50°C for 30 minutes or not, evaluated for three years. There was a reduction in the incidence of fungi over the years and in the seedlings that received hot water treatment, especially the reduction of "*Cylindrocarpon*" spp. Article 2 entitled "Model for quantifying physiological effect of hot water treatment on grapevine cultivars" talks about quantification through mathematical model of the effect of the application of hot water treatment on phenology, budding and root emission of six grapevine cultivars. It was possible to group the cultivars through their responses to the variables analyzed in a single group, which facilitates the technique use. Article 3 entitled "Effect of hot water treatment on the viability of fungi associated with grapevine trunk diseases" reports the evaluation of the sensitivity of 12 pathogenic isolates associated with trunk diseases in the grapevine to hot water treatment *in vitro*. There was a difference in sensitivity to hot water treatment among the isolates, being "*Cylindrocarpon*" spp., *Botryosphaeria* spp. and *Campylocarpon fasciculare* the most sensitive to the treatments. Article 4 entitled "Hot water treatment in the control of *Botryosphaeria* spp. artificially inoculated on vine cuttings" deals with the evaluation of combinations of time and temperature of hot water treatment, defined based on the results of article 2 and 3, in Bordô cuttings inoculated artificially with the pathogen. It was observed that the combination needed to reduce the severity of the pathogen on the cuttings was greater than that recorded to control totally inhibit the pathogen *in vitro*. It is concluded that the use of hot water treatment is promising in the control of grapevine trunk disease pathogens *in vitro* and *in vivo* in Brazil.

Key-words: Decline and dieback of plants, nursery, phytopathogens and hot water treatment

Lista de Figuras

6 Artigo 3

Figura 1	Protocolo de tratamento térmico in vitro; A: fragmentos de meio em microtubo de 2mL; B: microtubos acondicionados em estante plástica submersa em tanque de banho maria permitindo regular as diferentes temperaturas; C: fragmentos de meio plaqueados em placa de Petri após o tratamento térmico; D: placa de Petri exemplificando o crescimento fúngico ou não dos fragmentos de meio após o tratamento térmico	89
Figura 2	Percentual de crescimento micelial após o tratamento de água quente para <i>Fusarium</i> spp. (171TD), <i>Phaeo. parasiticum</i> (CMM 4320) <i>Cylindrocarpon</i> spp. (176TD), <i>Camp. fasciculare</i> (CMM 4273) e <i>Pcl. chlamydospora</i> (CMM 4320 e 157TD)	91
Figura 3	Percentual de crescimento micelial após o tratamento de água quente para <i>L. brasiliense</i> (CMM 354 e 418), <i>L. theobromae</i> (CMM 307, 384 e 820) e <i>Botryosphaeria</i> spp. (164TD)	94

7 Artigo 4

Figura 1	Protocolo de inoculação; A: furador de rolha de 4mm; B: perfuração realizada no meio da estaca; C: detalhe do furo feito até atingir a medula da estaca; D: estaca após inoculação com indicação dos pontos para posterior reisolamento	105
Figura 2	A: placas contendo os nove segmentos retirados da estaca com as posições rotuladas; B: estaca com 10 cm de entrenó e marcações demonstrando os nove segmentos (1cm) feitos no momento do reisolamento. Detalhe do crescimento fúngico na estaca percebido através do escurecimento do ponto de inoculação	108

Lista de Tabelas

2 Projeto de Pesquisa

Tabela 1	Descrição dos tratamentos a serem realizados em estacas de seis cultivares de videira	36
----------	---	----

4 Artigo 1

Tabela 1	Percentual da presença de fungos isolados por ponto de isolamento em mudas de Chardonnay, viveiro de Vacaria	55
Tabela 2	Percentual da presença de fungos isolados por ponto de isolamento em mudas de Chardonnay, viveiro de Bento Gonçalves	56
Tabela 3	Percentual da presença de fungos isolados por ponto de isolamento em mudas de Bordô, viveiro de Vacaria	57
Tabela 4	Percentual da presença de fungos isolados por ponto de isolamento em mudas de Bordô, viveiro de Garibaldi	58
Tabela 5	Percentual (%) de mudas de videiras infectadas com fungos causadores de doenças de tronco da videira	59

5 Artigo 2

Tabela 1	Efeito de temperatura e tempo de tratamento com água quente (TAQ) sobre a fenologia de seis cultivares de videira submetidas ou não à hidratação prévia. Equações baseadas em $y_i = a + b_1 x_1 + b_2 x_2$ (onde, y_i : variável; a: coeficiente constante; b_1 : coeficiente temperatura; b_2 : coeficiente tempo)	81
Tabela 2	Efeito de temperatura e tempo de tratamento com água quente (TAQ) sobre a brotação de seis cultivares de videira submetidas ou não à hidratação prévia. Equações baseadas em $y_i = a + b_1 x_1 + b_2 x_2$ (onde, y_i : variável; a: coeficiente constante; b_1 : coeficiente temperatura; b_2 : coeficiente tempo)	82
Tabela 3	Efeito de temperatura e tempo de tratamento com água quente (TAQ) sobre a emissão de raiz de seis cultivares de videira submetidas ou não à hidratação prévia. Equações baseadas em $y_i = a + b_1 x_1 + b_2 x_2$ (onde, y_i : variável; a: coeficiente constante; b_1 : coeficiente temperatura; b_2 : coeficiente tempo)	83
Tabela 4	Comparação entre com e sem hidratação para as três variáveis e comparação entre as seis cultivares de videira. Equações baseadas em $y_i = a + b_1 x_1 + b_2 x_2$ (onde, y_i : variável; a: coeficiente constante; b_1 : coeficiente temperatura; b_2 : coeficiente tempo)	84

6 Artigo 3

Tabela 1	Características dos isolados utilizados no experimento	88
Tabela 2	Análise de variância para o efeito de temperatura e tempo de tratamento térmico sobre o crescimento micelial dos isolado	95

7 Artigo 4

Tabela 1	Percentual médio de incidência e severidade em estacas de 'Bordô' tratadas com diferentes temperaturas e tempos de tratamento de água quente uma semana após inoculação com <i>Botryosphaeria</i> spp.	107
Tabela 2	Incidência de infecção de <i>Botryosphaeria</i> spp. em posições contínuas ao longo de segmentos da estaca, com 0 indicando o ponto de inoculação, números negativos seções de 1 cm abaixo e números positivos seções de 1 cm acima da posição 0, após diferentes tratamentos de água quente realizados após uma semana da inoculação	109

Sumário

Resumo	08
Abstract	09
Lista de Figuras	10
Lista de Tabelas	11
1 Introdução Geral	15
2 Projeto de Pesquisa	28
3 Relatório de Campo	47
Artigos Desenvolvidos	49
4 Artigo 1	49
Levantamento de fungos associados a morte de plantas em mudas comerciais de videira com e sem tratamento de água quente	49
Resumo	49
Abstract	49
Introdução	50
Material e Métodos	53
Resultados e Discussão	54
Conclusões	62
Referências	62
5 Artigo 2	68
Modelo para quantificação do efeito fisiológico do tratamento de água quente em cultivares de videira	68
Resumo	68
Abstract	68
Introdução	69
Material e Métodos	71
Resultados e Discussão	72
Conclusões	76
Referências	77
6 Artigo 3	85
Efeito do tratamento de água quente na viabilidade de fungos associados a doenças de tronco de videira	85

Resumo	85
Abstract	85
Introdução	86
Material e Métodos	88
Resultados e Discussão	90
Conclusões	95
Referências	96
7 Artigo 4	102
Tratamento de água quente no controle de <i>Botryosphaeria</i> sp. inoculada artificialmente em estacas de videira	102
Resumo	102
Abstract	102
Introdução	103
Material e Métodos	104
Resultados e Discussão	106
Conclusões	109
Referências	109
8 Considerações Finais	112
9 Anexo	126

1 Introdução Geral

A produção mundial de uvas em 2014 atingiu 73.7 milhões de toneladas, tendo como maiores países produtores a China, Estados Unidos, França e Itália respectivamente ocupando uma área cultivada de 7.573 mil ha de vinhedos, sendo a Espanha (1.038 ha) e a China (800 mil ha) os países com maior área plantada (PROTAS, 2015).

A produção mundial de vinhos foi estimada em 27 milhões de litros, liderada pela França, Itália e Espanha. Já o consumo da bebida no mundo foi estimado em 24 milhões de litros, tendo como principais países consumidores os Estados Unidos, França e Itália (PROTAS, 2015).

No Brasil, as primeiras videiras foram trazidas pelos portugueses em 1532 por Martin Afonso de Souza, mas por falta de conhecimento e condições desfavoráveis de clima, o plantio não seguiu adiante. A viticultura somente ganhou importância econômica e progrediu com a chegada dos imigrantes italianos em 1875, que com conhecimento técnico para o cultivo e elaboração de vinhos e com o costume de consumir a bebida, alavancaram a produção de uvas finas (*Vitis vinifera*) e comuns (*Vitis labrusca*) principalmente no Sul do Brasil (CAMARGO et al., 2010; IBRAVIN, 2016).

Inicialmente restrita às regiões Sul, a viticultura expandiu-se com o avanço técnico-científico e consolidou-se como atividade comercial em outros estados como São Paulo e Minas Gerais (CAMARGO; TONETTO; HOFFMANN, 2011) Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Rondônia, Ceará e Piauí (DEBASTIANI et al., 2015) e para o semiárido nordestino com cultivos na região do Vale do Sub-Médio São Francisco (CAMARGO et al., 2010).

O crescimento do setor e a utilização de novas tecnologias contribuíram para a consolidação da viticultura como uma atividade rentável economicamente no Brasil (CAMARGO et al., 2010). Com uma área plantada de 78.553 hectares (IBGE, 2017) e mais de 1,1 mil vinícolas distribuídas em todo território nacional, a produção de vinhos e derivados é uma atividade consolidada (IBRAVIN, 2017).

A região Sul corresponde a aproximadamente 75.57% da área total cultivada com videira. Ocupando 59.367 hectares, esta região se destaca no cenário nacional

também pela produção, que foi de 513.489 t em 2016, ou seja, 52% da produção nacional de uvas, que foi de 987.059 t (IBGE, 2017).

Em 2016, o Estado do Rio Grande do Sul foi responsável por 41.9% da produção nacional, tendo processado 300.3 milhões de kg de uvas viníferas, híbridas e americanas. Esse volume somente processado por empresas gaúchas, coloca em destaque a Serra Gaúcha, correspondendo por 85% da produção nacional de vinhos (IBRAVIN, 2017; IBGE, 2017).

A importância da viticultura no Brasil pode ser percebida por meio das seis Indicações de Procedência (IP) já obtidas no país, de acordo com o Ibravin (2017). Somente no Rio Grande do Sul existem cinco regiões com certificação: a IP Farroupilha que representa a maior área de produção de uvas moscatéis do Brasil; a IP Monte Belo caracterizada por vinícolas familiares de pequeno porte e por ser o município com maior produção de *Vitis vinifera* per capita; a IP Vale dos Vinhedos tradicionalmente conhecida pela produção de vários vinhos e primeira região do Brasil a receber certificação de denominação de origem (DO); a IP Pinto Bandeira com vocação para produção de vinhos finos e espumantes; a IP Altos Montes que representa a maior área já certificada no Brasil, com 173,84 Km², caracterizada por mão de obra familiar e pequenas propriedades e a IP Vales da Uva Goethe, única IP localizada fora do Rio Grande do Sul, no litoral de Santa Catarina, que destaca-se pela produção de vinhos brancos, licorosos e espumantes (IBRAVIN, 2017).

O cultivo da videira é realizado por diferentes categorias de produtores, incluindo uma parcela significativa de agricultores familiares, que tem na viticultura a base de seu sustento, resultando em importância econômica e social seja pelo número de empregos gerados diretamente no cultivo, à indústria e comércio e indiretamente através das oportunidades proporcionadas pelo enoturismo (IBRAVIN, 2017).

Os maiores obstáculos ao crescimento da viticultura são as pragas e doenças, em todas as áreas vitivinícolas do mundo, que prejudicam tanto a quantidade como a qualidade do produto final, sendo consideradas limitantes ao desenvolvimento da atividade (KUHN; NICKEL, 1998).

As doenças de tronco da videira englobam doenças como o Pé-Preto, doença de Petri, Esca, podridão descendente entre outras. Atualmente, o avanço das doenças do tronco da videira que ocorre na grande maioria dos vinhedos do mundo representa uma grande ameaça para a viticultura e responde por perdas econômicas significativas para a indústria vinícola (LEVAUSSEUR-GARCIA; MALAURIE;

MAILHAC, 2016). No Chile, o rápido desenvolvimento da indústria vinícola atrelado ao incremento na demanda de produção de mudas refletiu na perda de qualidade da propagação de videiras, o que de acordo com Díaz et al. (2009) pode ter contribuído para a expansão das doenças de tronco.

Desde 1990, vinícolas e viticultores têm registrado perdas na implantação de vinhedos pela morte de mudas e a presença de sintomas de declínio das videiras em plantas jovens (WAITE; MAY, 2005). O acompanhamento de vinhedos com problemas de declínio evidenciou que muitos fatores estão envolvidos com o baixo desempenho das videiras, dentre eles: o estresse induzido na propagação do material (defeitos morfológicos, tempo de armazenamento refrigerado, etc.), o estresse na implantação e manejo do vinhedo (preparo inadequado do terreno, irrigação e nutrição deficientes ou excessivas) e os estresses biológicos (causados por patógenos, vírus, nematoides, pragas, etc.) merecendo destaque a presença de patógenos que atacam o tronco das videiras e comprometem o sistema vascular (GRAMAJE; ARMENGOL, 2011).

Conhecidas como declínio de Eutypa ou Eutipiose (*Eutypa* spp.), doença de Petri (*Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp.), Esca (*P. chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp., *Fomitiporia mediterranea* e *F. australiensis*), podridão descendente (fungos da família Botryosphaeriaceae) e declínio de *Phomopsis* (*Phomopsis viticola*), Pé-Preto ("*Cylindrocarpon*" spp., *Campylocarpon* spp.) entre outras, as doenças de tronco na videira são um problema que vêm aumentando em intensidade e gravidade na viticultura mundial, acarretando no declínio lento das plantas, na redução da produção e da vida produtiva e aumentando os custos de manejo no vinhedo (ALMANÇA et al., 2013; HALLEN et al., 2006; MUTAWILA et al., 2011).

Úrbez-Torres et al. (2009) observaram os fungos *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia seriata*, *D. corticola*, *Phomopsis viticola*, *Eutypella vitis*, *Diatrypella* sp., *Truncatella* sp. e *Pestalotiopsis* sp. associados a plantas de videira com sintoma de declínio na Califórnia (EUA). Os sintomas são variáveis, mas geralmente consistem em necrose das folhas, redução do crescimento e da produção e, em casos mais graves, acarretam na morte das videiras (NEWSOME, 2012; SURICO, 2009).

Estas doenças atacam os vinhedos em diferentes fases do desenvolvimento (ABREO et al., 2013). As doenças de Petri e Pé-Preto se manifestam nos primeiros anos causando redução de vigor e a morte das plantas, enquanto que a doença de

Esca ocorre em vinhedos adultos, causando podridão no ramo e tronco da videira (ABREO et al., 2013; ÚRBEZ-TORRES et al., 2012).

No Brasil, Correia et al. (2013) relataram a primeira ocorrência da espécie *P. chlamydospora* no Estado de Pernambuco em cultivares de uva para mesa 'Isabel' e 'Red Globe'. No Rio Grande do Sul, foi registrada a ocorrência de fungos como "*Cylindrocarpon*" spp., *Phaeoacremonium* spp., *Verticillium* spp., *Botryosphaeria* spp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis*, *Graphium* spp. e *Cylindrocladium* spp. em amostras de tronco e de raízes, de cultivares americanas, viníferas e híbridas (GARRIDO et al., 2004).

Mais recentemente, Almança et al. (2013) verificaram a ocorrência de *P. chlamydospora* nas cultivares Bordô e Niágara (*Vitis labrusca*), sugerindo que mais estudos devem ser efetuados para a confirmação das espécies presentes na Serra Gaúcha. Santos et al. (2013a; 2013b e 2014) realizaram o primeiro relato da ocorrência de *Ilyonectria macrodidyma*, *I. robusta* e "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* em videiras que apresentaram sintomas de declínio do Rio Grande do Sul. No Sudeste do Brasil, no estado de São Paulo, também foram detectados patógenos associados à doença de Petri: *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* e *Phialemonium dimorphosporum* em videiras da cultivar Niágara Rosada (FERREIRA et al., 2013a; 2013b).

Segundo Van Niekerk et al. (2011) a principal forma de penetração destes fitopatógenos é através de ferimentos realizados durante a poda. Devido à existência deste potencial de penetração, há a necessidade de uma proteção destes ferimentos, seja com a aplicação de fungicidas químicos ou biológicos.

Além dos ferimentos da poda, os fitopatógenos também podem infectar as videiras no processo de propagação, através do ferimento causado pela enxertia e também por meio da multiplicação de material contaminado proveniente de plantas matrizes infectadas (AROCA et al., 2010).

Halleen et al. (2003) verificaram mudas de videiras provenientes de viveiros comerciais na África do Sul quanto à presença de patógenos causadores de doenças de tronco, encontrando principalmente patógenos associados à doença de Petri do gênero *Phaeoacremonium* spp. e *Phaeomoniella chlamydospora* em mudas aparentemente saudáveis. Patógenos do gênero "*Cylindrocarpon*" spp. associados à doença do Pé-Preto também foram encontrados nas mudas analisadas, o que

segundo os autores pode justificar a baixa sobrevivência das mudas quando plantadas a campo.

No Brasil, em um levantamento sobre a qualidade fitossanitária e morfológica de mudas de videiras comerciais de 'Bordô' enxertadas sobre 'Paulsen 1103' feito por Grohs et al. (2015) foram encontrados fungos dos gêneros *Botryosphaeria* spp., "*Cylindrocarpon*" spp. e *Phaeoacremonium* spp.

Em termos de material de propagação e vinhedos recém implantados, os fungos associados às doenças de tronco são considerados os patógenos mais agressivos (GRAMAJE; ARMENGOL, 2011). Testes realizados por Rolshausen et al. (2010) avaliaram o potencial de infecção de nove fungos associados às doenças de tronco, verificando que *Togninia minima*, *Phaeoacremonium parasiticum* e *Pleurostomophora richardsiae* foram mais efetivos na infecção de ferimentos em videiras da cultivar Chardonnay (vinhedo com 32 anos) quando comparados com *E. lata* e *P. chlamydospora*.

Díaz et al. (2009) observaram que a presença de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum* afetou a qualidade dos portaenxertos 'Paulsen 1103', '101-14 MG', '3309 C', 'Kober 5BB' e 'SO4' havendo diferença de suscetibilidade entre os portaenxertos avaliados quanto aos patógenos, com redução do desenvolvimento do calo, da emissão de raiz e da brotação.

Pitt et al. (2010) e Van Niekerk et al. (2011) relatam que a distribuição dos sintomas causados pela presença dos patógenos é influenciada pelo clima. Isso faz com que um patógeno se sobressaia em relação aos outros em determinadas regiões, o que segundo Aroca e Raposo (2009) demonstra a variabilidade existente de um local para outro.

Com a descoberta e identificação dos patógenos associados à morte de plantas nas mais variadas regiões vitícolas, diferentes técnicas têm sido avaliadas para controlar ou minimizar a campo e nos viveiros os danos causados por esses fitopatógenos. Entre estas estão a utilização de controle físico (GRAMAJE; ARMENGOL, 2012), químico (GRAMAJE et al., 2009) e biológico (KOTZE et al., 2011).

Uma das alternativas para o manejo das doenças de tronco é a termoterapia, através do tratamento com água quente, a qual é amplamente utilizada no material propagativo de diversas espécies vegetais para controlar pragas, doenças e vírus,

como por exemplo, em azaleia (COPES; BLYTHE, 2011), batata-doce (MERVAT; ASHOUB, 2009) e em videira (BAYATI et al., 2011).

Segundo Waite et al. (2013) diversos estudos têm sido realizados para avaliar o efeito da aplicação de tratamento térmico, de curta ou longa duração, em material propagativo de videiras sobre os patógenos associados às doenças de tronco. A realização de tratamento térmico com a temperatura de 50°C por 30 minutos se tornou uma prática comum entre os viveiros em muitos locais, tendo como resultado a redução da incidência dos patógenos associados às doenças de tronco (SERRA et al., 2011).

A diversidade e variabilidade genética de fungos associados às doenças de tronco juntamente com as condições climáticas de cada região, permitiram demonstrar que temperaturas superiores à 50°C podem ser mais eficazes na erradicação de determinados patógenos em material propagativo em regiões mais quentes, como em estudos realizados em Valencia, na Espanha por Gramaje et al. (2009b), e Gramaje e Armengol, (2012) ou o contrário, que temperaturas inferiores à 50°C podem ser eficazes na redução de patógenos em regiões mais frias, como na Nova Zelândia (BLEACH et al., 2013).

Ensaio in vitro têm sido conduzidos para verificar quais são as combinações de tempo e temperatura que efetivamente inibem o crescimento de patógenos associados às doenças de tronco. Experimentos conduzidos Whiting et al. (2001) demonstraram que *Phaeoacremonium* spp. e *Phaeomoniella chlamydospora* não foram inativados quando submetidos à temperatura de 37°C, no entanto depois de 15 minutos à 51°C a germinação conidial foi inibida.

Gramaje et al. (2010) relataram que o atual protocolo de tratamento térmico à 50°C por 30 minutos pode ser suficiente para controlar "*Cylindrocarpon*" spp., entretanto não é suficiente para controlar *Cadophora luteo-olivacea* e *Phaeoacremonium* spp. Testes in vitro realizados por Bleach et al. (2013) com três espécies de "*Cylindrocarpon*", demonstraram que temperaturas inferiores à 50°C foram efetivas para inibir o crescimento dos patógenos.

Entretanto, estudos demonstraram que o tratamento térmico à 50°C por 30 minutos pode não ser eficiente para todos os patógenos associados às doenças de tronco, como já reportado por Serra et al. (2009) e Habib et al. (2009) e pode danificar as mudas de videira (BLEACH et al., 2009; HABIB et al., 2009), o que, segundo Waite

e Morton (2007) sugere que a tolerância das plantas e dos patógenos ao tratamento térmico pode ser influenciada pelo clima no qual as plantas estão se desenvolvendo.

Como descrito anteriormente, o tratamento térmico pode influenciar a viabilidade e a qualidade do material vegetativo e esse efeito segundo Waite e May (2005) pode variar com diversos fatores: cultivar, condições de crescimento e desenvolvimento da planta matriz, tipo de material utilizado pelo viveiro (estacas ou mudas enraizadas), condições de armazenamento, hidratação das estacas antes do plantio e com as condições de crescimento após a formação do calo.

Embasando-se pelo aumento da frequência de vinhedos com problemas de morte de plantas associado à presença de fungos causadores de doenças de tronco na Serra Gaúcha (SILVA; HECKLER; SANTOS, 2016) e pelos conhecimentos e experiências até hoje relatados sobre o uso de tratamento térmico no controle de patógenos associados às doenças de tronco no mundo, torna-se imprescindível avaliar o efeito do uso desta técnica sobre os principais patógenos e espécies viníferas cultivadas aqui no Brasil.

Assim, o objetivo geral do trabalho foi avaliar a utilização do tratamento térmico no processo de produção de mudas como método de controle de fitopatógenos associados às doenças de tronco em videiras no Sul do Brasil.

Referências

ABREO, E.; MARTÍNEZ, S.; NAVARRETE, F.; BETTUCCI, L.; LUPO, S. Detección temprana de organismos causantes de las enfermedades del tronco de la vid.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Serie 44 FPTA-INIA, 32p., 2013.

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. Embrapa Uva e Vinho, **Comunicado Técnico 134**, 5p., 2013.

AMIRI, A.; BOMPEIX, G. Control of *Penicillium expansum* with potassium phosphite and heat treatment. **Crop Protection**, v.30, p.222-227, 2011.

- AROCA, A.; RAPOSO, R. Pathogenicity of *Phaeoacremonium* species on grapevines. **Journal Phytopathology** v. 15, p. 413-419, 2009;
- AROCA, A.; GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; RAPOSO, R. Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. **European Journal of Plant Pathology**, v.126, p.165-174, 2010.
- AVIS, T. J.; GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R.J. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. **Soil Biology & Biochemistry**. v.40, p.1733, 2008.
- BAYATI, S.; SHAMS-BAKHSH, M.; MOIENI, A. Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryotherapy and electrotherapy. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v.13, p.443-450, 2011.
- BLEACH, C.M.; JONES, E.E.; JASPERS, M.V. Hot water treatment for elimination of *Cylindrocarpon* species from infected grapevines. **Phytopathologia Mediterranea**, v.48, p. 183, 2009.
- BLEACH, C.M.; JONES, E.E.; RIDGWAY, H.; JASPERS, M. Hot water treatment to reduce incidence of black foot pathogens in young grapevines grow in cool climates. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 52, n.2, p.347-358, 2013.
- CAMARGO, U. A.; MAIA, J.D.G.; RITSCHER, P. **Embrapa Uva e Vinho: novas cultivares brasileiras de uva**. 1 ed. Embrapa Uva e Vinho: Bento Gonçalves, 2010, 64p.
- CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. suppl, p. 144-149, 2011.
- COPES, W. E.; BLYTHE, E. K. Rooting response of azalea cultivars to hot water treatment used for pathogen control. **Hortscience**, v.46, n.1, p.52-56, 2011.
- CORREIA, K. C.; CÂMARA, M. P. S.; BARBOSA, M. A. G.; SALES JUNIOR, R.; AGUSTÍ-BRISACH, C.; GRAMAJE, D.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ABAD-CAMPOS, P.; ARMENGOL, J.; MICHEREFF, S. J. Fungal species associated with trunk diseases

of table grapes in Northeastern Brazil. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 52, n. 2, p.380–387. 2013.

DEBASTIANI, G.; LEITE, A. C.; WEIBER JUNIOR, C. A.; BOELHOUWER, D. I. Cultura da uva, produção, e comercialização de vinhos no Brasil: realidades e desafios. **Revista Cesumar Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**, v.20, n.2, p. 471-485, 2015.

DÍAZ, G. A.; ESTERIO, M.; AUGER, J. Effects of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine rootstocks. **Ciencia Investigación Agraria** v. 36, n. 3, p. 381-390, 2009;

FERREIRA, A. B. M.; MIGOTTO, B. C.; LEITE, L. G.; FIRMINO, A. C.; FURTADO, E. L.; PADOVANI, C. R.; BUENO, C. J. Levantamento de fungos de tronco em Niágara Rosada jovem no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 39, 2013a. Suplemento. 1 CD-ROM.

FERREIRA, A. B. M.; MIGOTTO, B. C.; LEITE, L. G.; FIRMINO, A. C.; FURTADO, E. L.; PADOVANI, C. R.; BUENO, C. J. Movimentação de *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phialemonium dimorphosporum* em Niágara rosada no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 39, 2013b. Suplemento. 1 CD-ROM.

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**, v. 29, n. 3, p. 322- 324, 2004.

GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J.; SALAZAR, D.; LÓPEZ-CÓRTES, 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.; AROCA, A.; RAPOSO, R.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Evaluation of fungicides to control Petri disease pathogens in the grapevine propagation process. **Crop Protection**, v.28, p.1091-1097, 2009b.

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

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

GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J. Effects of hot-water treatment, post-hot-water treatment colling 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.

GROHS, D.S.; FAJARDO, T.V.M.; GARRIDO, L.R.; VIANA, G.; DA ROSA, C.; GAVA, R.; FELDBERG, N.P. Levantamento da qualidade fitossanitária e morfológica na produção comercial de mudas de videira. In: **Anais ...XV Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia**. Bento Gonçalves - RS, p. 296, 2015.

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

HALLEEN, F.; CROUS, P.W.; PETRINI, O. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. **Australasian Plant Pathology**, v. 32, p. 47–52, 2003.

HALLEEN, F.; FOURIE, P.H.; CROUS, P.W. A review of black foot disease of grapevine. **Phytopathologia Mediterranea**, v.45, p. S55–S67, 2006.

IBGE - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default_publ_completa.shtm. Acesso em fev. 2017.

IBRAVIN – Brasil Vitivinícola: Dados Estatísticos. Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/>. Acesso em fev. 2017.

JAFARPOUR, M.; FATEMI, S. Post-harvest treatments on shelf life of sweet orange 'Valencia'. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.6, n.11, p.2117-2124, 2012.

KOTZE, C.; VAN NIEKERK, J.; MOSTERT, L.; HALLEEN, F.; FOURIE, P. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. **Phytopathologia Mediterranea**, v.50, p. 247-263, 2011.

KUHN, G. B.; NICKEL, O. Viroses e sua importância na viticultura brasileira. **Informe Agropecuário**, v. 19, n. 194, p. 85-91, 1998.

LEVAUSSEUR-GARCIA, C.; MALAURIE, H.; MAILHAC, N. An infrared diagnostic system to detect causal agents of grapevine trunk diseases. **Journal of Microbiological Methods**, v.131, p.1-6, 2016.

MERVAT, M. M. E. F.; ASHOUB, A. Utility of thermotherapy and meristem tip for freeing sweet potato from viral infection. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.3, n.1, p.153-159, 2009.

MUTAWILA, C.; FOURIE, P. H.; HALLEEN, F.; MOSTERT, L. Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. **Phytopathologia Mediterranea**, v.50, p.264-276, 2011.

NEWSOME, J. Grapevine Trunk Disease: A review. 21 p., 2012.

PITT, W. M.; HUANG, R.; STEEL, C. C.; SAVOCCHIA, S. Identification, distribution and current taxonomy of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine decline in New South Wales and South Australia. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.16, n.1, p.258-271, 2010.

PROTAS, J. F. da S. **Nota técnica - Um balanço da Vitivinicultura Mundial em 2014**. Embrapa 29/07/2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/4007952/nota-tecnica----um-balanco-da-vitivinicultura-mundial-em-2014>. Acesso em nov. 2016.

ROLSHAUSEN, P. E.; ÚRBEZ-TORRES, J. R.; ROONEY-LATHAM, S.; ESKALEN, A.; SMITH, R. J.; GUBLER, W. D. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. **American Journal of Enology and Viticulture** v.61, p.113-119, 2010;

SANTOS, R.F. dos; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B.; HECKLER, L.; FINGER, G.; MACIEL, C.G.; HAKAWA, R.; GARRIDO, L.R. First report of *Ilyonectria macrodidyma* associated with black foot disease of grapevine in Brazil. **Plant Disease**, v.98, n.1, p.156, 2013a.

SANTOS, R.F. dos; BLUME, E.; SILVA, G.B.P. da; LAZAROTTO, M.; SCHEEREN, L.E.; ZINI, P.B.; BASTOS, B.O.; REGO, C. First report of *Ilyonectria*

robusta associated with black foot disease of grapevine in southern Brazil. **Plant Disease**, v. 98, n. 6, p. 845-1, 2013b.

SANTOS, R.F. dos; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B.; STECKLING, S.M.; BURTET, G.W.; HARAKAWA, R.; GARRIDO, L.R.; REINIGER, L.R.S. First Report of "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* Associated with Black Foot Disease of Grapevine in Brazil. **Plant Disease**, v.98, n.4, p.567, 2014.

SERRA, S.; MANNONI, M.A.; LIGIOS, V.; DEMONTIS, A. Effect of combined hot water and cyproconazole on the eradication of *Phaeomoniella chlamydospora* from grapevine planting material. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 48, p. 185-186, 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.

SILVA, G. B. P. da; HECKLER, L. I.; SANTOS, R. F. dos. Pé-preto. **Cultivar HF**, set/out, p.24-26, 2016.

SURICO, G. Towards a redefinition of the diseases within the esca complex of grapevine. **Phytopathologia Mediterranea**, v.48, p.05-10, 2009.

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

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; PEDUTO, F.; STRIEGLER, R. K.; URREO-ROMERO, K. E.; RUPE, J. C.; CARTWRIGHT, R. D.; GUBLER, W. D. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. **Fungal Diversity**, v.52, n.1, p.169-189, 2012.

VAN NIEKERK, J. M.; BESTER, W.; HALLEEN, F.; CROUS, P. W.; FOURIE, P. H. The distribution and symptomatology of grapevine trunk disease pathogens are influenced by climate. **Phytopathologia Mediterranea**, v.50, p.98-111, 2011;

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.; MAY, P.; BOSSINGER, G. Variations in phytosanitary and other management practices in Australian grapevine nurseries. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 52, n.2, p. 369-379, 2013.

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

2 Projeto de Pesquisa

(Projeto original aprovado pelo colegiado do Programa de Pós-graduação em Agronomia da UFPel em 2014).

2.1 Título: Tratamento térmico no controle de fungos associados à doenças de tronco no Sul do Brasil

2.2 Resumo

Uma das maiores barreiras nas áreas vitivinícolas do mundo são as pragas e doenças, que restringem o desenvolvimento da atividade e comprometem tanto a quantidade como a qualidade do produto final. As doenças causadas por fungos tem grande importância na viticultura devido à redução qualitativa e quantitativa de produção. Um complexo de doenças de tronco tem reduzido a vida útil de vinhedos em todo o mundo e mais recentemente prejudicado a produção de material propagativo e o estabelecimento de vinhedos novos no Brasil. Essas doenças proporcionam declínio lento das plantas, redução da produção, diminuição da vida produtiva das plantas e aumento dos custos de manejo no vinhedo. Estratégias de controle utilizando fungicidas, controle biológico e tratamento térmico tem sido avaliadas e empregadas no combate às doenças de tronco no mundo inteiro, mas no Brasil esse tema é recente. Assim, com base na carência de informações sobre este assunto o presente projeto se propõe a avaliar a utilização do tratamento térmico no controle de patógenos associados às doenças de tronco no processo de produção de mudas.

Palavras-chave: morte de plantas, viveiro, fitopatógenos, replantio, termoterapia.

2.3 Justificativa

Verifica-se o aumento da frequência de vinhedos com problemas de morte de plantas associadas as doenças de tronco. Os sintomas podem variar com a cultivar, portaenxerto, manejo de solo e da planta, bem como de região para região, no entanto, vinhedos jovens com a presença fitopatógenos e pragas apresentam crescimento reduzido, menor vigor, entrenós curtos, folhas com necrose ou cloróticas e declinam até a morte dos tecidos.

As doenças de tronco da videira são um problema relatado nas regiões vitícolas de todo mundo e também no Brasil, no entanto, por se tratar de um problema recente para a vitivinicultura brasileira, existem poucos estudos sobre estas doenças e principalmente sobre seu controle. Sendo assim, é indispensável avaliar estratégias de controle que permitam para minimizar os problemas de morte plantas, sobretudo

em material propagativo, que é a base para a implantação de um vinhedo, que sejam de fácil execução, eficientes e viáveis economicamente.

Prevenir é a forma mais econômica para tratar o problema de morte de plantas e é com base nesta premissa que o presente projeto propõe estudar e avaliar o uso do tratamento térmico no controle de patógenos em material propagativo.

O desenvolvimento deste projeto proporcionará informações acerca do uso do tratamento térmico como uma ferramenta de controle dos patógenos associados às doenças de tronco no processo de produção de mudas de videiras, a fim de obter material propagativo sadio e de qualidade.

A principal contribuição científica deste projeto será a obtenção de informações básicas que permitam a utilização do tratamento térmico na produção de mudas por viticultores e viveiristas do Brasil, possibilitando a implantação ou o replantio de áreas com material isento de patógenos associados às doenças de tronco. Ademais, as informações obtidas serão divulgadas em eventos técnico-científicos e disponibilizadas para técnicos da área e viticultores.

2. 4 Hipótese

O uso de tratamento térmico no processo de produção de mudas pode eliminar a presença de patógenos associados às doenças de tronco.

A utilização de tratamento térmico antes do plantio das mudas de videiras no campo pode eliminar fitopatógenos e pragas presentes na parte externa e interna da muda.

2.5 Objetivo Geral

Avaliar a utilização do tratamento térmico no processo de produção de mudas como método de controle de fitopatógenos associados às doenças de tronco em videiras no Sul do Brasil.

2.5.1 Objetivos Específicos

Determinar combinações de tempo e temperatura para controlar *Phaeomoniella chlamydospora*, “*Cylindrocarpon*” spp. e *Botryosphaeria dothidea*, três dos principais patógenos associados ao declínio da videira.

Avaliar o comportamento de diferentes cultivares de videiras submetidas a tratamento térmico.

Avaliar a eficiência de diferentes tempos e temperaturas de tratamento térmico no controle de patógenos associados ao declínio da videira em material de propagação que não prejudiquem a qualidade fisiológica das mudas.

2.6 Metas

Definir uma ou mais combinações de tempo e temperatura de tratamento térmico que não prejudique a viabilidade e qualidade das mudas de videira.

Definir uma ou mais combinações de tempo e temperatura de tratamento térmico que controlem *Phaeomoniella chlamydospora*, “*Cylindrocarpon*” spp. e *Botryosphaeria dothidea*, patógenos associados as doenças de tronco.

2.7 Revisão Bibliográfica

No Brasil a produção de uvas está distribuída do Sul do Rio Grande do Sul até o Nordeste brasileiro, representado pelo Vale do Rio São Francisco. Algumas são regiões vitícolas tradicionais no cultivo da uva e outras iniciaram os cultivos recentemente, no entanto, cada região produtora possui um diferencial pertinente às condições climáticas e oportunidades oferecidas por sua localização e mercado (IBRAVIN, 2014).

Na safra de 2013 a área brasileira plantada com videiras somou 81.607 hectares com a produção de 1.412.854 toneladas. A região Sul que compreende os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul detém 61.748 hectares, cerca de 75% do total da área nacional cultivada com videiras. O Rio Grande do Sul é responsável por uma produção de 808.267 toneladas, correspondente a 57% da produção nacional (IBGE, 2014).

A importância econômica e social da vitivinicultura advém do número de empregos gerados diretamente no cultivo, das divisas provenientes da exportação da uva de mesa, ou indiretamente, através do negócio do enoturismo que se encontra associado à cultura. Além disso, cabe ressaltar que a videira é cultivada por diferentes estratos de produtores englobando significativa parcela de agricultores de base familiar, sendo fundamental para a fixação destes no campo.

Desde 1990, vinícolas e viticultores tem registrado perdas na implantação de vinhedos pela morte de mudas e a presença de sintomas de declínio das videiras em plantas jovens. Estudos demonstraram que muitos fatores estão envolvidos com o baixo desempenho das videiras, entre eles, a presença de fungos que atacam o tronco das videiras e comprometem o sistema vascular foi apontada como uma das principais causas do problema (GRAMAJE; ARMENGOL, 2011). O rápido desenvolvimento da indústria vinícola, e o incremento na demanda de produção de mudas refletiram na perda de qualidade da propagação de videiras (DÍAZ et al. 2009).

As doenças de tronco na videira são um problema que vem aumentando em intensidade e gravidade na viticultura mundial (MUTAWILA et al., 2011). Vários fungos são associados ao problema, como por exemplo, *Botryosphaeria* spp., "*Cylindrocarpon*" spp. *Eutypa lata*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phomopsis viticola* entre outros. Úrbez-Torres et al. (2009) observaram os fungos *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia seriata*, *Diplodia corticola*, *Phomopsis viticola*, *Eutypella vitis*, *Diatrypella* spp., *Truncatella* spp., *Pestalotiopsis uvicola* e *Pestalotiopsis* spp. associados a plantas de videira com sintoma de declínio na Califórnia.

Os sintomas são variáveis, mas geralmente consistem em necrose das folhas, redução do crescimento e da produção e em casos mais graves acarretam na morte das videiras (SURICO, 2009; NEWSOME, 2012).

Estas doenças atacam os vinhedos em diferentes fases de desenvolvimentos. As doenças de Petri e Pé Preto se manifestam nos primeiros anos causando redução de vigor e a morte das plantas, enquanto a doença de Esca aparece no vinhedo adulto, causando podridão no ramo e tronco da videira (URBEZ-TORRES et al., 2011; ABREO et al., 2013).

No Brasil, Correia et al. (2013) relataram a primeira ocorrência da espécie *Phaeomoniella chlamydospora* no Estado de Pernambuco em cultivares de uva para mesa. No Rio Grande do Sul, um trabalho realizado por Garrido et al. (2004), verificou

a ocorrência de fungos como “*Cylindrocarpon*” spp., *Phaeoacremonium* sp., *Verticillium* spp., *Botryosphaeria* spp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis*, *Graphium* spp. e *Cylindrocladium* spp. em amostras de tronco e de raízes, de cultivares americanas, viníferas e híbridas. Mais recentemente, Almança et al. (2013) verificaram evidências morfológicas de *P. chlamydospora* nas cultivares Bordô e Niágara (*Vitis labrusca*) sugerindo que mais estudos devem ser efetuados para a confirmação das espécies presentes na Serra Gaúcha e Santos et al. (2013a; 2013b e 2014) fizeram o primeiro relato da ocorrência de *Ilyonectria macrodidyma*, *Ilyonectria robusta* e “*Cylindrocarpon*” *pauciseptatum* em videiras que apresentaram sintomas de declínio do Rio Grande do Sul.

Segundo Van Niekerk et al. (2011), em trabalho realizado na África do Sul, a principal forma de penetração destes fitopatógenos é através de ferimentos realizados durante a poda. Devido à existência deste potencial de penetração há a necessidade de uma proteção destes ferimentos, seja com fungicidas químicos ou biológicos. Estes autores verificaram que os ferimentos permanecem suscetíveis à penetração de fitopatógenos por pelo menos três semanas após a poda e que os ferimentos realizados mais tarde durante o inverno são mais suscetíveis que os realizados mais cedo.

Além dos ferimentos da poda, os fitopatógenos também podem infectar as videiras no processo de propagação, através do ferimento causado pela enxertia e também por meio da multiplicação de material contaminado proveniente de plantas matrizes infectadas (AROCA et al., 2010). Em termos de material de propagação e vinhedos recém implantados, os fungos associados as doenças de tronco são considerados os patógenos mais agressivos (GRAMAJE; ARMENGOL, 2011).

Testes realizados por Rolshausen et al. (2010) avaliaram o potencial de infecção de nove fungos associados as doenças de tronco, verificando que *Togninia minima*, *Phaeoacremonium parasiticum* e *Pleurostomophora richardsiae* foram mais efetivos na infecção de ferimentos em videiras da cultivar Chardonnay quando comparados com *Eutypa lata* e *Phaeomoniella chlamydospora*. Díaz et al. (2009) observaram que a presença de *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum* afetaram a qualidade dos portaenxertos Paulsen 1103, 101-14 MG, 3309 C, Kober 5BB, SO4 havendo diferença de suscetibilidade entre os portaenxertos avaliados quanto aos patógenos.

Pitt et al. (2010) e Van Niekerk et al. (2011) relatam que a distribuição dos sintomas causados pela presença dos patógenos parece ser influenciada pelo clima, fazendo com que um patógeno se sobressaia em relação aos outros em determinadas regiões, o que segundo Aroca e Raposo (2009) demonstra a variabilidade existente de um local para outro, além da diferença de sensibilidade entre as cultivares.

Com a descoberta e identificação dos patógenos associados à morte de plantas nas mais variadas regiões vitícolas, diferentes técnicas têm sido avaliadas para controlar ou minimizar a campo e nos viveiros os danos causados por esses fitopatógenos, como por exemplo, a utilização de controle físico, por meio de tratamento térmico com água (GRAMAJE; ARMENGOL, 2012), controle químico com o uso de fungicidas (GRAMAJE et al., 2009b) e controle biológico, com o uso de *Trichoderma* (KOTZE et al., 2011).

A termoterapia é uma técnica amplamente difundida, sendo aplicada na pós-colheita de frutos, como por exemplo, na maçã (AMIRI; POMPEIX, 2011; JAFARPOUR; FATEMI, 2012) e em material propagativo de diversas espécies vegetais para controlar pragas, doenças e vírus, como por exemplo, em azaleia (COPESE; BLYTHE, 2011), batata-doce (MERVAT; ASHOUB, 2009) e em videira (BAYATI et al., 2011).

Segundo Waite et al. (2013) diversos estudos têm sido realizados para avaliar o efeito da aplicação de tratamento térmico, de curta ou longa duração, em material propagativo de videiras sobre os patógenos associados às doenças de tronco. A realização de tratamento térmico com a temperatura de 50°C por 30 minutos se tornou uma prática comum entre os viveiros em muitos locais, tendo como resultado a redução da incidência dos patógenos associados às doenças de tronco (SERRA et al., 2011).

Entretanto, estudos demonstraram que o tratamento térmico à 50°C por 30 minutos pode não ser eficiente para todos os patógenos associados às doenças de tronco, como já reportado por Serra et al. (2009) e Habib et al. (2009) e pode danificar as mudas de videira (BLEACH et al., 2009; HABIB et al., 2009), o que segundo Waite e Morton (2007) sugere que a tolerância das plantas e dos patógenos ao tratamento térmico pode ser influenciada pelo clima no qual as plantas estão se desenvolvendo.

Como descrito anteriormente, o tratamento térmico pode influenciar a viabilidade e a qualidade do material vegetativo e esse efeito segundo Waite e May (2005) pode variar com diversos fatores: cultivar, condições de crescimento e

desenvolvimento da planta matriz, tipo de material utilizado pelo viveiro (estacas ou mudas enraizadas), condições de armazenamento, hidratação das estacas antes do plantio e com as condições de crescimento após a formação do calo.

A diversidade e variabilidade genética de fungos associados as doenças de tronco juntamente com as condições climáticas de cada região permitiram demonstrar que temperaturas superiores à 50°C podem ser mais eficazes na erradicação de determinados patógenos em material propagativo em regiões mais quentes, como em estudos realizados em Valencia, na Espanha por Gramaje et al. (2009), e Gramaje e Armengol, (2012) ou o contrário, que temperaturas inferiores à 50°C podem ser eficazes na redução de patógenos em regiões mais frias, como na Nova Zelândia (BLEACH et al., 2013).

Ensaios *in vitro* têm sido conduzidos para verificar quais são as combinações de tempo e temperatura que efetivamente inibem o crescimento de patógenos associados às doenças de tronco. Experimentos conduzidos Whiting et al. (2001) demonstraram que *Phaeoacremonium* spp. e *Phaeomoniella chlamydospora* não foram inativados quando submetidos à temperatura de 37°C, no entanto depois de 15 minutos à 51°C a germinação conidial foi inibida.

Gramaje et al. (2010) relatam que o atual protocolo de tratamento térmico à 50°C por 30 minutos pode ser suficiente para controlar "*Cylindrocarpon*" spp., entretanto não é suficiente para controlar *Cadophora luteo-olivacea* e *Phaeoacremonium* spp. Testes *in vitro* realizados por Bleach et al. (2013) com três espécies de "*Cylindrocarpon*", demonstraram que temperaturas inferiores à 50°C foram efetivas para inibir o crescimento dos patógenos.

Fundamentando-se pelos conhecimentos e experiências até hoje relatados sobre o uso de tratamento térmico no controle de patógenos associados às doenças de tronco no mundo, torna-se imprescindível avaliar o efeito do uso desta técnica sobre os principais patógenos e espécies viníferas cultivadas aqui no Brasil.

2.8 Material e Métodos

O projeto será desenvolvido a partir de uma parceria entre a Universidade Federal de Pelotas com a Embrapa Uva e Vinho e o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – *Campus* Bento Gonçalves (IFRS-BG).

O projeto será dividido em quatro experimentos. O primeiro experimento consistirá da avaliação do comportamento de diferentes cultivares de uva e portaenxertos submetidos a diferentes combinações de tempo e temperatura de tratamento térmico. O segundo experimento será realizado para verificar a sanidade de mudas prontas para a comercialização e o efeito do tratamento térmico nestas mudas. O terceiro experimento avaliará diferentes combinações de tempo e temperatura para controlar fungos associados ao declínio da videira *in vitro*. O quarto experimento consistirá da avaliação de diferentes combinações de tratamento térmico obtidas a partir do primeiro e do terceiro experimento no controle de fungos inoculados artificialmente.

2.8.1 Experimento 1 - Avaliação do comportamento de diferentes cultivares de uva submetidas ao tratamento térmico

O objetivo do experimento é avaliar o comportamento de diferentes espécies de videiras quando submetidas ao tratamento térmico, quanto aos aspectos fisiológicos da planta.

Os tratamentos consistirão da combinação de três temperaturas (50°C, 53°C e 55°C) com três intervalos de tempo (30, 45 e 60 minutos), mais o fator com e sem hidratação das estacas antes da realização do tratamento térmico por 30 minutos, totalizando 20 tratamentos, como pode ser observado na tabela 1.

Serão submetidas ao tratamento térmico os portaenxertos Paulsen 1103 (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*), SO4 (*Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*) e IAC 572 (*Vitis tillifolia* x '101-14Mgt') e as cultivares Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*), Bordô (*Vitis labrusca*) e Moscato Embrapa (originária do cruzamento entre as cultivares Couderc 13 x July Muscat, caracterizando-a como uma cultivar híbrida interespecífica).

O material propagativo será oriundo de vinhedos considerados sadios. As estacas que serão utilizadas no experimento serão coletadas e mantidas em câmara fria até a realização dos tratamentos. Todas as estacas utilizadas serão hidratadas durante 24 horas antes da realização dos tratamentos.

As estacas correspondentes aos tratamentos com hidratação antes da realização do tratamento térmico serão colocadas em um tanque contendo água na temperatura de 25°C por 30 minutos enquanto as demais serão mantidas em uma área reservada até a realização do tratamento.

Tabela 1 – Descrição dos tratamentos a serem realizados em estacas de seis cultivares de videira.

Tratamento	Descrição
T1	Testemunha sem hidratação
T2	Testemunha com hidratação por 30 minutos
T3	Hidratação + 50° C por 30 minutos
T4	Sem hidratação + 50° C por 30 minutos
T5	Hidratação + 50° C por 45 minutos
T6	Sem hidratação + 50° C por 45 minutos
T7	Hidratação + 50° C por 60 minutos
T8	Sem hidratação + 50° C por 60 minutos
T9	Hidratação + 53° C por 30 minutos
T10	Sem hidratação + 53° C por 30 minutos
T11	Hidratação + 53° C por 45 minutos
T12	Sem hidratação + 53° C por 45 minutos
T13	Hidratação + 53° C por 60 minutos
T14	Sem hidratação + 53° C por 60 minutos
T15	Hidratação + 55° C por 30 minutos
T16	Sem hidratação + 55° C por 30 minutos
T17	Hidratação + 55° C por 45 minutos
T18	Sem hidratação + 55° C por 45 minutos
T19	Hidratação + 55° C por 60 minutos
T20	Sem hidratação + 55° C por 60 minutos

Após a realização do tratamento térmico todos os tratamentos serão imersos em um tanque contendo água em temperatura ambiente com 2,5% de hipoclorito para finalizar o efeito do tratamento térmico por trinta minutos. Após a realização dos tratamentos, as estacas serão deixadas escorrer na sombra ao ar livre até que não haja mais umidade na superfície das estacas e serão plantadas em canteiro coberto com lona plástica a campo.

Cada tratamento será composto por 20 estacas que serão avaliadas semanalmente quanto à brotação, acompanhando-se a fenologia e o crescimento das brotações e por fim será realizada a avaliação do sistema radicular, contabilizando-se o número de raízes e o comprimento médio.

2.8.2 Experimento 2 - Avaliação da sanidade de mudas comerciais e verificação do efeito de tratamento térmico

Este experimento tem por objetivo verificar a sanidade das mudas de videiras comercializadas e avaliar a influência do tratamento térmico na sanidade de mudas de videira prontas para comercialização. O experimento será dividido em duas etapas.

A primeira etapa consistirá da avaliação do estado sanitário das mudas de videiras. Viveiristas da região da Serra Gaúcha serão os fornecedores das mudas a serem utilizadas no experimento. Cada viveirista irá fornecer 60 mudas de videiras, destas 10 serão destinadas para a avaliação da incidência de patógenos associados ao declínio da videira, por meio de isolamento em laboratório.

Os sintomas internos serão registrados através de fotografias, obtendo-se desta forma um banco de dados com diferentes sintomas que depois serão correlacionados com os fitopatógenos isolados. As fotografias das seções de tronco serão utilizadas para identificar e comparar os diferentes sintomas internos e os fungos isolados correlacionados com os sintomas (WHITE et al. 2011).

A desinfecção das amostras será feita através da imersão da amostra na sequência de soluções: etanol 70%, por 30 segundos, hipoclorito de sódio 3,5% por 2 minutos e novamente em etanol 70% por 30 segundos. Depois da desinfestação, com o auxílio de um bisturi, pequenos fragmentos da região sintomática serão retirados para a inoculação em placas de Petri, com o meio BDA (batata-dextrose-água) comercial. Serão colocados quatro fragmentos em cada placa, com três repetições. As placas serão incubadas em uma câmara BOD, à 25°C, em fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, diariamente, será observado o crescimento o crescimento das colônias (ALMANÇA et al., 2013).

Com o crescimento das colônias de fungos, haverá a repicagem individual de cada patógeno em novas placas de Petri contendo meio BDA para crescimento e desenvolvimento da colônia. A identificação dos fitopatógenos será baseada nas características morfológicas da colônia, (tamanho, forma, cor e velocidade de crescimento) e do esporo do fungo (chave de identificação) de acordo com (ESKALEN et al., 2007; GIMÉNEZ-JAIME et al., 2006).

Havendo necessidade de comprovação da espécie será realizada a identificação por análise molecular através da utilização de PCR (Reação em cadeia de polimerase) para confirmação das espécies. Todos os fitopatógenos isolados serão

armazenados pelo método de Castellani em água destilada esterilizada. A identificação contará com o apoio do pesquisador François Halleen do ARC Infruitec-Nietvoorbij, Stellenbosch, África do Sul.

Na segunda etapa do experimento, as 50 mudas de videiras restantes serão hidratadas por 30 minutos e divididas em dois grupos de 25 plantas, onde um grupo será submetido a tratamento térmico na temperatura de 50°C por 30 minutos e o outro grupo não receberá nenhum tratamento. As mudas serão plantadas em vasos de 5 litros contendo substrato esterilizado e acondicionadas em estufa onde serão avaliadas semanalmente quanto ao desenvolvimento vegetativo.

Para verificar o efeito do tratamento térmico após um ano de crescimento 10 mudas de cada tratamento (com e sem tratamento térmico) serão retiradas dos vasos para averiguar a presença ou não de patógenos, bem como serão feitas avaliações sobre a manifestação de sintomas e sinais na parte aérea (ao longo do período de desenvolvimento) e do sistema radicular quando as mudas forem arrancadas para isolamento. As 15 mudas de videiras restantes serão mantidas por mais um ano para que sejam realizadas as mesmas avaliações. Os isolamentos serão realizados seguindo a metodologia descrita acima.

2.8.3 Experimento 3 - Avaliação de diferentes combinações de tempo e temperatura para inibir o crescimento de fungos associados ao declínio da videira *in vitro*

Neste experimento serão selecionados 3 patógenos associados ao declínio da videira (*Phaeomoniella chlamydospora*, "*Cylindrocarpon*" spp. e *Botryosphaeria dothidea*) previamente isolados a partir de vinhedos com sintomas de declínio na região da Serra Gaúcha e estes serão submetidos a diferentes combinações de tempo e temperatura *in vitro* para determinar a curva de crescimento dos diferentes patógenos em resposta ao tratamento térmico simulado.

Serão testadas combinações de 7 temperaturas variando de 5°C em 5°C, iniciando em 30°C até 60°C, mais a temperatura de 25°C que é a temperatura de crescimento normal dos fungos (tratamento controle), e 7 intervalos de tempo de exposição, variando de 10 em 10 minutos iniciando em 10 até 120 minutos de exposição, totalizando 49 tratamentos.

Para a realização do experimento os 3 fungos isolados selecionados serão repicados e colocados em uma câmara BOD à 25°C para crescimento e desenvolvimento da colônia. Após serão retirados 4 pequenos fragmentos da colônia de cada um dos fungos (4mm) e colocados em microtubos onde serão submetidos aos diferentes tratamentos em um pequeno tanque de tratamento. Quando retirados do tanque os microtubos serão imediatamente colocados em um recipiente contendo água na temperatura ambiente por 5 minutos, para finalizar o processo de aquecimento, seguindo a metodologia adaptada de Gramaje et al, 2010.

Em seguida ao tratamento térmico os pequenos pedaços da colônia serão plaqueados em placas de Petri contendo meio BDA comercial e incubados à 25°C, em fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, com 5 repetições para cada tratamento. A avaliação consistirá na medição do crescimento da colônia com auxílio de paquímetro, pelo período de 4 semanas, onde serão feitas medidas perpendiculares de diâmetro do crescimento da colônia (metodologia adaptada de GRAMAJE et al., 2010). O efeito do tratamento térmico será determinado pela média da porcentagem de crescimento dos isolados comparado com a média do controle.

2.8.4 Experimento 4 – Avaliação do efeito do tratamento térmico sobre fungos associados ao declínio da videira inoculados artificialmente

Neste experimento será avaliado o efeito de diferentes combinações de tratamento térmico no controle de fungos associados ao declínio da videira inoculados artificialmente.

A partir dos resultados dos experimentos 1 e 3, onde ao menos 3 combinações de tempo e temperatura eficientes no controle dos patógenos e não prejudiciais às espécies viníferas serão definidas, propõe-se avaliar o efeito do tratamento térmico na inoculação artificial de patógenos.

Para a realização do experimento serão utilizadas estacas dos mesmos portaenxertos e cultivares utilizados nos experimentos anteriores, que serão inoculadas artificialmente com suspensões conidiais de cada um dos três fungos *Phaeomoniella chlamydospora*, "*Cylindrocarpon*" spp. e *Botryosphaeria dothidea*.

As estacas serão inoculadas imergindo-se em uma suspensão de esporos por aproximadamente 7 a 10 segundos, tempo suficiente para uma uniforme inoculação através do sistema vascular (GRAMAJE et al., 2009a).

2.9 Previsão Orçamentária

2.9.1 - Materiais de Consumo:

Descrição	Un.	Qnt.	Preço unit (R\$)	Custo total (R\$)
Botas de borracha	Un.	1	50,00	50,00
Tesoura de poda	Un.	1	50,00	50,00
Meio BDA (500 g)	Un.	10	200,00	2000,00
Placas de Petri	Un.	5000	0,40	2000,00
Lâminas de bisturi	Un.	50	0,60	30,00
Cabo de bisturí	Un.	3	20,00	60,00
Material de escritório	Un.		500,00	500,00
Material de laboratorio geral	Un.		2000,00	2000,00
Combustível e lubrificantes	Un.		3500,00	3500,00
Etiquetas de identificação	Un.		200,00	200,00
Tinta para impressora	Un.	6	100,00	600,00
Folhas A4	Un.	500	0,30	15,00
Subtotal				11.005,00

Reagentes	Un.	Qnt.	Preço unit (R\$)	Custo total (R\$)
Álcool 96° GL	L	20	3,70	74,00
Hipoclorito de sódio 2,5 %	L	20	5,50	110,00
Subtotal				184,00

2.9.2 - Material Permanente Disponível

Descrição	Un.	Qnt.	Preço un. (R\$)	Custo total (R\$)
Eppendorf 1,5ml	Un.		35,00	35,00
Subtotal				35,00

2.9.3 - Outros serviços

Descrição	Un.	Qnt.	Preço unit (R\$)	Custo total (R\$)
Fotocópias	Un.	200	0,15	30,00
Passagem aérea para congresso	Un.	2	1000,00	2000,00
Diárias nacionais	Un.	20	180,00	3600,00
Manutenção de área experimental	Un.		4500,00	4500,00
Inscrição em eventos científicos	Un.	2	300,00	600,00
Subtotal				10.730,00

2.9.4 CUSTO TOTAL

Descrição	Valor (R\$)
Material de consumo ^a	11.189,00
Material de permanente	35,00
Outros serviços ^b	10.730,00
Imprevistos (10% do ^a e ^b)	2.191,90
Total	24.145,90

2.10 Referências

ABREO, E.; MARTÍNEZ, S.; NAVARRETE, F.; BETTUCCI, L.; LUPO, S. Detección temprana de organismos causantes de las enfermedades del tronco de la vid.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Serie 44 FPTA-INIA, 32p., 2013.

AMIRI, A.; BOMPEIX, G. Control of *Penicillium expansum* with potassium phosphite and heat treatment. **Crop Protection**, v.30, p.222-227, 2011.

AROCA, A.; RAPOSO, R. Pathogenicity of *Phaeoacremonium* species on grapevines. **Journal Phytopathology** v. 15, p. 413-419, 2009;

AROCA, A.; GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; RAPOSO, R. Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of

Phaeoacremonium spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. **European Journal of Plant Pathology**, v.126, p.165-174, 2010.

BAYATI, S.; SHAMS-BAKHSI, M.; MOIENI, A. Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryotherapy and electrotherapy. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v.13, p.443-450, 2011.

BLEACH, C.M.; JONES, E.E.; JASPERS, M.V. Hot water treatment for elimination of *Cylindrocarpus* species from infected grapevines. **Phytopathologia Mediterranea**, v.48, p. 183, 2009.

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

COPES, W. E.; BLYTHE, E. K. Rooting response of azalea cultivars to hot water treatment used for pathogen control. **Hortscience**, v.46, n.1, p.52-56, 2011.

CORREIA, K. C.; CÂMARA, M. P. S.; BARBOSA, M. A. G.; SALES JUNIOR, R.; AGUSTÍ-BRISACH, C.; GRAMAJE, D.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ABAD-CAMPOS, P.; ARMENGOL, J.; MICHEREFF, S. J. Fungal species associated with trunk diseases of table grapes in Northeastern Brazil. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 52, n.2, p.380–387. 2013.

DÍAZ, G. A.; ESTERIO, M.; AUGER, J. Effects of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine rootstocks. **Ciencia Investigación Agraria** v. 36, n. 3, p. 381-390, 2009;

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**, v. 29, n. 3, p. 322- 324, 2004.

GIOVANNINI, E.; MANFROI, V. – **Viticultura e Enologia: Elaboração de grandes vinhos nos terroirs brasileiros**. Bento Gonçalves: IFRS, 2009;

GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J.; SALAZAR, D.; LÓPEZ-CÓRTES, 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.; AROCA, A.; RAPOSO, R.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Evaluation of fungicides to control Petri disease pathogens in the grapevine propagation process. **Crop Protection**, v.28, p.1091-1097, 2009b.

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

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

GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J. Effects of hot-water treatment, post-hot-water treatment colling 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.

JAFARPOUR, M.; FATEMI, S. Post-harvest treatments on shelf life of sweet orange 'Valencia'. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.6, n.11, p.2117-2124, 2012.

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

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Disponível em:

[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/lspa_201403.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201403.pdf). Acesso em 25 de maio de 2014.

IBRAVIN – Instituto Brasileiro do Vinho. Principais regiões produtoras. Disponível em: <http://www.ibravin.com.br/regioesprodutoras.php>. Acesso em 29 de maio de 2014;

KOTZE, C.; VAN NIEKERK, J.; MOSTERT, L.; HALLEEN, F.; FOURIE, P. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v.50, p.s247-s263, 2011.

MELLO, L. M. R. – Viticultura Brasileira: panorama 2010. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2011. Disponível em:

<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/prodvit2010.pdf>. Acesso em 29 de maio de 2014;

MERVAT, M. M. E. F.; ASHOUB, A. Utility of thermotherapy and meristem tip for freeing sweet potato from viral infection. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.3, n.1, p.153-159, 2009.

MUNDY, D. *Phaeoacremonium* spp. in New Zealand vineyards. **Plant & Food Research** 8, January 2010;

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

MUTAWILA, C.; FOURIE, P. H.; HALLEEN, F.; MOSTERT, L. Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. **Phytopathologia Mediterranea**, v.50, p.264-276, 2011.

NEWSOME, J. Grapevine Trunk Disease: A review. 21 p., 2012.

PITT, W. M.; HUANG, R.; STEEL, C. C.; SAVOCCHIA, S. Identification, distribution and current taxonomy of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine decline in New South Wales and South Australia. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.16, n.1, p.258-271, 2010.

ROLSHAUSEN, P. E.; ÚRBEZ-TORRES, J. R.; ROONEY-LATHAM, S.; ESKALEN, A.; SMITH, R. J.; GUBLER, W. D. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. **American Journal of Enology and Viticulture** v.61, p.113-119, 2010;

SANTOS, R.F. dos; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B.; HECKLER, L.; FINGER, G.; MACIEL, C.G.; HARAKAWA, R.; GARRIDO, L.R. First report of *Ilyonectria macrodidyma* associated with black foot disease of grapevine in Brazil. **Plant Disease**, v.98, n.1, p.156, 2013a.

SANTOS, R.F. dos; BLUME, E.; SILVA, G.B.P. da; LAZAROTTO, M.; SCHEEREN, L.E.; ZINI, P.B.; BASTOS, B.O.; REGO, C. First report of *Ilyonectria robusta* associated with black foot disease of grapevine in southern Brazil. **Plant Disease**, v. 98, n. 6, p. 845-1, 2013b.

SANTOS, R.F. dos; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B.; STECKLING, S.M.; BURTET, G.W.; HARAKAWA, R.; GARRIDO, L.R.; REINIGER, L.R.S. First Report of "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* Associated with Black Foot Disease of Grapevine in Brazil. **Plant Disease**, v.98, n.4, p.567, 2014.

SERRA, S.; MANNONI, M.A.; LIGIOS, V.; DEMONTIS, A. Effect of combined hot water and cyproconazole on the eradication of *Phaeomoniella chlamydospora* from grapevine planting material. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 48, p. 185-186, 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.61-76, 2011.

SURICO, G. Towards a redefinition of the diseases within the esca complex of grapevine. **Phytopathologia Mediterranea**, v.48, p.05-10, 2009.

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

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; PEDUTO, F.; STRIEGLER, R. K.; URREO-ROMERO, K. E.; RUPE, J. C.; CARTWRIGHT, R. D.; GUBLER, W. D. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. **Fungal Diversity**, v.52, n.1, p.169-189, 2011.

VAN NIEKERK, J. M.; BESTER, W.; HALLEEN, F.; CROUS, P. W.; FOURIE, P. H. The distribution and symptomatology of grapevine trunk disease pathogens are influenced by climate. **Phytopathologia Mediterranea**, v.50, p.98-111, 2011;

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.; MAY, P.; BOSSINGER, G. Variations in phytosanitary and other management practices in Australian grapevine nurseries. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 52, n.2, p. 369-379, 2013.

WHITE, C. L.; HALLEEN, F.; MOSTERT, L. Symptoms and fungi associated with esca in South African vineyards. **Phytopathologia Mediterranea**, v.50, p. 236-246, 2011;

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

3 Relatório de Campo

As atividades aqui relatadas foram desenvolvidas a partir do segundo semestre de 2014 até o segundo semestre de 2016, nas dependências da Embrapa Uva e Vinho de Bento Gonçalves (com especial ajuda do analista Daniel Santos Grohs) e do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – *Campus* Bento Gonçalves. Os artigos desenvolvidos divergem em alguns pontos dos experimentos propostos no projeto devido a dificuldades encontradas durante o desenvolvimento das atividades, como por exemplo, a adaptação de metodologias, a obtenção de material propagativo e isolados fúngicos e a caracterização de isolados obtidos nos experimentos.

O experimento 1 no projeto, foi desenvolvido em 2014 nas dependências da Embrapa Uva e Vinho, seguindo exatamente o que foi planejado no projeto, apenas utilizando um número de repetições menor. Houve um problema com a avaliação do sistema radicular das estacas plantadas a campo, pois após o tratamento de água quente as estacas que foram deixadas esfriar em água por 30 minutos e colocadas para secar ao ambiente, foram imediatamente plantadas a campo e isso refletiu em um baixo valor de emissão de raiz, possivelmente devido ao tratamento de água quente aplicado. Essa resposta negativa fez com que procurássemos ajuda de especialistas como os pesquisadores Dr. Henrique Pessoa dos Santos, da Embrapa Uva e Vinho e o Dr. Antonio Odair Santos, do Instituto Agronômico de Campinas, Jundiaí (SP) para elaborar uma espécie de equipamento que pudesse medir a temperatura no interior da estaca durante a aplicação do tratamento de água quente. No entanto, apesar das tentativas, este ensaio não prosseguiu. Essa dificuldade, porém, não impediu a elaboração do artigo 2 presente na tese. Para confirmar os resultados obtidos em 2014 a campo, optou-se por refazer o experimento em casa de vegetação em 2015, no entanto, somente obteve-se material de duas cultivares (Bordô e Paulsen 1103) para a realização do experimento, cujos dados não estão presentes na tese, mas serão trabalhados para uma outra publicação.

O experimento 2 foi realizado de acordo com o proposto no projeto e a grande dificuldade encontrada foi na identificação dos isolados. O grande número de isolados gerados e a falta de experiência na identificação morfológica dos mesmos, fez com o trabalho fosse realizado em maior tempo que o previsto no projeto, além das

dificuldades de metodologia e de recursos, a identificação molecular dos isolados foi prorrogada e no momento os isolados estão depositados na Coleção de Microrganismos do Laboratório de Fitopatologia do IFRS/*Campus* Bento Gonçalves, e serão identificados conforme os recursos disponíveis. Este experimento gerou o artigo 1 da tese, mas ainda existem dados referentes ao efeito do tratamento de água quente na brotação e fenologia das mudas, aos sintomas externos e internos, e às características das mudas avaliadas que não foram colocados na tese e serão trabalhados em outra publicação.

O experimento 3 foi realizado com os três isolados patogênicos previstos no projeto, mais um isolado de *Fusarium* spp. da coleção de Microrganismos do Lab. de Fitopatologia do IFRS/BG e além destes, através de uma parceria entre o Prof. Marcus André Kurtz Almança (IFRS-BG) e o Prof. Sami Jorge Michereff da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife, foram cedidos mais nove isolados patogênicos que foram utilizados no experimento. Deste experimento resultou o artigo 3 presente na tese.

O experimento 4 proposto no projeto corresponde ao artigo 4 na tese e não foi executado conforme previsto, em virtude do maior tempo despendido na identificação dos isolados oriundos do experimento 2 e no aumento do número de isolados utilizados no experimento 3. Assim, o experimento foi realizado apenas com um isolado, tendo os tratamentos determinados a partir dos resultados obtidos no experimento 1 e 3 e com base nas referências bibliográficas do assunto. O método de inoculação também foi modificado, devido à facilidade de execução do método adotado e da rapidez para obtenção de resultados.

Ademais aos quatro artigos apresentados na tese, mais artigos e publicações serão elaborados com os dados que não constam nos artigos. Os resultados dos experimentos também foram divulgados em forma de resumos e apresentações em eventos e reuniões técnicas da área.

Artigos desenvolvidos

4 Artigo 1

Levantamento de fungos associados a morte de plantas em mudas comerciais de videira com e sem tratamento de água quente

Sabrina Lerin¹, Marcus André Kurtz Almança², Júlio César Tonello², Maíke Rosa de Oliveira², Daniel Santos Grohs³, Paulo Mello-Farias¹ Marcos Botton³

⁽¹⁾Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário Capão do Leão, s/n, CEP: 96900-010. Pelotas, RS. sabrinalerin@gmail.com, mello.farias@ufpel.edu.br; ⁽²⁾Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Av. Osvaldo Aranha 540, CEP: 95700-206. Bento Gonçalves, RS. marcus.almanca@bento.ifrs.edu.br, julio.c.tonello@gmail.com, maikerosaa@gmail.com; ⁽³⁾Embrapa Uva e Vinho, Rua Livramento 515, CEP: 95701-008. Bento Gonçalves, RS. daniel.grohs@embrapa.br, marcos.botton@embrapa.br.

Resumo

A presença de patógenos associados a doenças de tronco no material propagativo de videira é reconhecida como uma das principais causas do vigor reduzido, problemas de pegamento no plantio e consequente morte de plantas. O tratamento de água quente (TAQ) a 50°C por 30 minutos é uma alternativa para o controle de fungos causadores de doenças de tronco na videira. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de fungos associados a doenças de tronco em mudas comerciais de videira e verificar o efeito do tratamento com água quente a 50°C por 30 minutos na incidência desses fungos. Foram obtidas 60 mudas de videira prontas para comercialização, das cultivares Bordô e Chardonnay enxertadas sobre o portaenxerto Paulsen 1103, em julho de 2014, em três diferentes viveiros localizados no Estado do Rio Grande do Sul. As mudas foram avaliadas por três anos quanto à incidência de fungos em quatro pontos de isolamento: colo, portaenxerto, ponto de enxertia e copa. Na quase totalidade das mudas avaliadas foram encontrados fungos causadores de doenças de tronco (*Botryosphaeria* spp., "*Cylindrocarpon*" spp., *Phaeoacremonium* spp., e *Phaeomoniella* spp.). *Phaeoacremonium* spp. foi o gênero de maior incidência em todas as mudas avaliadas de ambas as cultivares e viveiros avaliados. O tratamento de água quente reduziu a incidência de patógenos causadores de doenças de tronco.

Termos para indexação: doenças de tronco da videira, tratamento térmico, viveiro.

Survey of fungi associated with dieback of plants on commercial vine shoots with and without hot water treatment

Abstract

The presence of pathogens associated with trunk diseases in the grapevine propagation material is recognized as one of the main causes of reduced vigor, glue problems in planting and consequent dieback of plants. The treatment with hot water (HWT) at 50°C for 30 minutes is an alternative to control of grapevine trunk pathogens. The aim of this work was to verify the presence of fungi associated with trunk diseases

in commercial vine seedlings and to verify the effect of the treatment with hot water at 50°C for 30 minutes on the incidence of this fungi. Sixty seedlings of vines ready for commercialization of the cultivars Bordô and Chardonnay, grafted onto Paulsen 1103 rootstock, collected in July 2014, in three different nurseries located in the State of Rio Grande do Sul. The seedlings were evaluated for three years in terms of the incidence of fungi in four points of isolation: Lap, rootstock, grafting point and crown. Almost all the evaluated seedlings were found to cause fungal diseases of the stem (*Botryosphaeria* spp., "*Cylindrocarpon*" spp., *Phaeoacremonium* spp., and *Phaeomoniella* spp.). *Phaeoacremonium* spp. was the genus of highest incidence in all evaluated seedlings of both cultivars and nurseries evaluated. The hot water treatment reduced the incidence of grapevine trunk pathogens.

Index-terms: grapevine trunk diseases, heat treatment, nursery.

Introdução

Nas últimas décadas tem se observado a crescente incidência de danos causados por doenças fúngicas que afetam a parte lenhosa da videira (GARCÍA-JIMÉNEZ et al., (2010) apresentando sintomas em plantas jovens e/ou falhas no estabelecimento de mudas em vinhedos para produção de uva passa, uva de mesa, uva para vinho e processamento industrial (GRAMAJE; ARMENGOL, 2011). Em todas as regiões produtoras do mundo, um dos principais fatores que restringem a produtividade e a vida útil das plantas de videira são as doenças de tronco, consideradas como as mais destrutivas (BERTSCH et al., 2013). Hofstetter et al. (2012) relataram que somente em 2012, os custos com o replantio de mudas de videira no mundo foram estimados em 1,5 bilhões de dólares por ano.

O termo 'doenças de tronco da videira' abrange diferentes patógenos que infectam raízes, tronco e ramos da videira, tanto em plantas jovens como adultas, sendo cada vez mais frequente no material de propagação (AGUSTÍ-BRISACH et al., 2013).

Ainda que variáveis, os sintomas frequentemente consistem em clorose e necrose das folhas, redução do crescimento das plantas e brotações, da produção e, em casos mais graves, acarretam a morte de plantas de videiras (GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 2010; NEWSOME, 2012).

Dentre as doenças de tronco encontradas mundialmente, a doença de Esca é causada por fungos basidiomicetos como *Fomitiporia mediterranea* e também por fungos como *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp., sendo observada em videiras adultas (BERTSCH et al., 2013). No lenho pode-se observar

podridão seca e com aspecto esponjoso “macio” no centro do tronco e nos ramos, e presença de pontos ou estrias necróticas (GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 2010; MUNDY; MANNING, 2010).

A doença de Petri está relacionada a videiras jovens ou mudas, e tem como agentes causais os fungos do gênero *Phaeoacremonium* spp., *Phaeomoniella chlamydospora* e *Cadophora luteo-olivacea* (AGUSTÍ-BRISACH et al., 2013). Pode causar atraso no desenvolvimento, retardo ou inibição da brotação, diminuição do vigor, encurtamento de entrenós, folhas de tamanho reduzido e cloróticas, levando à morte da planta (GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 2010; GRAMAJE; ARMENGOL, 2011). Estes fungos colonizam o xilema, podendo-se observar pequenas pontuações ou estrias necróticas no lenho, condizendo com os vasos afetados, que podem ser visualizadas na base do portaenxerto, com formações de exsudação gomosa (AGUSTÍ-BRISACH et al., 2013).

A podridão descendente ou declínio de *Botryosphaeriaceae* é causada por várias espécies desta família (BERTSCH et al., 2013). Externamente, os sintomas podem ser confundidos com a doença de Esca, por causa da presença de necrose internerval na folha. Internamente, os sintomas são necroses setoriais de coloração marrom escuro e consistência firme (GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 2010; MUNDY; MANNING, 2010).

A doença do Pé-Preto está associada a espécies pertencentes aos gêneros *Campylocarpon*, “*Cylindrocarpon*”, *Cylindrocladiella*, *Dactylonectria* e *Ilyonectria* (AGUSTÍ-BRISACH et al., 2013; HALLEEN et al., 2006; LOMBARD et al., 2014). As plantas infectadas apresentam desenvolvimento radicular anormal, com lesões escuras, necróticas e aspecto deprimido. Também pode-se observar colorações escuras no lenho e necrose, que iniciam da base. A parte aérea, apresenta-se fraca, com folhas cloróticas e com aspecto de murcha (GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 2010).

Os agentes causais das doenças de Petri e Pé-Preto são habitantes comuns no solo, podendo produzir estruturas de resistência, como clamidósporos, o que lhes permite sobreviverem durante muito tempo na ausência de hospedeiros. No caso da podridão descendente, a dispersão ocorre pelo transporte de esporos através do vento e da água da chuva (ÚRBEZ-TORRES et al., 2010). Além disso, os fungos causadores da doença de Petri e de podridão descendente, podem também penetrar nas plantas através dos ferimentos da poda (AGUSTÍ-BRISACH et al., 2013). É conhecida a importância do material vegetativo utilizado na propagação de plantas

pelos viveiros como uma das principais formas de propagação e disseminação destes patógenos (GRAMAJE; ARMENGOL, 2011).

No mundo inteiro, muitos estudos foram realizados com a finalidade de verificar a presença de fungos causadores de doenças de tronco da videira em viveiros, visto que na produção de mudas, vários podem ser os pontos potenciais de infecção durante as diferentes fases do processo de produção da muda, como por exemplo: a hidratação das estacas, a retirada das gemas, o enxerto, o processo de indução de calo basal nas estacas recém enxertadas e o enraizamento no campo (AGUSTÍ-BRISACH et al., 2013).

Estudos demonstraram que uma baixa proteção sanitária no processo de produção pode ter efeitos negativos na qualidade final das mudas obtidas (AGUSTÍ-BRISACH et al., 2013). Neste contexto, é fundamental o desenvolvimento de práticas efetivas no manejo dos viveiros, que ajudem a minimizar a infecção por estes fungos. Apesar dos esforços, não existem tecnologias capazes de erradicar completamente estas doenças, contudo o interesse está voltado para manter níveis baixos de infecção (AGUSTÍ-BRISACH et al., 2013).

O tratamento com água quente (TAQ) tem sido reportado como um dos métodos mais promissores no controle de doenças endógenas no material propagativo de patógenos causadores de doenças de tronco em videira (FOURIE, HALLEEN, 2004; GRAMAJE, ARMENGOL, 2011).

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 uma referência 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).

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a presença de fungos associados a doenças de tronco em mudas comerciais de videira de três viveiros comerciais de diferentes locais e verificar o efeito do tratamento com água quente a 50°C por 30 minutos na incidência desses patógenos.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no período de julho de 2014 a dezembro de 2016. Em 2014, foram coletadas 60 mudas de videira prontas para comercialização, de duas cultivares (Bordô e Chardonnay) enxertadas sobre o portaenxerto 'Paulsen 1103', de três viveiros comerciais do Rio Grande do Sul, localizados nos municípios de Bento Gonçalves, Garibaldi e Vacaria, no ano de 2014. Do viveiro de Vacaria foram coletadas mudas de 'Bordô' e 'Chardonnay', em Bento Gonçalves mudas de 'Chardonnay' e em Garibaldi mudas de 'Bordô' de acordo com a disponibilidade dos viveiros.

Das 60 mudas coletadas em cada viveiro de cada cultivar, 10 foram avaliadas em 2014. As 50 mudas restantes foram divididas em dois grupos (25 mudas cada). Um grupo recebeu tratamento com água quente (TAQ) a 50°C por 30 minutos e o outro grupo não recebeu nenhum tratamento (testemunha). Estas mudas foram plantadas, em vasos de cinco litros contendo substrato TN Gold® e Turfa na proporção 2:1, sendo acondicionadas em casa de vegetação. Em 2015, 15 mudas de cada um dos dois grupos foram avaliadas e no ano seguinte, as 10 mudas restantes foram avaliadas quanto à presença de fungos causadores de doenças de tronco.

As mudas foram avaliadas no Laboratório de Fitopatologia - IFRS/BG após lavagem superficial e cortadas com auxílio de tesoura de poda em quatro partes: copa, ponto de enxertia, portaenxerto e colo da muda, constituindo os pontos de isolamento.

Amostras de aproximadamente 1 cm foram retiradas de cada um dos pontos de isolamento passando por assepsia por 30 segundos em álcool 70%, 2 minutos em hipoclorito de sódio 3,5% e 30 segundos em álcool 70% seguido de flambagem (ALMANÇA et al., 2013). A partir destas amostras foram retirados 12 fragmentos de lenho contendo ou não sintomas de doença. Esses fragmentos foram acondicionados em três placas de Petri (quatro fragmentos por placa) contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) comercial, adicionado de antibiótico e incubadas a 25°C ± 1°C em BOD com fotoperíodo de 12 horas por 30 dias para crescimento dos fungos.

Após o crescimento, os fungos foram repicados para placas individuais contendo meio BDA, para posterior identificação morfológica. A partir da observação da forma, tamanho e coloração da colônia, e do formato e tamanho do esporo realizou-se a identificação morfológica dos fungos em nível de gênero (CABRAL et al., 2012;

CROUS; GAMS, 2000; DISSANAYAKE et al., 2014; GRAMAJE et al., 2015; JAYAWARDENA et al., 2014; PITT et al., 2010; WANG et al., 2016).

Os seguintes parâmetros foram avaliados a partir dos fragmentos isolados: incidência dos quatro principais gêneros de patógenos associados a doenças de tronco de videira de ocorrência no Brasil (*Botryosphaeria* spp., “*Cylindrocarpon*” spp., *Phaeoacremonium* spp. e *Phaeomoniella chlamydospora*) por viveiro, cultivar, por ponto de isolamento e por ano, com e sem TAQ nas mudas. Através da tabulação dos dados, também se obteve o percentual de mudas de videiras infectadas com Doença de Petri, Pé-Preto e Podridão Descendente por cultivar e por ano das mudas com e sem TAQ. Os dados foram tabulados utilizando o software Excel.

Resultados e Discussão

Em 2014, para as mudas de ‘Chardonnay’ do viveiro de Vacaria observa-se a incidência de *Phaeoacremonium* spp. no ponto de enxertia (30%) e no colo (40%). Os resultados obtidos, corroboram com o levantamento realizado por Garrido et al. (2004) em plantas de videira que apresentavam sintomas de declínio e morte de plantas, que relatam a presença de *Phaeoacremonium* spp. principalmente em cultivares americanas, como a ‘Bordô’. Houve incidência de *Phaeomoniella* spp. somente no colo (10%). Espécies de “*Cylindrocarpon*” spp. foram encontradas na copa, no ponto de enxertia e no colo, enquanto que *Botryosphaeria* spp. foi encontrada somente na copa (Tabela 1).

Observa-se que a incidência de *Botryosphaeria* spp. foi maior em mudas que receberam TAQ nos anos de 2015 e 2016 no ponto de enxertia e no portaenxerto. Já a incidência de “*Cylindrocarpon*” spp. reduziu ao longo dos anos em todos os pontos de isolamento (Tabela 1).

Em 2015, houve redução do percentual de isolamento de *Phaeoacremonium* spp. em mudas tratadas com TAQ no portaenxerto e no colo. Quanto a *Phaeomoniella* spp. houve redução do percentual de isolamento no ponto de enxertia, no portaenxerto e no colo. Rusin et al. (2015) em levantamento feito com plantas de videira com sintomas de declínio, relataram que das 51 plantas avaliadas, em 36 havia a presença de *Phaeomoniella chlamydospora*.

Tabela 1. Percentual da presença de fungos isolados por ponto de isolamento em mudas de Chardonnay, viveiro de Vacaria.

Doença	Gênero fúngico	Frequência de isolados fúngicos (%)																			
		Copa				Ponto de enxertia				Portaenxerto				Colo							
		2014	2015		2016		2014	2015		2016		2014	2015		2016		2014	2015		2016	
			Test.	TAQ	Test.	TAQ		Test.	TAQ	Test.	TAQ		Test.	TAQ	Test.	TAQ		Test.	TAQ	Test.	TAQ
Doença de Petri	<i>Phaeoacremonium</i> spp.	-	-	-	-	-	30,0	53,3	53,3	50,0	50,0	-	13,3	6,7	20,0		40,0	80,0	20,0	50,0	60,0
	<i>Phaeomoniella</i> spp.	-	-	-	10,0	-	-	26,7	6,7	10,0	20,0	-	26,7	20,0	40,0	40,0	10,0	20,0	6,7	60,0	30,0
Pé-Preto	<i>Cylindrocarpon</i> spp.	20,0	-	-	-	-	30,0	33,3	-	20,0	-	-	-	-	-	-	20,0	20,0	-	-	-
Podridão Descendente	<i>Botryosphaeria</i> spp.	10,0	-	-	-	-	-	53,3	66,7	50,0	50,0	-	-	6,7	-	10,0	-	13,3	6,7	-	-
	Sem crescimento fúngico	31,6	100	98,9	97,5	100	2,8	25,8	46,7	6,1	30,7	50,0	90,6	95,0	85,0	87,0	34,3	43,8	85,0	57,7	44,2
	Saprófitos e outros*	-	-	6,7	10,0	-	20,0	53,4	13,3	30,0	-	10,0	-	-	-	-	10,0	6,7	6,7	10,0	30,0

Test.: Testemunha sem TAQ; TAQ: 50°C - 30 minutos; *: fungos como *Penicillium* spp.; *Verticillium* spp.; *Phomopsis* spp.; *Pestalotiopsis* spp.; *Trichoderma* spp.

O percentual de fragmentos sem crescimento fúngico aumentou ao longo dos três anos de avaliação nos quatro pontos de isolamento avaliados (Tabela 1). Esses resultados, corroboram com o trabalho conduzido na Espanha, por Crespo (2015) que avaliou o percentual de crescimento fúngico em mudas de um ano da cultivar Tintonera enxertada sobre Ritcher 110, observando que as mudas que receberam tratamento de água quente a 50 ou 53°C por 30 minutos apresentaram redução deste percentual em relação às mudas que não receberam nenhum tratamento quando o ponto avaliado se tratava do colo, ou da base do portaenxerto, entretanto, a redução foi menor quando avaliado o ponto de enxertia.

Tabela 2. Percentual da presença de fungos isolados por ponto de isolamento em mudas de Chardonnay, viveiro de Bento Gonçalves.

Doença	Gênero fúngico	Frequência de isolados fúngicos (%)																			
		Copa				Ponto de enxertia				Portaenxerto				Colo							
		2014	2015		2016		2014	2015		2016		2014	2015		2016		2014	2015		2016	
			Test.	TAQ	Test.	TAQ		Test.	TAQ	Test.	TAQ		Test.	TAQ	Test.	TAQ		Test.	TAQ	Test.	TAQ
Doença de Petri	<i>Phaeoacremonium</i> spp.	10,0	6,7	-	-	-	100,0	73,3	86,7	70,0	80,0	30,0	13,3	-	-	-	90,0	66,7	26,7	30,0	20,0
	<i>Phaeomoniella</i> spp.	10,0	-	-	-	-	30,0	13,3	6,7	-	10,0	10,0	40,0	-	10,0	10,0	60,0	20,0	20,0	40,0	10,0
Pé-Preto	<i>Cylindrocarpon</i> spp.	10,0	-	-	-	-	50,0	6,7	-	-	10,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Podridão Descendente	<i>Botryosphaeria</i> spp.	-	6,7	6,7	-	10,0	30,0	20,0	20,0	10,0	-	10,0	20,0	6,7	-	-	-	-	-	-	-
	Sem crescimento fúngico	56,3	96,1	99,5	100	98,4	1,1	49,4	35,8	68,1	49,4	46,5	77,2	98,9	95,0	96,3	7,0	61,1	84,4	65,0	85,0
	Saprófitos e outros*	-	6,7	-	-	-	50,0	46,7	6,7	-	-	20,0	13,3	6,7	-	-	20,0	6,7	33,3	-	-

Test.: Testemunha sem TAQ; TAQ: 50°C - 30 minutos; *: fungos como *Penicillium* spp.; *Verticillium* spp.; *Phomopsis* spp.; *Pestalotiopsis* spp.; *Trichoderma* spp.

Para as mudas de 'Chardonnay' provenientes do viveiro de Bento Gonçalves, os maiores valores de incidência corresponderam a espécies do gênero *Phaeoacremonium*. Este gênero foi encontrado nos quatro pontos de isolamento, em 100% das amostras do ponto de enxertia e em 90% das amostras do colo (Tabela 2).

Pode-se observar a presença dos quatro principais gêneros associados a doenças de tronco na videira em 2014, no ponto de enxertia na 'Chardonnay' de Bento Gonçalves: *Botryosphaeria* spp. (30%), "*Cylindrocarpon*" spp. (50%), *Phaeoacremonium* spp. (100%) e *Phaeomoniella* spp. (30%). Observa-se em 2015, que nas mudas que receberam TAQ, houve redução da incidência de *Phaeoacremonium* spp. nos pontos de isolamento: colo, portaenxerto. Para *Phaeomoniella* spp. houve redução de 40% no portaenxerto em 2015 (Tabela 2).

Salienta-se a redução de 30% na incidência de *Phaeomoniella* spp. no colo e a redução de 10% de *Phaeoacremonium* spp. no mesmo ponto de isolamento nas mudas de 'Chardonnay' de Bento Gonçalves que receberam tratamento de água quente a 50°C por 30 minutos (Tabela 2).

Tabela 3. Percentual da presença de fungos isolados por ponto de isolamento em mudas de Bordô, viveiro de Vacaria.

Doença	Gênero fúngico	Frequência de isolados fúngicos (%)																			
		Copa				Ponto de enxertia				Portaenxerto				Colo							
		2014	2015		2016		2014	2015		2016		2014	2015		2016		2014	2015		2016	
			Test.	TAQ	Test.	TAQ		Test.	TAQ	Test.	TAQ		Test.	TAQ	Test.	TAQ		Test.	TAQ	Test.	TAQ
Doença de Petri	<i>Phaeoacremonium</i> spp.	-	-	13,3	-	-	30,0	86,7	80,0	50,0	30,0	10,0	6,7	13,3	-	-	60,0	80,0	80,0	50,0	60,0
	<i>Phaeomoniella</i> spp.	-	-	-	-	-	10,0	20,0	20,0	60,0	30,0	30,0	13,3	-	10,0	10,0	20,0	13,3	13,3	10,0	-
Pé-Preto	<i>Cylindrocarpon</i> spp.	-	-	-	-	-	10,0	-	13,3	-	-	-	6,7	6,7	-	-	-	6,7	13,3	-	-
Podridão Descendente	<i>Botryosphaeria</i> spp.	-	-	-	-	-	20,0	13,3	33,3	-	-	10,0	-	-	-	-	-	-	-	-	10,0
	Sem crescimento fúngico	100	96,1	98,9	100	100	10,5	26,9	25,4	72,5	87,5	35,0	89,0	95,6	98,8	97,4	25,3	60,0	48,9	77,5	59,5
	Saprófitos e outros*	-	26,7	-	-	-	30,0	26,6	40,0	-	-	-	26,6	-	-	-	10,0	40,0	13,3	-	10,0

Test.: Testemunha sem TAQ; TAQ: 50°C - 30 minutos; *: fungos como *Penicillium* spp.; *Verticillium* spp.; *Phomopsis* spp.; *Pestalotiopsis* spp.; *Trichoderma* spp.

Observa-se nas mudas de 'Bordô' provenientes de Vacaria, que mesmo nas mudas que receberam o TAQ, a incidência de *Phaeoacremonium* spp. nos pontos de isolamento colo e ponto de enxertia foi alta, com valores iguais ou superiores a 80% em 2015. Nas mudas avaliadas em 2016, as mudas que receberam TAQ, apresentaram redução da incidência de *Phaeoacremonium* spp. e *Phaeomoniella* spp. no ponto de enxertia (Tabela 3).

Tabela 4. Percentual da presença de fungos isolados por ponto de isolamento em mudas de Bordô, viveiro de Garibaldi.

Doença	Gênero fúngico	Frequência de isolados fúngicos (%)																	
		Copa						Ponto de enxertia						Portaenxerto					
		2014		2015		2016		2014		2015		2016		2014		2015		2016	
		Test.	TAQ	Test.	TAQ	Test.	TAQ	Test.	TAQ	Test.	TAQ	Test.	TAQ	Test.	TAQ	Test.	TAQ	Test.	TAQ
Doença de Petri	<i>Phaeoacremonium</i> spp.	-	-	6,7	-	-	-	50,0	53,3	53,3	60,0	30,0	10,0	20,0	33,3	-	-	80,0	66,7
	<i>Phaeomoniella</i> spp.	-	-	6,7	-	-	-	20,0	13,3	6,7	-	-	30,0	20,0	20,0	10,0	-	10,0	20,0
Pé-Preto	<i>Cylindrocarpon</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	6,7	-	-	-	10,0	-	-	-	-	70,0	6,7
Podridão Descendente	<i>Botryosphaeria</i> spp.	10,0	-	-	-	-	-	30,0	40,0	73,3	10,0	20,0	10,0	6,7	20,0	-	-	10,0	13,3
	Sem crescimento fúngico	33,3	100	96,7	100	100	24,5	58,9	33,3	72,2	79,5	29,7	82,8	86,1	98,8	100	11,5	43,9	40,5
	Saprófitos e outros*	-	-	-	-	-	30,0	46,7	53,3	-	-	-	13,3	-	-	-	100	33,3	26,7

Test.: Testemunha sem TAQ; TAQ: 50°C - 30 minutos; *: fungos como *Penicillium* spp.; *Verticillium* spp.; *Phomopsis* spp.; *Pestalotiopsis* spp.; *Trichoderma* spp.

No viveiro de Garibaldi, a incidência na região do colo de “*Cylindrocarpon*” spp. (70%) foi alta em mudas de ‘Bordô’ (Tabela 4). Isso pode ser explicado pela facilidade de contaminação quando as estacas são plantadas a campo pelos viveiristas, visto que patógenos causadores de Pé-Preto raramente ocorrem em material propagativo antes do enraizamento a campo (FOURIE; HALLEEN, 2002; HALLEEN et al., 2003).

Nas mudas de ‘Bordô’ provenientes do viveiro de Garibaldi, também se pode observar altos valores de incidência de *Phaeoacremonium* spp. mesmo nas mudas que foram tratadas a 50°C – 30 minutos, tanto em 2015 como em 2016. Destaca-se também nas mudas que receberam TAQ em 2015, a alta incidência de *Botryosphaeria* spp. (73,3%) no ponto de enxertia (Tabela 4).

Para as mudas da cultivar Bordô do viveiro de Garibaldi, destaca-se o aumento de 30% na incidência de *Phaeoacremonium* spp. no ponto de isolamento colo, e sua redução em 30% no ponto de enxertia (Tabela 9). Observa-se também que nas mudas que receberam TAQ a incidência de *Phaeomoniella* spp. foi zerada no ponto de isolamento colo (Tabela 4).

Observa-se a variação do percentual de mudas das cultivares ‘Chardonnay’ e ‘Bordô’ infectadas com Doença de Petri, Pé-Preto e Podridão Descendente ao longo dos três anos (Tabela 5). Quanto ao Pé-Preto, em 2014, 50% das mudas de ‘Chardonnay’ e 40% das mudas de ‘Bordô’ estavam infectadas com a doença. Em 2015, o percentual de mudas infectadas reduziu, e em 2016 zerou.

Tabela 5. Percentual (%) de mudas de videiras infectadas com fungos causadores de doenças de tronco da videira.

Cultivares	Pé-Preto				Podridão Descendente				Doença de Petri			
	2014	2015		2016	2014	2015		2016	2014	2015		2016
		Test.	TAQ			Test.	TAQ			Test.	TAQ	
Chardonnay	50,0	23,3	-	-	20,0	46,7	53,3	25,0	75,0	90,0	86,7	85,0
Bordô	40,0	10,0	33,3	-	35,0	36,7	53,3	5,0	95,0	100,0	96,7	80,0
Total	45,0	16,6	16,6	-	27,5	41,7	53,3	15,0	85,0	95,0	91,7	85,0

Test.: testemunha sem TAQ; TAQ: Tratamento com água quente a 50°C por 30 minutos.

Quando a Podridão Descendente, 20% das mudas de ‘Chardonnay’ e 35% das mudas de ‘Bordô’ estavam infectadas em 2014, sendo que este percentual aumentou em 2015 e 2016, independentemente da aplicação do TAQ nas mudas (Tabela 5).

O percentual de mudas infectadas com Doença de Petri foi o mais para as duas cultivares, nos três anos de avaliação. Em 2014, 75% e 95% das mudas de ‘Chardonnay’ e ‘Bordô’, respectivamente, estavam infectadas com a doença. Em 2015 e em 2016, o percentual de mudas infectadas, das duas cultivares aumentou, mesmo nas mudas que receberam TAQ (Tabela 5).

Os resultados para as mudas de ‘Bordô’ dos dois viveiros, corroboram com o levantamento feito por Grohs et al. (2015) a partir de mudas de ‘Bôrdô’ (*Vitis labrusca*) enxertada sobre ‘Paulsen 1103’, coletadas em canteiros de enraizamento, apresentando sintomas e com brotação ou emissão de raiz incompleta, foram identificados morfológicamente a presença de fungos dos gêneros *Botryosphaeria* spp., “*Cylindrocarpon*” spp. e *Phaeoacremonium* spp. sendo que 91% das amostras avaliadas com problemas de má brotação e emissão de raiz continham algum destes

patógenos. Rusin et al. (2015) em levantamento com plantas de videira apresentando sintomas de declínio, observaram presença de *Phaeomoniella chlamydospora* em 70,6% das mudas avaliadas. Enquanto que para *Botryosphaeria* spp. este índice foi de 54,9% e para "*Cylindrocarpon*" spp. 7,8%. Esses resultados recentes indicam que muitos dos patógenos associados a doenças do tronco da videira, que ocorrem no mundo, também estão presentes no Brasil associados a plantas com declínio.

A presença dos quatro principais gêneros de fungos causadores de doenças de tronco na videira nas mudas de 'Chardonnay' e 'Bordô' enxertadas sobre o portaenxerto Paulsen 1103, dos três diferentes locais (Bento Gonçalves, Garibaldi e Vacaria) estão de acordo com trabalhos que relatam a presença destes patógenos associados ao declínio e morte de plantas no Brasil, como por exemplo, o relato de *Ilyonectria macrodidyma*, *I. robusta* e "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* por Santos et al. (2014), "*Cylindrocarpon*" spp., *Phaeoacremonium* sp., *Verticillium* spp., *Botryosphaeria* spp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis*, *Graphium* spp. e *Cylindrocladium* spp. por Garrido et al. (2004), *Phaeomoniella chlamydospora* no Sul por Almança et al. (2013) e Rusin et al. (2015) e no Nordeste por Correia et al. (2012).

Observou-se grande variabilidade do efeito do TAQ na incidência dos patógenos, nos pontos de isolamento e nos diferentes anos. Neste contexto, Bleach et al. (2009) relataram que para estacas de videira cultivadas em clima frio na Nova Zelândia, os patógenos foram mais sensíveis ao TAQ com o emprego de temperaturas abaixo de 50°C, as quais reduziram a incidência de "*Cylindrocarpon*" spp. Por outro lado, Gramaje et al. (2008, 2009 e 2010) estabeleceram a combinação 53°C e 30 minutos de TAQ como o mais eficiente tratamento para reduzir germinação conidial e crescimento micelial de patógenos causadores do Pé-Preto e doença de Petri na Espanha, sem prejuízos às estacas de videiras. Na França, Vignes et al. (2010) relataram que o TAQ foi a única prática entre diferentes métodos de controle testados, que mostrou resultados promissores para reduzir *B. dothidea*, *Diplodia seriata* e *P. chlamydospora*.

A diversidade de fungos observados a partir dos isolamentos pode ser explicada pela natureza oportunista dos patógenos causadores de doenças de tronco (FERREIRA et al., 1999). De modo geral, a incidência de "*Cylindrocarpon*" spp. no ponto de isolamento colo, pode ser resultado de uma contaminação no momento de plantio da estaca a campo, pois nesta etapa a parte basal das estacas fica parcial ou

totalmente exposta a infecção por patógenos presentes no solo (HALLEEN et al., 2003).

O registro de fungos do gênero *Botryosphaeria*, em todas as mudas analisadas neste trabalho, independente de cultivar e viveiro, pode ser devido à facilidade de dispersão através da chuva e também através de material propagativo contaminado, vindo de matrizeiros ou ferimentos feitos durante o processo de produção de mudas como já relatado por Halleen et al. 2003; Giménez-Jaime et al. 2006; Gramaje & Armengol, 2011.

A incidência de *Phaeomoniella* spp. ocorreu em diferentes níveis, conforme a cultivar e o viveiro de origem. Especialmente *Phaeomoniella chlamydospora* é reportada como sendo específica para videiras (CROUS; GAMS, 2000) e o material propagativo contaminado é provavelmente a principal fonte de inóculo em todas as regiões (VAN NIEKERK et al., 2011).

Phaeomoniella chlamydospora e espécies de *Phaeoacremonium* spp. são associados a doença de Petri em videiras jovens (1-5 anos) e a Esca em videiras adultas (10 anos ou mais) (MUGNAI et al., 1999). Os maiores valores de incidência de *Phaeoacremonium* spp. possivelmente se devem à sua capacidade de infecção através de ferimentos, demonstrada por Gubler et al. (2001), onde a suscetibilidade de ferimentos a *Phaeoacremonium* spp. foi superior a quatro meses.

A presença dos agentes causais da doença de Petri nos pontos de isolamento colo e ponto de enxertia é preocupante, pois estes afetam a qualidade da muda. Em experimento conduzido por Díaz et al. (2009) a formação de calo basal e do ponto de enxertia foi negativamente afetada pela presença de *Phaeoacremonium aleophilum* e *Phaeomoniella chlamydospora* nos cinco portaenxertos testados (Kobber 5BB, SO4, 3309C, 101-14 MG, Paulsen 1103).

A realização do tratamento de água quente a 50°C por 30 minutos reduziu a incidência de fungos causadores de doenças de tronco, mas em alguns casos não eliminou o patógeno por completo. Isso pode ter ocorrido devido à variabilidade de espécies presentes nas mudas e à diferença de suscetibilidade ao tratamento de água quente, como já observado em trabalhos feitos por Gramaje et al. (2008). Entretanto, a combinação do tratamento de água quente com outro tipo de controle, como o controle biológico pode ser uma estratégia mais eficiente no controle dos patógenos causadores de doenças de tronco (KOTZE et al., 2011).

Além disso, mais estudos devem ser realizados com cultivares *Vitis labrusca*, como a 'Bordô' utilizada neste trabalho, em virtude da importância dessas cultivares na região da Serra Gaúcha.

Conclusões

As mudas de 'Chardonnay' e de 'Bordô' provenientes dos viveiros de Bento Gonçalves, Garibaldi e Vacaria apresentaram incidência de fungos causadores de doenças de tronco na videira, entre eles *Botryosphaeria* spp., "*Cylindrocarpon*" spp., *Phaeoacremonium* spp. e *Phaeomoniella* spp.

Ao longo do tempo houve redução da incidência de "*Cylindrocarpon*" spp.

O tratamento de água quente a 50°C por 30 minutos reduziu a incidência de *Phaeoacremonium* spp. e *Phaeomoniella* spp., patógenos causadores de doenças de tronco na videira.

Agradecimentos

Ao professor José Carlos Fachinello *in memoriam* pelos ensinamentos.

À Embrapa Uva e Vinho e ao IFRS/Campus Bento Gonçalves pelo apoio técnico e de estrutura de pesquisa.

À CAPES pela bolsa de doutorado da primeira autora.

Referências

AGUSTÍ-BRISACH C.; GRAMAJE G.; ARMENGOL J.; GARCÍA-JIMÉNEZ J. Hongos de la madera en planta joven de vid: situación actual y estrategias para su control.

Tierras, v. 202, p. 108-113, 2013.

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. Embrapa Uva e Vinho, **Comunicado Técnico 134**, 5p. 2013.

BERTSCH C.; RAMÍREZ-SUERO M.; MAGNIN-ROBERT M.; LARIGNON P.; CHONG J.; ABOU-MANSOUR E.; SPAGNOLO A.; CLÉMENT C.; FONTAINE F. Grapevine trunk disease: complex and still poorly understood. **Plant Pathology**, v. 62, p. 243-265, 2013.

BLEACH, C.M.; JONES, E.E.; JASPERS, M.V. Hot water treatment for elimination of *Cylindrocarpon* species from infected grapevines. **Phytopathologia Mediterranea**, v.48, p.183, 2009.

CABRAL, A.; GROENEWALD, J.Z.; REGO, C.; OLIVERIRA, H.; CROUS, P.W. *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicicola* species complex. **Mycological Progress**, v.11, p. 655–688, 2012.

CARLUCCI, A.; LOPS, F.; MOSTERT, L.; HALLEEN, F.; RAIMONDO, M. L. Occurrence fungi causing black foot on young grapevines and nursery rootstock plants in Italy. **Phytopathologia Mediterranea**, p. temp3-32, 2017.

CORREIA, K.C.; CÂMARA, M.P.S.; BARBOSA, M.A.G.; SALES JUNIOR, R.; AGUSTÍ-BRISACH, C.; GRAMAJE, D.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ABADCAMPOS, P.; ARMENGOL, J.; MICHEREFF, S.J. Fungal species associated with trunk diseases of table grapes in Northeastern Brazil. In: **International Workshop on Grapevine Trunk Diseases**, 8. Eletronic abstracts. Valencia: ICGTD, 2012. Disponível em: <http://www.icgtd.org/workshops_page/8IWGTD_abstracts.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2016.

CRESPO, Jesús, Alfonso. **Efecto de los tratamientos por termoterapia com agua caliente sobre la micoflora presente en plantas de vid injertadas**. 50 p., Trabajo fin de master (Sanidad y Producción Vegetal). Universitat Politècnica de València, Valencia, 2015.

CROUS, P.W.; GAMS, W. *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. Nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. **Phytopathologia Mediterranea**, v.39, p. 112-118, 2000.

DÍAZ, G.A.; ESTERIO, M.; AUGER, J. Effects of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine rootstocks. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 36, n. 3, p. 381-390, 2009.

DISSANAYAKE, A.J.; LIU, M.; ZHANG, W.; CHEN, Z.; UDAYANGA, D.; CHUKEATIROTE, E.; LI, X.; YAN, J.; HYDE, K.D. Morphological and molecular characterisation of *Diaporthe* species associated with grapevine trunk disease in China. **Fungal Biology**, 2014.

FERREIRA, J.H.S.; VAN WYK, P.S.; CALITZ, F.J. Slow dieback of grapevine in South Africa: stress-related predisposition of young vines for infection by *Phaeoacremonium chlamydosporum*. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v.20, p.43-46, 1999.

FOURIE, P.H.; HALLEEN, F. Investigation on the occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* in canes of rootstock mother vines. **Australasian Plant Pathology**, v.31, p. 425-426, 2002.

FOURIE, P.H.; HALLEEN, F. Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. **Plant Disease**, v.88, p. 1241-1245, 2004.

GARCÍA-JIMÉNEZ J.; RAPOSO R.; ARMENGOL J. Enfermedades fúngicas de la madera de la vid. In: R. F. Jiménez Díaz y E. Montesinos Seguí, Eds. **Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. Naturaleza y control integrado**. SEF-Phytoma-España. Valencia, p. 161-173, 2010.

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**, v. 29, n. 3, p. 322-324, 2004.

GIMÉNEZ-JAIME, A.; AROCA, A.; RAPOSO, R.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Occurrence of fungal pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young vines in Spain. **Journal of Phytopathology**, v. 154, p. 598–602, 2006.

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

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.; ALANIZ, S.; ABAD-CAMPOS, P.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Effect of hot water treatments in vitro on conidial germination and mycelial growth of grapevine trunk pathogens. **Annals of Applied Biology**, v. 156, p. 231-241, 2010.
- GRAMAJE D.; ARMENGOL J. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. **Plant Disease**, 95, p. 1040-1055, 2011.
- GRAMAJE, D.; MOSTERT, L.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. Phaeoacremonium: From esca disease to Phaeohyphomycosis. **Fungal Biology**, v.119, p.759-783, 2015.
- GROHS, D.S.; FAJARDO, T.V.M.; GARRIDO, L.R.; VIANA, G.; DA ROSA, C.; GAVA, R.; FELDBERG, N.P. Levantamento da qualidade fitossanitária e morfológica na produção comercial de mudas de videira. In: **Anais..XV Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia**. Bento Gonçalves-RS, p. 296, 2015.
- GUBLER, W.D.; ESKALEN, A.; FELICIANO, A.J.; KHAN, A. Susceptibility of grapevine pruning wounds to *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. **Phytopathologia Mediterranea**, v.40, p. S482-483, 2001.
- HABIB, W.; PICCHIERI, 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.; CROUS, P.W.; PETRINI, O. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. **Australasian Plant Pathology**, v. 32, p. 47-52, 2003.
- HALLEEN, F.; FOURIE, P.H.; CROUS, P.W. A review of black foot disease of grapevine. **Phytopathologia Mediterranea**, v.45, p.S55-S67, 2006.
- HOFSTETTER, V.; BUYCK, B.; CROLL, D.; VIRET, O.; COULOUX, A.; GINDRO, K. What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? **Fungal Diversity**, v.54, p.51-67, 2012.
- JAYAWARDENA, R.S.; ZHANG, W.; LIU, M.; MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N.; ZHOU, Y.; HUANG, J.; NILTHONG, S.; WANG, Z.; LI, X.; YAN, J.; HYDE, K.D.

Identification and characterization of *Pestalotiopsis*-like fungi related to grapevine diseases in China. **Fungal Biology**, 2014.

KOTZE, C.; VAN NIEKERK, J.; MOSTERT, L.; HALLEEN, F.; FOURI, P.H. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 50 (supplement), p. S247-S263, 2011.

LOMBARD, L.; VAN DER MERWE, N.A.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS P.W. Lineages in Nectriaceae: re-evaluating the generic status of *Ilyonectria* and allied genera. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 53, n.3, 2014.

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.

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

NEWSOME, J. **Grapevine Trunk Disease: A review**. 21 p., 2012.

PITT, W.M.; HUANG, R.; STEEL, C.C.; SAVOCCHIA, S. Identification, distribution and current taxonomy of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine decline in New South Wales and South Australia. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 16, p. 258–271, 2010.

RUSIN, C.; OLIVEIRA, M.R.; DE DEUS, C.N.S.; NONDILLO, A.; ALMANÇA, M.A.K. Presença de fungos relacionados a doenças de tronco e de pérola-da-terra em plantas de videira com sintomas de declínio. **Anais...XIV Encontro Nacional sobre Fruticultura de Clima Temperado**, p. 108, 2015.

SANTOS, R.F.; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B.; HAKAWA, R.; GARRIDO, L.R.; REGO, C. Characterization of *Campylocarpon pseudofasciculare* associated with black foot of grapevine in Southern Brazil. **Phytopathologia Mediterranea**, v.53, n.3, p.406–415, 2014.

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

ÚRBEZ-TORRES J.R.; BATTANY, M.; BETTIGA, L.J.; GISPERT, C.; MCGOURTY, G.; RONCORONI, J.; GUBLER, W.D. Botryosphaeriaceae species spore-trapping studies in California vineyards. **Plant Disease**, v. 94, p. 717–724, 2010.

VAN NIEKERK, J.M.; BESTER, W.; HALLEEN, F.; CROUS, P.W.; FOURIE, P.H. The distribution and symptomatology of grapevine trunk disease pathogens are influenced by climate. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 50 (supplement), p. 98-111, 2011.

VIGUES, V.; YOBREGAT, O.; BARTHÉLÉMY, B.; DIAS, F.; COARER, M.; GIRARDON, K.; BERUD, F.; MULLER, M.; LARIGNON, P. Wood decay diseases: tests of disinfection methods in French nursery. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 49, p. 130-131, 2010.

WANG, X.W.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J.Z.; LI, J.; VIDEIRA, S.I.R.; SAMSON, R.A.; LIU, X.Z.; CROUS, P.W. Phylogenetic reassessment of the *Chaetomium globosum* species complex. **Persoonia**, v. 36, p. 83-133, 2016.

5 Artigo 2

Artigo submetido para a revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.

Modelo para quantificação do efeito fisiológico do tratamento de água quente em cultivares de videira

Sabrina Lerin⁽¹⁾, Daniel Santos Grohs⁽²⁾, Marcus André Kurtz Almança⁽³⁾,
Marcos Botton⁽²⁾, Paulo Mello-Farias⁽¹⁾ e José Carlos Fachinello^{(1)†}

⁽¹⁾Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário Capão do Leão, s/n, CEP: 96900-010. Pelotas, RS. sabrinalerin@gmail.com, mello.farias@ufpel.edu.br. ⁽²⁾Embrapa Uva e Vinho, Rua Livramento 515, CEP: 95701-008. Bento Gonçalves, RS. daniel.grohs@embrapa.br, marcos.botton@embrapa.br. ⁽³⁾Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Av. Osvaldo Aranha 540, CEP: 95700-206. Bento Gonçalves, RS. marcus.almanca@bento.ifrs.edu.br.

Resumo

Com o objetivo de elaborar um modelo de previsão para uso do tratamento de água quente sobre a fenologia de cultivares de videira (Bordô, Cabernet Sauvignon, Moscato Embrapa, Paulsen 1103, SO4 e IAC 572), foram avaliadas combinações de três temperaturas (50, 53 e 55°C) com três intervalos de tempo (30, 45 e 60 minutos) de tratamento de água quente, com ou sem hidratação por 30 minutos. Após os tratamentos as estacas foram plantadas a campo e avaliadas quanto ao seu desenvolvimento fenológico por dois meses. As seis cultivares apresentaram respostas distintas quanto à influência dos fatores temperatura e tempo, mas não diferiram significativamente quanto à hidratação. Foi possível desenvolver um modelo matemático para uso do tratamento de água quente em estacas de videira a partir do desenvolvimento fenológico ($y_{\text{fenologia}} = 48,268 - 0,811x_1 - 0,058x_2$), validado com as variáveis brotação e emissão de raízes. A faixa de tolerância das estacas de todas as cultivares a partir do modelo para a temperatura foi entre 48°C e 51°C.

Termos para indexação: tratamento térmico, *Vitis* spp., desenvolvimento vegetativo.

Model for quantifying physiological effect of hot water treatment on grapevine cultivars

Abstract

In order to elaborate a prediction model for hot water treatment use on the phenology of grapevine cultivars (Bordô, Cabernet Sauvignon, Moscato Embrapa, Paulsen 1103, SO4 and IAC 572), combinations of three temperatures (50, 53 and 55°C) with three hot water treatment time intervals (30, 45 and 60 minutes), with or without hydration for 30 minutes. After the treatments, cuttings were planted in the field and evaluated for their phenological development during two months. The six cultivars presented different responses regarding the influence of temperature and time factors, but did not differ significantly regarding hydration. It was possible to develop a mathematical

model for hot water treatment use in vine cuttings from phenological development ($y_{\text{phenology}} = 48,268 - 0,811x_1 - 0,058x_2$), validated with budding and root emission variables. All tested cultivars presented a tolerance range of cuttings from temperature of 48°C to 51°C, using this model.

Index terms: thermal treatment, *Vitis* spp., vegetative growth

Introdução

Um dos principais fatores limitantes para produtividade e longevidade de vinhedos são as doenças de tronco da videira, consideradas como as mais destrutivas em todas as regiões produtoras do mundo (Bertsch et al., 2013). Em 2012, os custos com o replantio de mudas de videira no mundo foram estimados em 1,5 bilhões de dólares por ano (Hofstetter et al., 2012).

O termo 'doenças de tronco da videira' abrange diferentes patógenos que infestam raízes, tronco e ramos da videira, os quais ocorrem no material de propagação. Alguns dos principais agentes causais destas doenças relatados na literatura mundial, também foram encontrados no Brasil associados a sintomas em videiras jovens e adultas no Sul do Brasil, como *Ilyonectria macrodidyma*, *I. robusta* e "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* (Santos et al. 2014), *Cylindrocarpon* sp., *Phaeoacremonium* sp., *Verticillium* sp., *Botryosphaeria* sp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis*, *Graphium* sp. e *Cylindrocladium* sp. (Garrido et al. 2004) *Phaeomoniella chlamydospora* (Almança et al. 2013) no Sul e no Nordeste (Correia et al. 2012).

Os sintomas são variáveis, mas geralmente consistem em necrose das folhas, redução do crescimento e da produção e, em casos mais graves, acarretam a morte das videiras (Newsome, 2012). O estabelecimento, a severidade e a dispersão das doenças de tronco da videira têm sido associados com: estresse hídrico, aumento da área plantada, carência de moléculas fungicidas eficientes, falta de proteção de ferimentos da poda devido ao custo de mão-de-obra e baixa qualidade do material propagativo (Gramaje et al., 2016).

Com a identificação dos patógenos associados à morte de plantas nas mais variadas regiões vitícolas, diferentes estratégias têm sido avaliadas para controlar estes fitopatógenos, como por exemplo, a utilização de controle físico, por meio de tratamento com água quente (TAQ) que é um método eficiente para o controle de patógenos causadores de doenças de tronco em material propagativo (Bleach et al., 2013; Gramaje & Armengol, 2012). Waite et al. (2015) relataram que a utilização do

TAQ é uma prática que pode contribuir para a qualidade fitossanitária do material propagativo.

A realização de tratamento de água quente com a temperatura de 50°C por 30 minutos tornou-se uma prática frequente entre os viveiros em muitos locais, tendo como resultado a redução da incidência dos patógenos associados às doenças de tronco (Serra et al, 2011). Entretanto, é necessária atenção com possíveis efeitos negativos sobre o desenvolvimento da brotação e o crescimento de portaenxertos 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).

Portanto, o TAQ pode influenciar a viabilidade e a qualidade do material vegetativo 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 viveiro (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). Apesar desta variação, para que uma tecnologia seja adotada em um sistema produtivo (ex.: viveiro de produção de mudas), é importante o uso de instrumentos que facilitem o entendimento destas variações e integrem o conhecimento, caso da modelagem de eventos agrícolas (Correa et al., 2011).

A modelagem de eventos agrícolas é um instrumento utilizado para quantificar e prever o efeito de determinadas variáveis sobre o desenvolvimento das culturas desde os primeiros cultivos da história da humanidade. Os modelos podem ser empregados na investigação de uma grande variedade de assuntos relacionados à produção vegetal, servindo para facilitar o entendimento dos resultados expressos por uma cultura submetida a determinadas condições, verificar hipóteses, melhorar e integrar conhecimentos a fim de ser utilizada como uma ferramenta de gerenciamento e de tomada de decisão (Correa et al., 2011). Os modelos são desenvolvidos a partir do ajuste de equações matemáticas utilizando ferramentas estatísticas como a regressão linear múltipla, e por exemplo, a predição de carbono presente no solo, elaborada por Romagnoli et al. (2015).

Devido às ressalvas de pesquisas internacionais quanto aos efeitos da utilização do tratamento de água quente em videiras (Crocker & Waite, 2004; Waite & May, 2005) e por não existirem estudos com cultivares e portaenxertos de videira (ex: IAC 572) amplamente utilizados no Brasil, como por exemplo, espécies de *Vitis*

labrusca e híbridas, é fundamental o estudo do tratamento térmico através da modelagem matemática para avaliar e validar o uso desta tecnologia no Brasil.

Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver um modelo para quantificação do efeito causado pelo tratamento de água quente sobre a fenologia de estacas lenhosas em seis cultivares de videira.

Material e Métodos

O experimento foi realizado com seis cultivares de videira, sendo três portaenxertos: Paulsen 1103 (*Vitis berlandieri* x *V. rupestris*), SO4 (*V. berlandieri* x *V. riparia*) e IAC 572 (*V. tillifolia* x [*V. riparia* x *V. rupestris*] '101-14Mgt') e três cultivares copa: Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*), Bordô (*Vitis labrusca*) e Moscato Embrapa (originária do cruzamento entre as cultivares Couderc 13 (*V. licencumii* x [*V. vinifera* x *V. rupestris*]) x July Muscat (*V. vinifera*), caracterizando-a como uma cultivar híbrida interespecífica).

O material propagativo foi retirado de jardim clonal e mantido em câmara fria, com temperatura entre 2 e 4°C, até a aplicação dos tratamentos. Estes consistiram na combinação de três temperaturas (50°C, 53°C e 55°C) com três intervalos de tempo (30, 45 e 60 minutos) definidos com base nos trabalhos de Gramaje et al. (2009a), adicionado o fator com e sem hidratação das estacas na pré-aplicação do tratamento de água quente por 30 minutos, adaptado de Gramaje et al. (2012).

Após a aplicação dos tratamentos, as estacas foram hidratadas por 12 horas antes do plantio a campo. O tratamento com hidratação correspondeu à imersão total das estacas em um tanque contendo água em temperatura ambiente. Semanalmente foi avaliada a fenologia das plantas de acordo com Eichhorn e Lorenz (1984) e ao final do experimento avaliou-se o número de plantas que emitiram brotação e raízes.

A aplicação dos tratamentos sobre cada cultivar correspondeu a um ensaio. Ao todo foram realizados seis ensaios. Cada ensaio foi conduzido no delineamento experimental de blocos ao acaso com 16 subamostras na parcela principal, num esquema fatorial 2x3x3, sendo o primeiro fator: hidratação, o segundo: temperatura e o terceiro: tempo do TAQ. O experimento foi implantado a campo, na Embrapa Uva e Vinho, em setembro de 2014 e acompanhado por 60 dias.

Para a elaboração do modelo de previsão da fenologia, considerou-se apenas a última data de avaliação, sendo feita uma média ponderada do estágio fenológico

das 16 subamostras. Todos os dados foram submetidos à análise exploratória, sendo utilizado o teste de Kolmogorov – Smirnov ($p < 0,05$) para retirada de valores atípicos.

A metodologia para desenvolvimento do modelo genérico foi baseada no ajuste de regressão linear múltipla clássica, conforme a seguinte expressão [de acordo com Levine et al. (2005)]: $y_i = a + b_1 x_1 + b_2 x_2 + \dots + b_k x_k$ [onde, y_i : estágio fenológico; a : coeficiente constante; b_1 : coeficiente temperatura; b_2 : coeficiente tempo e x_k : temperatura ($^{\circ}\text{C}$)].

Desta forma, a construção do modelo seguiu as seguintes etapas: 1ª) para cada cultivar, com e sem hidratação, foi realizado o ajuste do modelo de forma independente, utilizando-se valores de R e Durbin-Watson para verificação da qualidade dos modelos no que se refere à homocedasticidade e autocorrelação; 2ª) os modelos preditos para cada cultivar, dentro de cada forma de hidratação pré-plantio, foram comparados entre si, pelo *t*-teste ($p < 0,05$) dos intervalos de confiança dos valores preditos; 3ª) determinação da faixa de temperatura preditora do estágio fenológico de mesmo valor ao obtido na testemunha (máximo estágio fenológico possível).

A validação do modelo foi realizada a partir de análise conjunta da comparação entre as faixas de temperaturas preditoras do máximo estágio fenológico com as das variáveis de validação (máxima brotação e máximo enraizamento) para as seis cultivares, com e sem hidratação. Esta comparação foi realizada através do teste-T ($p < 0,05$) dos valores médios da faixa de temperatura (separada em máxima, média e mínima temperaturas) com seu respectivo erro padrão.

Para verificar a diferença entre cultivares, os valores preditos a partir das equações foram comparados pelo teste-T ($p < 0,05$) para cada variável. Não havendo diferença significativa entre as cultivares, para as três variáveis (Tabela 4), possibilitou-se a elaboração de uma equação geral para cada variável e seus respectivos limites de tolerância para temperatura.

Resultados e Discussão

1- Construção do modelo

O efeito da temperatura e do tempo de aplicação do TAQ sobre a fenologia das cultivares com e sem pré-hidratação é representado na Tabela 1. Observa-se que a relação entre temperatura e tempo de exposição frente ao tratamento de água quente

(TAQ), no tratamento sem hidratação, foi múltipla para Cabernet Sauvignon, Paulsen 1103, SO4 e IAC 572.

Para o tratamento com hidratação, essa resposta ocorreu para as cultivares Cabernet Sauvignon e Moscato Embrapa. Tanto para o tratamento com e sem hidratação, a comparação entre os intervalos de confiança das equações de cada cultivar não diferiram entre si, indicando que a resposta da fenologia independe do genótipo testado, possibilitando o desenvolvimento de um modelo geral para as seis cultivares de videira. Desta forma, determinou-se a média dos coeficientes da equação, obtendo-se o modelo global: ($y_{\text{fenologia}} = 48,268 - 0,811x_1 - 0,058x_2$), permitindo prever o efeito do tratamento de água sobre variáveis agronômicas de *Vitis* sp. de forma a auxiliar na tomada de decisão quanto à temperatura e ao tempo a ser utilizado.

Da mesma forma, de acordo com os valores médios de R e Durbin-Watson obtidos observa-se que o grau de confiança do modelo está adequado. Os valores do coeficiente de correlação R limitados entre $-1 \leq R \leq +1$, quando próximos à +1 ou -1 indicam forte correlação entre as variáveis, assim, a partir dos valores observados nas tabelas 1, 2 e 3 observou-se correlação direta para todas as cultivares nas três variáveis analisadas.

Os valores críticos de Durbin-Watson para estes ensaios, considerando duas variáveis (k: 2) e 16 observações (n:16) ficaram entre $d_L=0,982$ e $d_U=1,539$ com probabilidade 5%, ou seja, valores abaixo de $d_L=0,982$ indicam evidências de correlação positiva nos erros, enquanto valores acima de $d_U=1,539$ indicam que não existe correlação positiva nos erros. Assim analisando os valores presentes nas tabelas 1, 2 e 3, observa-se que os valores médios de Durbin-Watson para fenologia, brotação e emissão de raiz foram em sua maioria inconclusivos, o que poderia ser resolvido com um maior número de observações (repetições).

A ausência de significância entre os modelos obtidos para as cultivares corrobora com o trabalho de Gramaje et al. (2009a) que reportaram pequena variabilidade de percentuais de brotação e massa de parte aérea para os portaenxertos Mgt. 41 B, Ruggeri 140, Couderc 161-49, Paulsen 1103 e Richter 110 e para as combinações (Bobal/P1103, Merlot/R 110, Tempranillo/R 110 e Tempranillo/C161-49) o que possibilita a padronização de um protocolo de TAQ.

2- Validação do modelo

2.1. Quanto às respostas da brotação e das raízes ocorrerem de forma similar à fenologia

A análise da variável brotação mostrou efeito significativo da temperatura e do tempo para as cultivares Moscato Embrapa, Cabernet Sauvignon e Paulsen 1103 com e sem hidratação (Tabela 2). A brotação da cv. Bordô e dos portaenxertos SO4 e IAC 572 somente foi influenciada pela temperatura. Os resultados obtidos para Paulsen 1103 e Cabernet Sauvignon, corroboram com Akgül et al. (2016) que avaliaram as temperaturas de 51, 52 e 53°C por 30 ou 45 minutos, observando redução da brotação com o aumento da temperatura e do tempo de exposição ao TAQ.

A análise da variável emissão de raiz também mostrou resposta múltipla para as cultivares Moscato Embrapa, Cabernet Sauvignon e Paulsen 1103, quando não hidratadas. Quando hidratadas somente as cultivares Moscato Embrapa e Paulsen 1103 foram significativamente afetadas (Tabela 3). A temperatura foi o único fator que influenciou a emissão de raiz dos portaenxertos SO4 e IAC 572 com ou sem hidratação.

De acordo com revisão feita por Waite & Morton (2007) a diferente sensibilidade de cultivares *Vitis vinifera* ao TAQ vem sendo estudada desde a década de 90, quando este começou a ser introduzido na rotina dos viveiros. Estudos demonstraram que algumas cultivares como Pinot Noir, Chardonnay, Reisling e Merlot são mais sensíveis ao TAQ, do que por exemplo, a cv. Cabernet Sauvignon, apresentando atraso no início da brotação e da emissão de raiz, mas ao final do período se igualam às plantas que não receberam TAQ.

2.2. Quanto às comparações das faixas de temperatura preditoras da brotação e das raízes ocorrerem de forma similar à fenologia:

As faixas de temperatura foram comparadas entre sistemas de irrigação e entre cultivares. Assumindo-se que não haja variabilidade suficiente para ocorrer diferenças significativas nestes tratamentos, considera-se que o modelo global é verdadeiro e passível de ser utilizado de forma única.

Para as três variáveis analisadas não houve diferença significativa quanto ao fator hidratação (Tabela 4). Neste trabalho não foi observado efeito da pré-hidratação por 30 minutos antes do TAQ, entretanto períodos maiores de hidratação poderiam ser avaliados, pois de acordo com Waite e May (2005), a hidratação por quatro horas

pré-TAQ favoreceu o desenvolvimento de calos na base de estacas da cv. Chardonnay, enquanto que a hidratação por 15 horas ou a não hidratação desfavoreceu a formação de calo basal. A pré-hidratação antes do TAQ é motivo de discussão entre pesquisadores que utilizam esta técnica. Períodos muito longos podem prejudicar o material vegetal e permitir a entrada de fitopatógenos presentes na água ou na superfície do próprio material e penetrar através de ferimentos (Waite et al., 2013).

Em trabalho conduzido na Austrália, Waite & May (2005) testaram dois tempos de pré-hidratação (4 e 15 horas) e observaram que estacas Chardonnay submetidas a 4 horas de hidratação obtiveram maior desenvolvimento de calo em comparação às estacas submetidas a 15 horas, no entanto sem diferir significativamente da testemunha (sem pré-hidratação). Os resultados observados neste trabalho para a cv. Cabernet Sauvignon corroboram com os de Waite & May (2005), que não observaram efeito significativo da hidratação no desenvolvimento de calo e raiz para a mesma cultivar na Austrália.

Embora haja influência na reposta de cada cultivar aos fatores temperatura e tempo, com e sem hidratação (resposta simples ou múltipla) (Tabelas 1, 2 e 3), na comparação das faixas de temperatura, o comportamento (tolerância à temperatura) das seis cultivares de videira nas três variáveis analisadas foi semelhante (Tabela 4). A partir dos valores de temperatura limítrofes preditos pelas equações de cada cultivar, determinaram-se os valores mínimos, médios e máximos gerais para cada variável, sendo 48-49-51°C para fenologia, 46-48-51°C para brotação e 45-49-52°C para emissão de raiz.

Na condição final, todas as cultivares se igualaram independente de suas peculiaridades, corroborando com os resultados obtidos por Waite e May (2005) para Chardonnay e Cabernet Sauvignon, onde observaram diferentes respostas para cada cultivar isoladamente, mas ao final do experimento o comportamento entre as cultivares se assemelhou.

Estudos feitos com os portaenxertos 101-14 MGT (*Vitis riparia* × *V. rupestris*) e Teleki 5C (*V. berlandieri* × *V. riparia*) por Bleach et al. (2013) mostraram que estacas tratadas à 48,5°C por 30 minutos não apresentaram retardo de crescimento ou morte de estacas na Nova Zelândia. Gramaje et al. (2009a) avaliaram o efeito de combinações de tempo (30, 45 e 60 minutos) e temperatura (50, 51, 52, 53 e 54°C) sobre a viabilidade de cinco portaenxertos de videira (Mgt 41 B, Ruggeri 140, Courderc

161-49, Paulsen 1103, Richter 110) e observaram somente uma redução da brotação nos tratamentos acima de 54°C por 30 minutos para os cinco portaenxertos.

O comportamento semelhante das cultivares estudadas pode ser explicado, possivelmente, pelo maior nível de termotolerância destas devido ao clima da região. As injúrias causadas pelo tratamento com água quente são reportadas como menos comuns em regiões de clima quente comparado a regiões frias, isso devido 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 faz persistir em dormência e as protege durante o tratamento com água quente (Crocker & Waite, 2004).

Na variável emissão de raiz foram observados o menor e o maior valor limite de tolerância à temperatura, que foi de 45°C (mínimo) e de 52°C (máximo), condizendo com estudos realizados em outros países, onde são utilizadas para o tratamento de água quente, temperaturas iguais ou acima de 50°C, como por exemplo, 50°C na África do Sul (Fourie & Halleen, 2004) e na Austrália (Waite & May, 2005), e de 50 a 53°C na Espanha (Gramaje et al., 2008; Gramaje et al., 2009a; Gramaje et al., 2010) e na Itália (Mannini, 2007).

Os valores limites de tolerância preditos com os modelos condizem com os protocolos utilizados em outros países. As condições climáticas onde as videiras são cultivadas têm influência na combinação de tempo e temperatura para utilização do TAQ. 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, em um 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).

Conclusões

1 - Não existe diferença significativa de estágio fenológico entre as cultivares Bordô, Cabernet Sauvignon, Moscato Embrapa, Paulsen 1103, SO4 e IAC 572 e o uso de hidratação de estacas, podendo-se utilizar um modelo único para predição do estágio fenológico em função da temperatura e do tempo de tratamento térmico.

2 - O modelo construído neste trabalho é $y = 48,268 - 0,811x_1 - 0,058x_2$, onde: y é o estágio de desenvolvimento (nota), x_1 é a temperatura (°C) e x_2 é o tempo (min).

3 - Para fins de recomendação, os maiores valores de estágio fenológico ocorrem na faixa de temperatura de 48°C a 51°C no tempo de 30 minutos. Na medida em que se aumenta a temperatura em relação a esta faixa ou o tempo de exposição, o estágio diminui.

Agradecimentos

À Embrapa Uva e Vinho e ao IFRS/*Campus* Bento Gonçalves pelo apoio técnico e de estrutura de pesquisa.

À CAPES pela bolsa de doutorado da primeira autora.

Referências

- AKGÜL, D. S.; SAVAŞ, Y.; GÜNGÖR SAVAŞ, N.; YAĞCI, A. Effects of hot water treatments on growth of Botryosphaeriaceae fungi and bud vitality of grape scion and rootstocks in controlled conditions. **Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, v.53, n.1, p.99-107, 2016.
- 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. Embrapa Uva e Vinho, **Comunicado Técnico 134**, 5p. 2013.
- AROCA, A.; GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; RAPOSO, R. Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. **European Journal of Plant Pathology**, v.126, p.165-174, 2010.
- 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.
- CORREA, S. T. R.; DOURADO NETO, D.; LORENÇONI, R.; SCARPARE, F. V.; VIVIAN, R.; RUIZ, E. T. Aplicações e limitações da modelagem em agricultura: revisão. **Revista de Agricultura**, v. 86, n. 1, p. 1-13, 2011.

- CORREIA, K.C.; CÂMARA, M.P.S.; BARBOSA, M.A.G.; SALES JUNIOR, R.; AGUSTÍ-BRISACH, C.; GRAMAJE, D.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ABADCAMPOS, P.; ARMENGOL, J.; MICHEREFF, S.J. Fungal species associated with trunk diseases of table grapes in Northeastern Brazil. In: **International Workshop on Grapevine Trunk Diseases**, 8. Eletronic abstracts. Valencia: ICGTD, 2012. Disponível em: <http://www.icgtd.org/workshops_page/8IWGTD_abstracts.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2016.
- CROCKER J.; WAITE, H. Development of effective efficient and reliable hot water treatments: Final project report. GWRDC project SAR 99/4: **Grape and Wine research and Development Corporation**, PO Box 221, Goodwood, SA 5034, Australia, 2004.
- DÍAZ, G. A.; ESTERIO, M.; AUGER, J. Effects of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine rootstocks. **Ciencia Investigación Agraria**, v. 36, n. 3, p. 381-390, 2009;
- EICHHORN, K.W.; LORENZ, D.H. Phaenologische entwicklungsstadien der rebe. **European and Mediterranean Plant Protection Organization**, v.14, n.2, p.295-298, 1984.
- FOURIE, P.; HALLEEN, F. Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. **Plant Disease**, v. 88, p. 1241–1245, 2004.
- 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**, v. 29, n. 3, p. 322-324, 2004.
- GRAHAM A. Hot water treatment of grapevine rootstock cuttings grown in a cool climate. **Phytopathologia Mediterranea** v.46, p.124, 2007.
- GRAMAJE, D.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Sensitivity of Petri disease pathogens to hot-water treatments in vitro. **Annals of Applied Biology**, v.153, p. 95–103, 2008.
- GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J.; 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.; ALANIZ, S.; ABAD-CAMPOS, P.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Effect of hot-water treatments in vitro on conidial germination and mycelial growth of grapevine trunk pathogens. **Annals of Applied Biology**, v. 156, p. 231–241, 2010.

- GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J. 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.; BAUMGARTNER, K.; HALLEEN, F.; MOSTERT, L.; SOSNOWSKI, M.R.; ÚRBEZ-TORRES, J.R.; ARMENGOL, J. Fungal Trunk Diseases: a problem beyond grapevine? **Plant Pathology**, v. 65, n.3, p.355–356, 2016.
- HABIB, W.; PICHIERRI, A.; MASIELLO, N.; POLLASTRO, S.; FARETRA, F. Application of hot water treatment to control *Phaeomoniella chlamydospora* in grapevine plant propagation material. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 48, p. 186, 2009.
- HOFSTETTER, V.; BUYCK, B.; CROLL, D.; VIRET, O.; COULOUX, A.; GINDRO, K. What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? **Fungal Diversity**, v.54, p.51-67, 2012.
- LEVINE, D.M.; BERENSON, M.L.; STEPHAN, D. **Estatística: teoria e aplicações**. Rio de Janeiro: LTC, 2005.
- 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.
- NEWSOME, J. **Grapevine Trunk Disease: A review**. 21 p., 2012.
- ROMAGNOLI, F.; NANNI, M. R.; GASPAROTTO, A. C.; JUNIOR, C. A. S.; CEZAR, E.; SILVA, A. A.; SACIOTO, M. Predição do carbono do solo por meio de análise multivariada e sensoriamento remoto. **Anais XVII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR**, João Pessoa-PB, Brasil, p. 1169-1175, 2015.
- SANTOS, R.F.; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B.; HAKAWA, R.; GARRIDO, L.R.; REGO, C. Characterization of *Campylocarpon pseudofasciculare* associated with black foot of grapevine in Southern Brazil. **Phytopathologia Mediterranea**, v.53, n.3, p.406–415, 2014.
- 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.

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.; WHITELOW-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.

WAITE, H.; WHITELOW-WECKERT, M.; TORLEY, P. Grapevine propagation: principles and methods for the production of high-quality grapevine planting material. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 43, n. 2, p. 144–161, 2015.

Tabela 1 – Efeito de temperatura e tempo de tratamento com água quente (TAQ) sobre a fenologia de seis cultivares de videira submetidas ou não à hidratação prévia. Equações baseadas em $y_i = a + b_1 x_1 + b_2 x_2$ (onde, y_i : variável; a : coeficiente constante; b_1 : coeficiente temperatura; b_2 : coeficiente tempo).

Hidratação	Cultivar	Coef. (b_1)	IC (b_1)		Coef. (b_2)	IC (b_2)		Coef. (a)	IC (a)		R	Σ	Durbin Watson
		Temp. (°C)	Inferior	Superior	Tempo	Inferior	Superior	Constante	Inferior	Superior			
Sem	Bordô	-0,450**	-0,592	-0,308	ns	-	-	26,549**	19,003	34,096	0,48	1,693	1,426
	Moscato E.	-0,797**	-1,053	-0,540	ns	-	-	47,672**	34,059	61,285	0,48	3,148	1,551
	Cabernet S.	-0,627**	-0,822	-0,432	-0,083**	-0,116	-0,051	41,134**	30,780	51,488	0,60	2,230	1,816
	Paulsen 1103	-0,578**	-0,790	-0,366	-0,037*	-0,072	-0,001	35,153**	23,942	46,363	0,45	2,572	1,637
	SO4	-1,485**	-1,749	-1,220	-0,065**	-0,109	-0,021	86,069**	71,968	100,171	0,70	3,262	1,784
	IAC 572	-0,853**	-1,028	-0,679	-0,045**	-0,071	-0,019	50,250**	40,772	59,728	0,66	1,918	1,163
Com	Bordô	-0,183*	-0,320	-0,047	ns	-	-	12,559**	5,211	19,907	0,27	1,663	1,372
	Moscato E.	-0,952**	-1,245	-0,659	-0,071**	-0,121	-0,022	57,220**	41,566	72,874	0,51	3,597	1,921
	Cabernet S.	-0,495**	-0,747	-0,242	-0,057*	-0,098	-0,015	33,359*	20,042	46,676	0,42	2,816	1,342
	Paulsen 1103	-1,031**	-1,288	-0,773	ns	-	-	59,496**	45,822	73,169	0,57	3,182	1,472
	SO4	-1,422**	-1,679	-1,166	ns	-	-	80,073**	66,428	93,718	0,69	3,136	1,676
	IAC 572	-0,862**	-1,157	-0,567	ns	-	-	49,682**	33,870	65,495	0,56	2,691	1,013

Temp. (°C): temperatura; Moscato E.: Moscato Embrapa; Cabernet S.: Cabernet Sauvignon. *p-value<0.05, **p-value<0.01, ns: não significativo. IC: intervalo de confiança do coeficiente. Σ : erro padrão. Equação média global: $y_{\text{fenologia}} = 48,268 - 0,811x_1 - 0,058x_2$.

Tabela 2 – Efeito de temperatura e tempo de tratamento com água quente (TAQ) sobre a brotação de seis cultivares de videira submetidas ou não à hidratação prévia. Equações baseadas em $y_i = a + b_1 x_1 + b_2 x_2$ (onde, y_i : variável; a : coeficiente constante; b_1 : coeficiente temperatura; b_2 : coeficiente tempo).

Hidratação	Cultivar	Coef. (b_1)	IC (b_1)		Coef. (b_2)	IC (b_2)		Coef. (a)	IC (a)		R	Σ	Durbin Watson
		Temp. (°C)	Inferior	Superior	Tempo	Inferior	Superior	Constante	Inferior	Superior			
Sem	Bordô	-0,053**	-0,073	-0,032	ns	-	-	2,824**	1,727	3,921	0,39	0,257	0,538
	Moscato E.	-0,105**	-0,134	-0,076	-0,006*	-0,011	-0,001	6,039**	4,492	7,586	0,54	0,359	1,003
	Cabernet S.	-0,085**	-0,116	-0,054	-0,010**	-0,015	-0,005	5,167**	3,524	6,810	0,52	0,363	1,166
	Paulsen 1103	-0,069**	-0,093	-0,044	-0,005*	-0,009	-0,001	3,960**	2,657	5,263	0,45	0,305	0,872
	SO4	-0,155**	-0,185	-0,125	ns	-	-	8,739**	7,148	10,330	0,66	0,368	0,968
	IAC 572	-0,091**	-0,122	-0,060	ns	-	-	4,951**	3,300	6,601	0,53	0,304	1,147
Com	Bordô	-0,018*	-0,031	-0,005	ns	-	-	0,952*	0,260	1,643	0,22	0,162	1,352
	Moscato E.	-0,096**	-0,128	-0,064	-0,006*	-0,011	-0,000	5,588**	3,861	7,314	0,46	0,404	0,955
	Cabernet S.	-0,039*	-0,076	-0,002	-0,008*	-0,014	-0,001	2,680*	0,708	4,652	0,28	0,433	1,014
	Paulsen 1103	-0,110**	-0,139	-0,082	-0,005*	-0,010	-0,000	6,263**	4,770	7,756	0,56	0,348	0,932
	SO4	-0,153**	-0,182	-0,124	ns	-	-	8,440**	6,895	9,986	0,66	0,358	0,861
	IAC 572	-0,091**	-0,122	-0,060	ns	-	-	4,899**	3,259	6,540	0,53	0,302	0,891

Temp. (°C): temperatura; Moscato E.: Moscato Embrapa; Cabernet S.: Cabernet Sauvignon. *p-value<0.05, **p-value<0.01, ns: não significativo. IC: intervalo de confiança do coeficiente. Σ : erro padrão.

Tabela 3 – Efeito de temperatura e tempo de tratamento com água quente (TAQ) sobre a emissão de raiz de seis cultivares de videira submetidas ou não à hidratação prévia. Equações baseadas em $y_i = a + b_1 x_1 + b_2 x_2$ (onde, y_i : variável; a : coeficiente constante; b_1 : coeficiente temperatura; b_2 : coeficiente tempo).

Hidratação	Cultivar	Coef. (b_1)	IC (b_1)		Coef. (b_2)	IC (b_2)		Coef. (a)	IC (a)		R	Σ	Durbin Watson
		Temp. (°C)	Inferior	Superior	Tempo	Inferior	Superior	Constante	Inferior	Superior			
Sem	Bordô	ns	-	-	ns	-	-	ns	-	-	-	-	-
	Moscato E.	-0,105**	-0,134	-0,076	-0,006*	-0,011	-0,001	6,039**	4,492	7,586	0,54	0,359	1,003
	Cabernet S.	-0,076**	-0,105	-0,046	-0,007*	-0,011	-0,002	4,464**	2,890	6,038	0,46	0,348	1,136
	Paulsen 1103	-0,069**	-0,093	-0,044	-0,005*	-0,009	-0,001	3,960**	2,657	5,263	0,45	0,305	0,872
	SO4	-0,155**	-0,185	-0,125	ns	-	-	8,739**	7,148	10,330	0,66	0,368	0,968
	IAC 572	-0,091**	-0,122	-0,060	ns	-	-	4,951**	3,300	6,601	0,53	0,304	0,895
Com	Bordô	ns	-	-	ns	-	-	ns	-	-	-	-	-
	Moscato E.	-0,096**	-0,128	-0,064	-0,006*	-0,011	-0,000	5,588**	3,861	7,314	0,46	0,404	1,041
	Cabernet S.	ns	-	-	ns	-	-	1,541*	0,141	2,941	0,23	0,307	1,124
	Paulsen 1103	-0,111**	-0,138	-0,083	-0,005*	-0,010	-0,000	6,269**	4,787	7,752	0,57	0,347	0,932
	SO4	-0,153**	-0,182	-0,124	ns	-	-	8,440**	6,895	9,986	0,66	0,358	0,973
	IAC 572	-0,091**	-0,122	-0,060	ns	-	-	4,899**	3,259	6,540	0,53	0,302	1,143

Temp. (°C): temperatura; Moscato E.: Moscato Embrapa; Cabernet S.: Cabernet Sauvignon. *p-value<0.05, **p-value<0.01, ns: não significativo. IC: intervalo de confiança do coeficiente. Σ : erro padrão.

Tabela 4 – Comparação entre com e sem hidratação para as três variáveis e comparação entre as seis cultivares de videira. Equações baseadas em $y_i = a + b_1 x_1 + b_2 x_2$ (onde, y_i : variável; a : coeficiente constante; b_1 : coeficiente temperatura; b_2 : coeficiente tempo).

Variável	Cultivar	Com H	Sem H	T-teste ¹ (p<0,05)	Equação Geral Média ^c	Σ	Testemunha (y) $\pm \Sigma$	x (temperatura)			T-teste ² (p<0,05)
		$a^a \pm \Sigma$	$a^a \pm \Sigma$					Mínimo	Médio	Máximo	
Fenologia	Bordô	3 $\pm$ 1,7	4 $\pm$ 1,7	1,000 ^{ns}	19,554 - 0,316x ₁	1,7	2,3 $\pm$ 0,9	51°C	54°C	57°C	0,559 ^{ns}
	Cabernet S.	7 $\pm$ 2,8	7 $\pm$ 2,2	0,735 ^{ns}	37,246 - 0,561x ₁ - 0,070x ₂	3,4	7,9 $\pm$ 1,0	47°C	49°C	50°C	
	Moscato E.	7 $\pm$ 3,6	8 $\pm$ 3,1	0,844 ^{ns}	52,446 - 0,874x ₁ - 0,071x ₂	2,5	7,3 $\pm$ 1,1	48°C	49°C	50°C	
	Paulsen 1103	8 $\pm$ 3,2	5 $\pm$ 2,6	0,785 ^{ns}	47,324 - 0,804x ₁ - 0,037x ₂	2,9	7,2 $\pm$ 1,4	47°C	48°C	50°C	
	SO4	9 $\pm$ 3,1	10 $\pm$ 3,3	0,934 ^{ns}	83,071 - 1,453x ₁ - 0,065x ₂	3,2	7,6 $\pm$ 1,2	50°C	51°C	52°C	
	IAC 572	7 $\pm$ 2,7	6 $\pm$ 1,9	1,000 ^{ns}	49,966 - 0,857x ₁ - 0,045x ₂	2,3	10,0 $\pm$ 1,0	44°C	45°C	46°C	
Brotação	Bordô	0,05 $\pm$ 0,2	0,17 $\pm$ 0,3	0,631 ^{ns}	1,888 - 0,035x ₁	0,2	0,30 $\pm$ 0,11	42°C	45°C	49°C	0,506 ^{ns}
	Cabernet S.	1,15 $\pm$ 0,4	0,45 $\pm$ 0,4	1,000 ^{ns}	3,923 - 0,062x ₁ - 0,009x ₂	0,4	0,69 $\pm$ 0,11	46°C	48°C	50°C	
	Moscato E.	0,61 $\pm$ 0,4	0,61 $\pm$ 0,4	1,000 ^{ns}	5,813 - 0,100x ₁ - 0,006x ₂	0,4	0,62 $\pm$ 0,12	49°C	50°C	51°C	
	Paulsen 1103	0,61 $\pm$ 0,3	0,36 $\pm$ 0,3	1,000 ^{ns}	5,111 - 0,089x ₁ - 0,005x ₂	0,3	0,59 $\pm$ 0,12	48°C	49°C	51°C	
	SO4	0,79 $\pm$ 0,4	0,99 $\pm$ 0,4	1,000 ^{ns}	8,589 - 0,154x ₁	0,4	0,59 $\pm$ 0,12	51°C	52°C	53°C	
	IAC 572	0,35 $\pm$ 0,3	0,40 $\pm$ 0,3	1,000 ^{ns}	4,925 - 0,091x ₁	0,3	0,70 $\pm$ 0,15	45°C	46°C	48°C	
Emissão de raiz	Bordô	0 ^b	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Cabernet S.	0,11 $\pm$ 0,03	0,45 $\pm$ 0,3	0,148 ^{ns}	4,464 - 0,076x ₁ - 0,007x ₂	0,4	0,69 $\pm$ 0,11	45°C	47°C	49°C	0,619 ^{ns}
	Moscato E.	0,61 $\pm$ 0,4	0,61 $\pm$ 0,4	1,000 ^{ns}	5,813 - 0,100x ₁ - 0,006x ₂	0,4	0,62 $\pm$ 0,12	49°C	50°C	51°C	
	Paulsen 1103	0,57 $\pm$ 0,3	0,36 $\pm$ 0,3	1,000 ^{ns}	5,114 - 0,090x ₁ - 0,005x ₂	0,3	0,59 $\pm$ 0,12	47°C	49°C	50°C	
	SO4	0,79 $\pm$ 0,4	0,99 $\pm$ 0,4	1,000 ^{ns}	8,589 - 0,154x ₁	0,4	0,59 $\pm$ 0,12	51°C	52°C	53°C	
	IAC 572	0,35 $\pm$ 0,3	0,40 $\pm$ 0,3	1,000 ^{ns}	4,925 - 0,091x ₁	0,3	0,70 $\pm$ 0,15	45°C	46°C	48°C	

a^a medida de cada variável; b^b valor médio; c^c: equação geral média para cada cultivar; H: hidratação; Cabernet S.: Cabernet Sauvignon; Moscato E: Moscato Embrapa; Σ : erro padrão; z: tempo fixo 30 minutos; ns: não significativo. T-teste¹: comparação entre com e sem hidratação na linha para cada cultivar, em cada variável. T-teste²: comparação entre cultivares na coluna para cada variável-resposta.

6 Artigo 3

Efeito do tratamento de água quente na viabilidade de fungos associados a doenças de tronco de videira

Sabrina Lerin¹, Marcus André Kurtz Almança², Sami Jorge Michereff³, Daniel Santos Grohs⁴, Paulo Mello-Farias¹, Marcos Botton⁴

¹Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário Capão do Leão, s/n, CEP: 96900-010. Pelotas, RS. sabrinalerin@gmail.com, mello.farias@ufpel.edu.br. ²Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Av. Osvaldo Aranha 540, CEP: 95700-206. Bento Gonçalves, RS. marcus.almanca@bento.ifrs.edu.br. ³Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900. Recife, PE. sami.michereff@ufrpe.br. ⁴Embrapa Uva e Vinho, Rua Livramento 515, CEP: 95701-008. Bento Gonçalves, RS. daniel.grohs@embrapa.br, marcos.botton@embrapa.br.

Resumo

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade ao tratamento de água quente in vitro, 12 isolados de patógenos associados às doenças de tronco em videira (três isolados de *Lasiodiplodia theobromae*, dois de *Lasiodiplodia brasiliense* e *Phaeomoniella chlamydospora*, um de *Botryosphaeria* sp., *Phaeoacremonium parasiticum*, *Campylocarpon fasciculare*, “*Cylindrocarpon*” sp. e *Fusarium* sp.) foram submetidos a diferentes combinações de temperatura (30, 35, 40, 45, 50 e 60°C) e tempo (10, 20, 30, 40, 50, 60 a 120 minutos) de tratamento térmico. Para cada isolado foram utilizados fragmentos de meio com crescimento micelial, colocados em microtubos e tratados. Os isolados mais sensíveis ao tratamento térmico foram *Campylocarpon fasciculare* e “*Cylindrocarpon*” sp., com 100% de inibição do crescimento micelial a 50°C por 30 minutos. Os isolados de *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia theobromae* e *L. brasiliense* e *Botryosphaeria* sp. de forma geral tiveram seu crescimento micelial reduzido ou inibido a partir de 55°C. Já os isolados de *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium parasiticum* foram os mais tolerantes ao tratamento térmico, suportando temperaturas de 60°C.

Termos para indexação: doença de Petri, Pé-Preto, *Botryosphaeria* spp., tratamento térmico, *Vitis* spp.

Hot water treatment effect on viability of grapevine trunk pathogens

Abstract

In order to evaluate the sensitivity to hot water treatment in vitro, 12 pathogens isolates associated with grapevine trunk diseases (three isolates of *Lasiodiplodia theobromae*, two of *Lasiodiplodia brasiliense* and *Phaeomoniella chlamydospora*, one of *Botryosphaeria* sp., *Phaeoacremonium parasiticum*, *Campylocarpon fasciculare*, *Cylindrocarpon* sp. and *Fusarium* sp.) were submitted to different temperature (30, 35, 40, 45, 50 and 60°C) and time (10, 20, 30, 40, 50, 60 and 120 minutes) combinations of heat treatment. For each isolate, fragments of medium

with mycelial growth were placed in microtubes and treated. The most heat-sensitive isolates were *Campylocarpon fasciculare* and "*Cylindrocarpon*" sp., with 100% inhibition of mycelial growth at 50°C for 30 minutes. The isolates of *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia theobromae* and *L. brasiliense* and *Botryosphaeria* sp. generally had their mycelial growth reduced or inhibited from 55°C. The isolates of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium parasiticum* were the most tolerant to the heat treatment, supporting temperatures of 60°C.

Index-terms: Petri disease, Black-foot, *Botryosphaeria* spp., heat treatment, *Vitis* spp.

Introdução

Devido à redução da longevidade de videiras, ao aumento no custo de manejo preventivo cultural e químico e à redução da produção, o declínio e morte de plantas de videira causado por doenças de tronco é um dos maiores problemas da viticultura (BLOCK et al., 2013). As doenças de tronco englobam um complexo de patógenos que podem ocorrer simultaneamente, com a infecção por um ou mais fungos, como por exemplo, doença de Petri e Esca que tem como principais agentes causais *Phaeomoniella chlamydospora* (CROUS; GAMS, 2000), *Phaeoacremonium* spp. (HALLEEN et al., 2003; MOSTERT et al., 2006), Podridão descendente causada por fungos da família *Botryosphaeriaceae* (VAN NIEKERK et al., 2004; 2006; 2010) e Pé-Preto com espécies pertencentes aos gêneros *Dactylonectria*, *Ilyonectria*, "*Cylindrocarpon*" e *Campylocarpon* (SCHECK et al., 1998a; 1998b; HALLEEN et al., 2004; 2005; 2006; LOMBARD et al., 2014).

Várias estratégias, incluindo tratamento químico, biológico e físico vem sendo investigadas para erradicar e controlar os patógenos causadores de doenças de tronco, com especial ênfase em alternativas ambientalmente seguras com destaque para o tratamento de água quente (GRAMAJE et al., 2009; HALLEEN; FOURIE, 2016). Segundo Waite et al. (2013) diversos estudos têm sido realizados para avaliar o efeito da aplicação de tratamento térmico, de curta ou longa duração, em material propagativo de videiras sobre os patógenos associados às doenças de tronco. A realização de tratamento térmico com a temperatura de 50°C por 30 minutos tornou-se uma prática comum entre os viveiros em muitos locais, tendo como resultado a redução da incidência dos patógenos associados as doenças de tronco (SERRA et al., 2011).

Entretanto, estudos demonstraram que o tratamento térmico a 50°C por 30 minutos pode não ser eficiente para todos os patógenos associados às doenças de tronco, como já reportado por Serra et al. (2009) e Habib et al. (2009) podendo inclusive danificar as mudas de videira (BLEACH et al., 2009). Waite e Morton (2007) sugerem que a tolerância das plantas e dos patógenos ao tratamento térmico pode ser influenciada pelo clima no qual as plantas estão se desenvolvendo.

A diversidade e variabilidade genética de fungos associados às doenças de tronco, juntamente com as condições climáticas de cada região, permitiram demonstrar que temperaturas superiores à 50°C, podem ser mais eficazes na erradicação de determinados patógenos em material propagativo em regiões mais quentes, como na Espanha (GRAMAJE et al., 2009; GRAMAJE; ARMENGOL., 2012), ou o contrário, que temperaturas inferiores à 50°C podem ser eficazes na redução de patógenos em regiões mais frias, como na Nova Zelândia (BLEACH et al., 2013).

Ensaio in vitro têm sido conduzidos para verificar quais são as combinações de tempo e temperatura que efetivamente inibem o crescimento de patógenos associados às doenças de tronco. Experimentos conduzidos por Whiting et al. (2001) demonstraram que *Phaeoacremonium* spp. e *Phaeomoniella chlamydospora* não foram inativados quando submetidos à temperatura de 37°C, no entanto, depois de 15 minutos à 51°C, a germinação conidial foi inibida.

Gramaje et al. (2010) relataram que o atual protocolo de tratamento térmico à 50°C por 30 minutos pode ser suficiente para controlar "*Cylindrocarpon*" spp., entretanto não é suficiente para *Cadophora luteo-olivacea* e *Phaeoacremonium* spp. Testes in vitro realizados por Bleach et al. (2013) com três espécies de "*Cylindrocarpon*", demonstraram que temperaturas inferiores à 50°C foram efetivas para inibir o crescimento dos patógenos.

No Brasil são cultivadas videiras do Norte ao Sul do país, o que caracteriza a diversidade da viticultura brasileira. Dessa forma, existe a necessidade de se conhecer o efeito da utilização do tratamento de água quente no controle de fungos causadores de doenças de tronco na videira, visto que não existem relatos da utilização desta técnica nas condições brasileiras.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a sensibilidade de 12 isolados de fungos causadores de doenças de tronco em videira submetidos a diferentes combinações de temperatura e tempo de tratamento térmico in vitro.

Material e Métodos

Os 12 isolados utilizados no experimento foram obtidos a partir de isolamentos de plantas de videira de espécies *Vitis vinifera* ou *V. labrusca* que continham sintomas de declínio em diferentes partes da planta, como ramo, tronco, ponto de enxertia, colo e raiz, de diferentes locais e cultivares plantadas no Brasil (Tabela 1). Foram utilizados três isolados de *Lasiodiplodia theobromae*, dois de *Lasiodiplodia brasiliense* e *Phaeomoniella chlamydospora*, um de *Botryosphaeria* sp., *Phaeoacremonium parasiticum*, *Campylocarpon fasciculare*, “*Cylindrocarpon*” sp. e *Fusarium* sp.

Tabela 1 – Características dos isolados utilizados no experimento.

Espécie	Isolado*	Ano	Local	Cultivar	Idade
<i>L. theobromae</i>	CMM-0307	2012	Petrolina - PE	313/Crimson Seedless	7 anos
<i>L. theobromae</i>	CMM-0384	2012	Petrolina - PE	313/Crimson Seedless	7 anos
<i>L. theobromae</i>	CMM-0820	2012	Petrolina - PE	572/Itália	12 anos
<i>L. brasiliense</i>	CMM-0354	2012	Petrolina - PE	Harmony/Festival	8 anos
<i>L. brasiliense</i>	CMM-0418	2012	Petrolina - PE	313/Crimson Seedless	7 anos
<i>Camp. fasciculare</i>	CMM-4273	2012	Petrolina - PE	Italia/572	2 meses
<i>Phaeo. parasiticum</i>	CMM-4320	2012	Petrolina - PE	Itália/313	6 anos
<i>Pcl. chlamydospora</i>	CMM-4340	2012	São Vicente Férrer - PE	Isabel	20 anos
<i>Pcl. chlamydospora</i>	157 TD	2012	Pinto Bandeira - RS	Chardonnay/Cabernet 116	8 anos
<i>Botryosphaeria</i> sp.	164 TD	2012	Farroupilha - RS	Moscato Giallo/SO4	1 ano
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	176 TD	2012	Farroupilha - RS	Chardonnay/Paulsen 1103	9 anos
<i>Fusarium</i> sp.	171 TD	2012	Bento Gonçalves - RS	Itália/Paulsen 1103	3 anos

*Isolados depositados na: CMM = Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Prof. Maria Menezes” da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE (Recife – PE); Isolados: 157, 164, 176 e 171 TD (TD: trunk disease) depositados na Coleção de Microrganismos do Laboratório de Fitopatologia/Instituto Federal do Rio Grande do Sul – IFRS/Campus Bento Gonçalves.

As colônias de fungos foram repicadas em meio BDA e incubadas em uma câmara incubadora BOD à 25°C durante uma semana para os isolados: *Fusarium* sp., *Botryosphaeria* sp., *Lasiodiplodia theobromae* e *L. brasiliense*, duas semanas para “*Cylindrocarpon*” sp. e *Campylocarpon fasciculare* e quatro semanas para

Phaeomoniella chlamydospora e *Phaeoacremonium parasiticum*. Após o período de incubação, sete fragmentos com 5 mm de diâmetro foram retirados das colônias e colocados em microtubos de 2,0 ml, contendo 1,3 ml de água destilada autoclavada (Figura 1A), de acordo com metodologia adaptada de Gramaje et al. (2010).

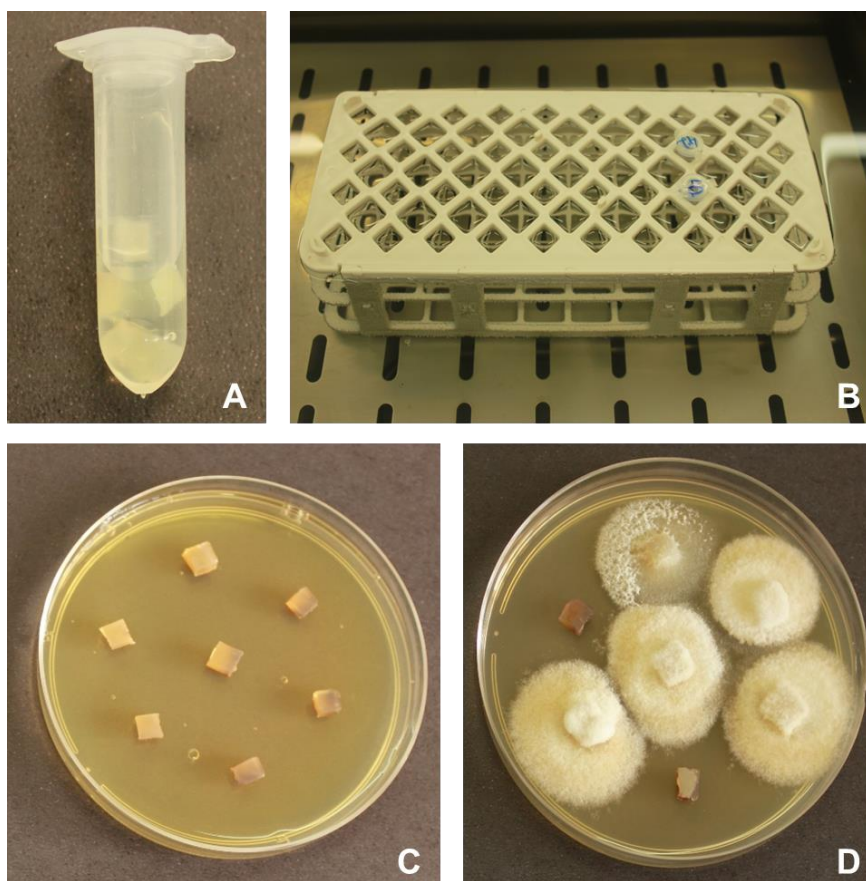


Figura 1. Protocolo de tratamento térmico in vitro; A: fragmentos de meio em microtubo de 2mL; B: microtubos acondicionados em estante plástica submersa em tanque de banho maria permitindo regular as diferentes temperaturas; C: fragmentos de meio plaqueados em placa de Petri após o tratamento térmico; D: placa de Petri exemplificando o crescimento fúngico ou não dos fragmentos de meio após o tratamento térmico.

Os microcubos foram acondicionados ao acaso em uma estante plástica em um tanque com aquecimento controlado (Figura 1B) e mantidos nas combinações de temperaturas (30, 35, 40, 45, 50 e 60°C) e intervalos de tempo (10, 20, 30, 40, 50, 60 e 120 minutos) programados. Após os tratamentos, os microtubos foram imediatamente mergulhados em um recipiente contendo água fria por cinco minutos, com o objetivo de parar o processo de tratamento térmico (GRAMAJE et al., 2010).

Após o resfriamento, os fragmentos foram retirados dos microtubos e colocados sobre papel filtro estéril para a retirada do excesso de água e em seguida plaqueados em placas de Petri contendo meio BDA comercial e incubados à 25°C, com fotoperíodo de 12 horas (Figura 1C). Como testemunha aos tratamentos, as colônias de cada fungo foram repicadas e incubadas à 25°C em BOD. O experimento foi realizado em duplicata conforme descrita por Gramaje et al. 2010.

A avaliação consistiu na verificação do desenvolvimento ou não da colônia a partir de cada fragmento (Figura 1D), considerando-se o período de uma semana para *Fusarium* sp., *Botryosphaeria* sp., *Lasiodiplodia theobromae* e *L. brasiliense*, duas semanas para "*Cylindrocarpon*" sp. e *Campylocarpon fasciculare* e quatro semanas para *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium parasiticum* (adaptado de GRAMAJE et al., 2010). A análise estatística foi feita levando-se em consideração os fatores: temperatura e tempo e sua interação ou não, através de análise de variância no programa SPSS, em delineamento fatorial, com 14 repetições.

Resultados e Discussão

Todos os isolados avaliados, sem exceção, não tiveram seu crescimento micelial inibido nas temperaturas de 30, 35 e 40°C nas diferentes combinações de tempo. O efeito do tratamento de água quente para o isolado de *Fusarium* sp. (171TD) foi determinante a partir da temperatura de 55°C. O crescimento micelial foi totalmente inibido a partir da combinação de 55°C por 30 minutos (Figura 2), o que em comparação com as demais espécies estudadas mostra que esse patógeno foi mais tolerante ao tratamento.

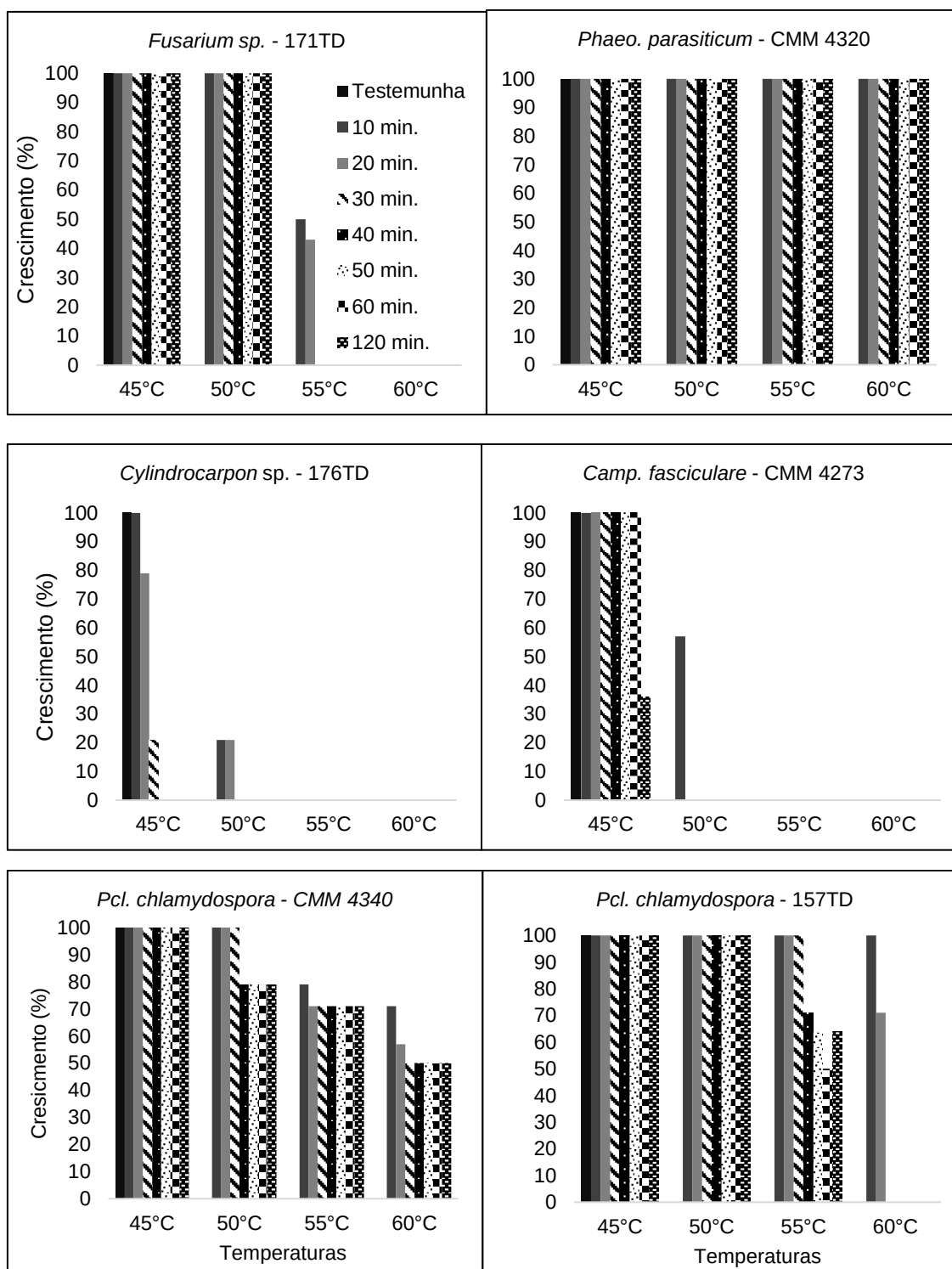


Figura 2. Percentual de crescimento micelial após o tratamento de água quente para *Fusarium* spp.(171TD), *Phaeo. parasiticum* (CMM 4320) *Cylindrocarpon* spp. (176TD), *Camp. fasciculare* (CMM 4273) e *Pcl. chlamydospora* (CMM 4320 e 157TD).

O isolado de *Phaeoacremonium parasiticum* (CMM 4320) foi tolerante a todas as combinações de temperatura e tempo de tratamento com água quente avaliados, caracterizando-se como a espécie mais tolerante dentre as avaliadas no trabalho (Figura 2). Este resultado com tolerância às diferentes combinações

de temperatura e tempo de tratamento térmico, difere do observado em trabalho realizado na Espanha por Gramaje et al. (2008) com dois isolados da mesma espécie, sendo observada uma tolerância de até 53°C por 30 minutos e de 54°C por 45 minutos.

Dentre os isolados avaliados, o mais sensível ao TAQ foi o isolado de “*Cylindrocarpon*” sp. (176TD), onde os tratamentos à 45°C por 40 minutos e 50°C por 30 minutos foram suficientes para inibir totalmente o crescimento micelial (Figura 2). Estes resultados corroboram os trabalhos de Gramaje et al. (2010) que obtiveram inibição completa do crescimento micelial a partir de 48°C por 45 minutos para *Cyl. liriodendri* e *Cyl. macrodidymum*. Bleach et al. (2009) também obtiveram resultados semelhantes in vitro controlando a germinação conidial de *Cyl. liriodendri*, *Cyl. macrodidymum* e *Cyl. destructans* com temperaturas variando de 40 à 50°C por 15 a 30 minutos de tratamento de água quente.

Para o isolado *Camp. fasciculare* (CMM 4273), na combinação de 45°C por 120 minutos, houve uma redução de 64% do crescimento micelial, sendo este inibido a partir de 50°C por 20 minutos (Figura 2). Este resultado confirma os resultados já obtidos para espécies associadas ao Pé-Preto, onde temperaturas superiores a 47°C por 30 minutos inibiram o crescimento micelial de *Ilyonectria radicola*, *I. liriodendri* e *I. macrodidyma* (BLEACH et al., 2013).

O resultado obtido para os isolados “*Cylindrocarpon*” spp. e *Camp. fasciculare* sugerem que o tratamento de água quente padrão (50°C 30 min) em material propagativo de videira utilizado em muitos locais do mundo (HALLEEN et al., 2007; GRAMAJE et al., 2010) poderia ser suficiente para controlar espécies pertencentes a estes gêneros também aqui no Brasil.

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 (Figura 2). Entretanto, para o isolado 157TD da mesma espécie, o crescimento micelial foi completamente inibido após tratamento à 60°C por 30 minutos (Figura 2). Os resultados reforçam a diferença na suscetibilidade de isolados da mesma espécie, como observado por Gramaje et al. (2008), onde o crescimento micelial de um isolado de *Pcl. chlamydospora* foi totalmente inibido a partir de 51°C por 30 minutos, enquanto que para outro isolado da mesma espécie, foram necessários 30 minutos de tratamento à 53°C.

Para os dois isolados de *L. brasiliense* (CMM 354 e 418), houve redução no crescimento micelial a partir de 55°C. Para os isolados CMM 354, o crescimento micelial foi totalmente inibido com 20 minutos de tratamento, enquanto que para o isolado CMM 418, foram necessários 30 minutos de tratamento (Figura 3).

Em trabalho realizado com espécies causadoras de podridão descendente, como por exemplo, *Diplodia seriata*, verificou-se completa inibição do crescimento a partir de 50°C por 45 minutos, enquanto que outra espécie como *Neofusicoccum vitifusiforme* tolerou tratamento à 54°C por 45 minutos, havendo uma redução no crescimento e sua completa inibição (ELENA et al., 2015).

A sensibilidade ao tratamento de água quente para os isolados de *L. theobromae* (CMM 307, 384 e 820) foi diferente para cada isolado (Figura 3). Para o isolado CMM 820, verificou-se tolerância a tempos maiores de tratamento, tendo seu crescimento micelial totalmente inibido somente a partir de tratamento a 60°C por 20 minutos.

Para os isolados CMM 307 e 384, somente a partir de 50°C por 120 minutos houve redução no crescimento micelial. Para o isolado CMM 384, a partir de 55°C por 20 minutos, não se verificou crescimento micelial, enquanto para o isolado CMM 307, somente a partir da temperatura de 55°C não se registrou crescimento micelial em nenhum dos intervalos de tempo avaliados (Figura 3). Elena et al. (2015) relataram o controle do crescimento micelial de um isolado da mesma espécie a partir de tratamento à 53°C por 45 minutos e 54°C por 30 minutos.

O crescimento micelial do isolado de *Botryosphaeria* sp. (164TD) foi completamente inibido a partir da combinação de 50°C por 60 minutos. Dentre os isolados avaliados pertencentes ao grupo de fungos causadores de podridão descendente, este foi o isolado mais sensível (Figura 3). Em trabalho semelhante realizado por Elena et al. (2015) com um isolado da mesma espécie, os autores observaram inibição completa do crescimento micelial a partir de 52°C por 45 minutos, não havendo também crescimento a partir de 53°C por 15 minutos.

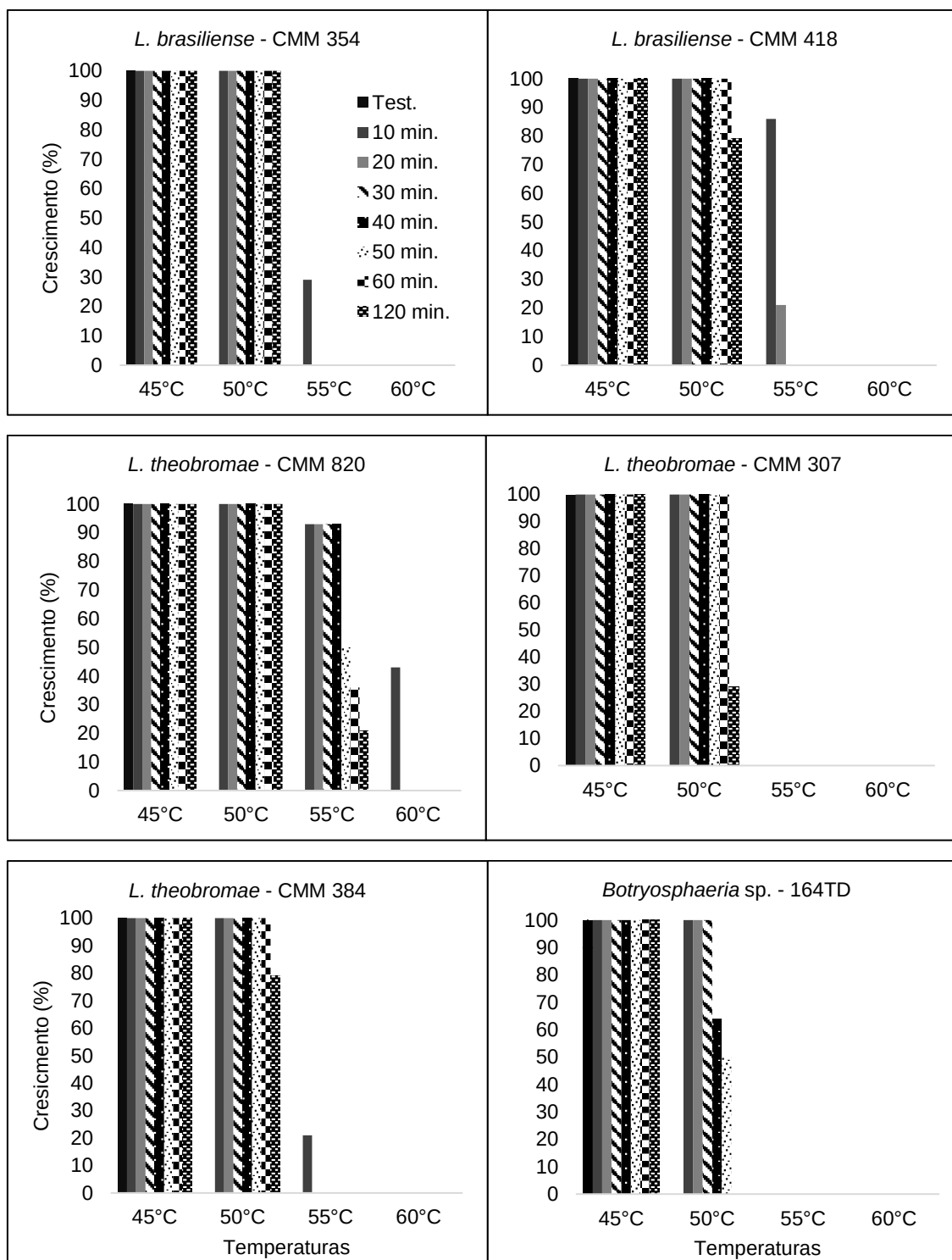


Figura 3. Percentual de crescimento micelial após o tratamento de água quente para *L. brasiliense* (CMM 354 e 418), *L. theobromae* (CMM 307, 384 e 820) e *Botryosphaeria* spp. (164TD).

Os resultados demonstram que em virtude da diferente sensibilidade às combinações de temperatura e tempo de tratamento térmico dos isolados avaliados, o protocolo de tratamento com água quente a ser utilizado no material propagativo deve ser adequado às espécies presentes no material vegetativo (GRAMAJE et al., 2010). Os resultados demonstram que os patógenos

“*Cylindrocarpon*” sp. (176TD), *Botryosphaeria* spp. (164TD) e *Camp. fasciculare* (CMM 4273) foram os isolados mais sensíveis ao TAQ.

Houve efeito significativo ($P < 0.001$) para o fator temperatura e para todas as espécies avaliadas, observando-se redução do crescimento com o aumento da temperatura e do intervalo de tempo de tratamento (Tabela 2). O fator tempo de tratamento térmico foi significativo à 1% de probabilidade em todos os isolados, com exceção do isolado *L. brasiliense* (CMM 354) que foi significativo somente à 5% de probabilidade.

Tabela 2 – Análise de variância para o efeito de temperatura e tempo de tratamento térmico sobre o crescimento micelial dos isolados.

Isolado		Temperatura (A)		Tempo (B)		A x B	
		P > F	F	P > F	F	P > F	F
<i>L. theobromae</i>	CMM 307	0,000	3566,154	0,000	23,077	0,000	23,077
<i>L. theobromae</i>	CMM 384	0,000	3845,826	0,000	5,445	0,000	4,311
<i>L. theobromae</i>	CMM 820	0,000	101,697	0,000	14,971	0,000	8,045
<i>L. brasiliense</i>	CMM 354	0,000	2746,866	0,006	3,682	0,000	3,641
<i>L. brasiliense</i>	CMM 418	0,000	1701,782	0,000	24,859	0,000	19,429
<i>Camp. fasciculare</i>	CMM 4273	0,000	1984,124	0,000	20,050	0,000	14,281
<i>Phaeo. parasiticum</i>	CMM 4320	~~	~~	~~	~~	~~	~~
<i>Pcl. chlamydospora</i>	CMM 4340	0,000	21,000	0,000	15,333	0,000	2,794
<i>Pcl. chlamydospora</i>	157TD	0,000	118,637	0,000	41,251	0,000	19,476
<i>Botryosphaeria</i> sp.	164TD	0,000	771,668	0,000	28,901	0,000	27,394
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	176TD	0,000	730,537	0,000	30,289	0,000	18,661
<i>Fusarium</i> sp.	171TD	0,000	596,897	0,000	7,970	0,000	7,742

P > F: Probabilidade associada com teste F individual.

Conclusões

Os isolados estudados apresentaram diferentes níveis de sensibilidade ao tratamento de água quente, sendo necessário ajustar a combinação tempo e temperatura de acordo com o patógeno a ser controlado.

Os isolados mais sensíveis ao tratamento de água quente avaliados neste trabalho foram “*Cylindrocarpon*” sp. (176TD), *Botryosphaeria* sp. (164TD) e *Camp. fasciculare* (CMM 4273).

Agradecimentos

Ao professor José Carlos Fachinello *in memoriam* pelos ensinamentos.

Ao IFRS – *Campus* Bento Gonçalves pelo apoio técnico e estrutura de pesquisa.

Referências

AGUSTÍ-BRISACH, C.; GRAMAJE, D.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Detection of black-foot disease pathogens in the grapevine nursery propagation process in Spain. **European Journal of Plant Pathology**, v.137, p.103-112, 2013.

ALMANÇA, M.A.K.; ABREU, C.M.de.; 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. Embrapa Uva e Vinho, **Comunicado Técnico 134**, 5p., 2013.

AROCA, Á.; GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; RAPOSO, R. Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. **European Journal of Plant Pathology**, v.126, p.165-174, 2010.

BLEACH, C.M.; JONES, E.E.; JASPERS, M.V. Hot water treatment for elimination of *Cylindrocarpon* species from infected grapevines. **Phytopathologia Mediterranea**, v.48, p. 183, 2009.

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.

BLOCK, K.L.; ROLSHAUSEN, P.E.; CANTU, D. In search of solutions to grapevine trunk diseases through “crowd-sourced” science. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, 4 p. 2013.

CORREIA, K. C.; CÂMARA, M. P. S.; BARBOSA, M. A. G.; SALES JUNIOR, R.; AGUSTÍ-BRISACH, C.; GRAMAJE, D.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ABAD-CAMPOS, P.; ARMENGOL, J.; MICHEREFF, S. J. Fungal species associated with trunk diseases of table grapes in Northeastern Brazil. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 52, n. 2, p.380–387. 2013.

CROUS, P.W.; GAMS, W. *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov. a casual organism of Petri grapevine decline and esca. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 39, p. 112-118, 2000.

ELENA, G.; DI BELLA, V.; ARMENGOL, J.; LUQUE, J. Viability of *Botryosphaeriaceae* species pathogenic to grapevine after hot water treatment. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 54, n. 2, p. 325–334, 2015.

FOURIE, P.H.; HALLEEN, F. Investigation on the occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* in canes of rootstock mother vines. **Australasian Plant Pathology**, v. 31, p. 425-426, 2002.

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**, v. 29, n. 3, p. 322- 324, 2004.

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

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

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

GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J. Effects of hot-water treatment, post-hot-water treatment colling 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.; MAÑAS, F.; LERMA, M.L.; MUÑOZ, R.M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Effect of hot-water treatment on grapevine viability, yield components and composition of must. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 20, p. 144–148, 2014.

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

HALLEEN, F.; CROUS, P.W.; PETRINI, O. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. **Australasian Plant Pathology**, v. 32, p. 47–52, 2003.

HALLEEN, F.; SCHROERS, H.J.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). **Studies in Mycology**, v. 50, p. 431-455, 2004.

HALLEEN, F.; FOURIE, P.H.; CROUS, P.W. A review of black foot disease of grapevine. **Phytopathologia Mediterranea**, v.45(Suppl.), 55-67, 2005.

HALLEEN, F.; SCHROERS, H.J.; GROENEWALD, J.Z.; REGO, C.; OLIVEIRA, H.; CROUS, P.W. *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevines. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 227-234, 2006.

HALLEEN, F.; FOURIE, P. H.; CROUS, P. W. Control of black foot disease in grapevine nurseries. **Plant Pathology**, v. 56, p. 637-645, 2007.

HALLEEN, F.; FOURIE, P.H. An integrated strategy for the proactive management of grapevine trunk disease pathogen infections in grapevine nurseries. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 37, n. 2, 2016.

KHAN, A.; WHITING, C.; ROONEY, S.; GUBLER, W.D. Pathogenicity of three species of *Phaeoacremonium* spp. on grapevine in California. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 39, p. 92-99, 2000.

LOMBARD, L.; VAN DER MERWE, N.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. Lineages in Nectriaceae: Re-evaluating the generic status of *Ilyonectria* and allied genera. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 53, p. 515–532, 2014.

MOSTERT, L., HALLEEN, F., FOURIE, P.H. & CROUS, P.W. A review of *Phaeoacremonium* species involved in Petri disease and esca of grapevines. **Phytopathologia Mediterranea**, v.(Suppl.) 45, p. 12-29, 2006.

RETIEF, E.; MCLEOD, A.; FOURIE, P.H. Potential inoculum sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in South African grapevine nurseries. **European Journal of Plant Pathology**, v. 115, p. 331-339, 2006.

SANTOS, R.F. dos; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B.; HECKLER, L.; FINGER, G.; MACIEL, C.G.; HAKAWA, R.; GARRIDO, L.R. First report of *Ilyonectria macrodidyma* associated with black foot disease of grapevine in Brazil. **Plant Disease**, v.98, n.1, p.156, 2013a.

SANTOS, R.F. dos; BLUME, E.; SILVA, G.B.P. da; LAZAROTTO, M.; SCHEEREN, L.E.; ZINI, P.B.; BASTOS, B.O.; REGO, C. First report of *Ilyonectria robusta* associated with black foot disease of grapevine in southern Brazil. **Plant Disease**, v. 98, n. 6, p. 845-1, 2013b.

SANTOS, R.F. dos; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B.; STECKLING, S.M.; BURTET, G .W.; HAKAWA, R.; GARRIDO, L.R.; REINIGER, L.R.S. First Report of “*Cylindrocarpon*” *pauciseptatum* Associated with Black Foot Disease of Grapevine in Brazil. **Plant Disease**, v.98, n.4, p.567, 2014.

SCHECK, H.J.; VASQUEZ, S.J.; FOGLE, D.; GUBLER, W.D. Grape growers report losses to black foot and grapevine decline. **California Agriculture**, v. 52, p. 19-23, 1998a.

SCHECK, H.J.; VASQUEZ, S.J.; GUBLER, W.D.; FOGLE, D. First report of black-foot disease caused by *Cylindrocarpon obtusisporum* of grapevines in California. **Plant Disease**. v. 82, n. 5, p. 590, 1998b.

SERRA, S.; MANNONI, M.A.; LIGIOS, V.; DEMONTIS, A. Effect of combined hot water and cyproconazole on the eradication of *Phaeomoniella chlamydospora* from grapevine planting material. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 48, p. 185-186, 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.61-76, 2011.

SPARAPANO, L.; DE LEONARDIS, S.; CAMPANELLA, A.; BRUNO, G. Interaction between esca-associated fungi, grapevine calli and micropropagated shoot cultures of grapevine. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 40, p. 35-43, 2001.

VAN NIEKERK, J.M., CROUS, P.W., GROENEWALD, J.Z., FOURIE, P.H.; HALLEEN, F. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 781-798, 2004.

VAN NIEKERK, J.M.; FOURIE, P.H.; HALLEEN, F.; CROUS, P.W. *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 45(Suppl.), p. 43-54, 2006.

VAN NIEKERK, J.M.; BESTER, W.; HALLEEN, F.; CROUS, P.W.; FOURIE, P.H. First record of *Lasiodiplodia crassispora* as a pathogen of grapevine trunks in South Africa. **Plant Disease**, v. 94, n. 8, p. 1063, 2010.

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.; MAY, P.; BOSSINGER, G. Variations in phytosanitary and other management practices in Australian grapevine nurseries. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 52, n.2, p. 369-379, 2013.

WALLACE, J.; EDWARDS, J.; PASCOE, I.G.; MAY, P. *Phaeomoniella chlamydospora* inhibits callus formation by grapevine rootstock and scion cultivars. In: **3rd International Workshop on Grapevine Trunk Diseases**, Lincoln, New Zealand, p. 24, 2003.

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

7 Artigo 4

Tratamento de água quente no controle de *Botryosphaeria* sp. inoculada artificialmente em estacas de videira

Sabrina Lerin¹, Marcus André Kurtz Almança², Daniel Santos Grohs³, Paulo

Mello-Farias¹, Marcos Botton³

¹Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário Capão do Leão, s/n, CEP: 96900-010. Pelotas, RS. sabrinalerin@gmail.com, mello.farias@ufpel.edu.br. ²Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Av. Osvaldo Aranha 540, CEP: 95700-206. Bento Gonçalves, RS. marcus.almanca@bento.ifrs.edu.br. ³Embrapa Uva e Vinho, Rua Livramento 515, CEP: 95701-008. Bento Gonçalves, RS. daniel.grohs@embrapa.br, marcos.botton@embrapa.br.

Resumo

Espécies pertencentes à família *Botryosphaeriaceae* têm sido relacionadas à podridão descendente em videiras adultas e à infecção de material propagativo de videira. Nesse trabalho, foi avaliado o efeito de combinações de temperatura e tempo de tratamento com água quente (TAQ) no controle de *Botryosphaeria* sp. (164TD) em estacas da cultivar Bordô (*Vitis labrusca*) inoculadas artificialmente. A inoculação com micélio de *Botryosphaeria* sp. foi efetuada através de perfuração no centro da estaca, incubadas por uma semana à temperatura ambiente e após tratadas a 50 e 53°C por 30 minutos, 51°C por 30, 45 e 60 minutos e comparadas com a testemunha. Nenhum dos tratamentos realizados evitou o crescimento de *Botryosphaeria* sp. Não houve diferença significativa quanto à incidência entre os tratamentos. A melhor resposta (redução de 20% da severidade) foi obtida com o TAQ a 51°C por 60 minutos.

Termos para indexação: *Vitis labrusca*, tratamento térmico, doença de tronco da videira

Hot water treatment in the control of *Botryosphaeria* spp. artificially inoculated on vine cuttings

Abstract

Species belonging to the family *Botryosphaeriaceae* have been associated with decline in adult vines and infection of vine propagation material. In this work, was evaluated the effect of temperature and time combinations of hot water treatment (HWT) on the control of *Botryosphaeria* sp. (164TD) on cuttings of the cultivar Bordô (*Vitis labrusca*) artificially inoculated. Inoculation with mycelium of *Botryosphaeria* sp. was performed by drilling in the center of the cuttings, incubated for one week at room temperature and after being treated at 50 and 53°C for 30 minutes, 51°C for 30, 45 and 60 minutes and compared with the control treatment. None of the treatments performed prevented the growth of *Botryosphaeria* sp. There was no significant difference in incidence between

treatments. The best response (20% reduction in severity) was obtained with the TAQ at a temperature of 51°C for 60 minutes.

Index-terms: *Vitis labrusca*, heat treatment, grapevine trunk disease.

Introdução

Espécies da família Botryosphaeriaceae causam cancrios em troncos e morte de muitos hospedeiros, incluindo a videira, podendo inclusive existir de forma endofítica e latente em alguns hospedeiros (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007). Pesquisas conduzidas em vinhedos reportaram a presença de espécies de Botryosphaeriaceae associadas ao declínio e morte de plantas de videira (ÚRBEZ-TORRES et al., 2006a; 2006b; VAN NIEKERK et al., 2006; PITT et al., 2010) inclusive no Brasil (GARRIDO et al., 2004).

Acredita-se que o inóculo origina-se de madeira doente, seja de videiras ou restos de poda, onde picnídios exsudam conídios na condição de alta umidade (VAN NIEKERK et al., 2010) sendo que estes podem ser dispersados pela água da chuva a curtas distâncias (ÚRBEZ-TORRES et al., 2010). Desta forma, o material propagativo também é uma fonte de inóculo para a videira. Pesquisas conduzidas na África do Sul relataram a presença de espécies de *Botryosphaeria* tanto em ferimentos de poda, como nas extremidades basais de um ramo de dois anos (FOURIE; HALLEEN, 2004). Na Espanha sua presença foi constatada nas extremidades basais de ramos (AROCA et al., 2010).

Na Nova Zelândia, foi observada a presença de espécies de Botryosphaeriaceae (acima de 23%) em mudas enxertadas, portaenxertos e estacas de cultivares copa assintomáticas (BILLONES-BAAIJENS et al. 2013a; 2013b). Em mudas de viveiros comerciais e em matrizeiros também observaram a incidência de propágulos de Botryosphaeriaceae sobre a superfície de 33 a 100% das estacas avaliadas, além de registrar DNA de Botryosphaeriaceae nos equipamentos de enxertia, na formação de calo e no tanque de hidratação das estacas.

Alternativas de controle de patógenos causadores de doenças de tronco, como a utilização de tratamento de água quente (TAQ) têm sido utilizadas com sucesso, no controle de patógenos como a Doença de Petri, com tratamento a 50°C por 30 minutos em estacas (GRAMAJE et al., 2009) na Espanha e na África

do Sul (FOURIE; HALLEEN, 2004) para patógenos associados ao Pé-Preto (HALLEEN et al., 2007) e também para patógenos associados a podridão descendente (BILLONES-BAAIJENS et al., 2015; ELENA et al., 2015).

Em trabalho realizado na Espanha com espécies de *Botryosphaeria* em estacas inoculadas artificialmente e tratadas a 50-53°C por 30 minutos, observou-se redução drástica da sobrevivência dos patógenos após 30 minutos de tratamento a 51°C (ELENA et al., 2015). Na Nova Zelândia, em estudo semelhante foi relatado que estacas do portaenxerto 5C, previamente infectadas com *Neofusicoccum luteum* e *N. parvum*, tratadas a 50°C por 30 minutos resultou na incidência de infecção de 55 e 100% respectivamente, enquanto que no tratamento a 53°C a redução da incidência foi de 0 e 8,5%. No entanto, essa combinação acabou ocasionando a morte das gemas (BILLONES-BAAIJENS et al., 2015), inviabilizando o material.

O objetivo deste trabalho foi avaliar combinações de temperatura e tempo de tratamento de água quente no controle de *Botryosphaeria* spp. em estacas inoculadas artificialmente.

Material e Métodos

O isolado de *Botryosphaeria* sp. (164TD) utilizado no experimento foi obtido da Coleção de Microrganismos do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Federal do Rio Grande do Sul/Campus Bento Gonçalves obtido através do isolamento do ponto de enxertia da cultivar Moscato Giallo enxertada sobre SO4. Esse material foi coletado em 2012, na zona rural do município de Farroupilha - RS, em uma planta com um ano de idade, apresentando sintomas de clorose.

Para utilização no experimento, o isolado foi retirado da coleção e cultivado em placas de Petri contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) à 25°C por quatro dias. Antes da inoculação, o isolado foi cortado em fragmentos de 3 mm de diâmetro.

Antes de serem inoculadas, 20 estacas da cultivar Bordô (*Vitis labrusca*), oriundas de jardim clonal da Embrapa Uva e Vinho, armazenadas em câmara fria entre 2°C e 4°C por quatro meses, com 9 cm de entrenó, foram esterilizadas por 30 segundos em etanol 70%, 5 minutos em hipoclorito de sódio 0,35% e

novamente por 30 segundos em etanol 70% (HALLEEN et al., 2003) e deixadas secar na câmara de fluxo laminar sobre papel toalha esterilizado por uma hora (BLEACH et al., 2013).

Uma perfuração de aproximadamente 3 mm que expôs a medula, foi feita com um furador de rolha de 4 mm (Figura 1A) no meio do entrenó de cada estaca (Figuras 1B e 1C) de acordo com a metodologia proposta por Billones-Baaijens et al. (2015).

A perfuração foi imediatamente preenchido com o micélio previamente fragmentado e fechado com a casca retirada no momento da perfuração e com uma única camada de Parafilm®. Todas as estacas foram incubadas por uma semana (Figura 1D) a temperatura ambiente para permitir o crescimento micelial dentro da estaca (BILLONES-BAAIJENS et al., 2015).

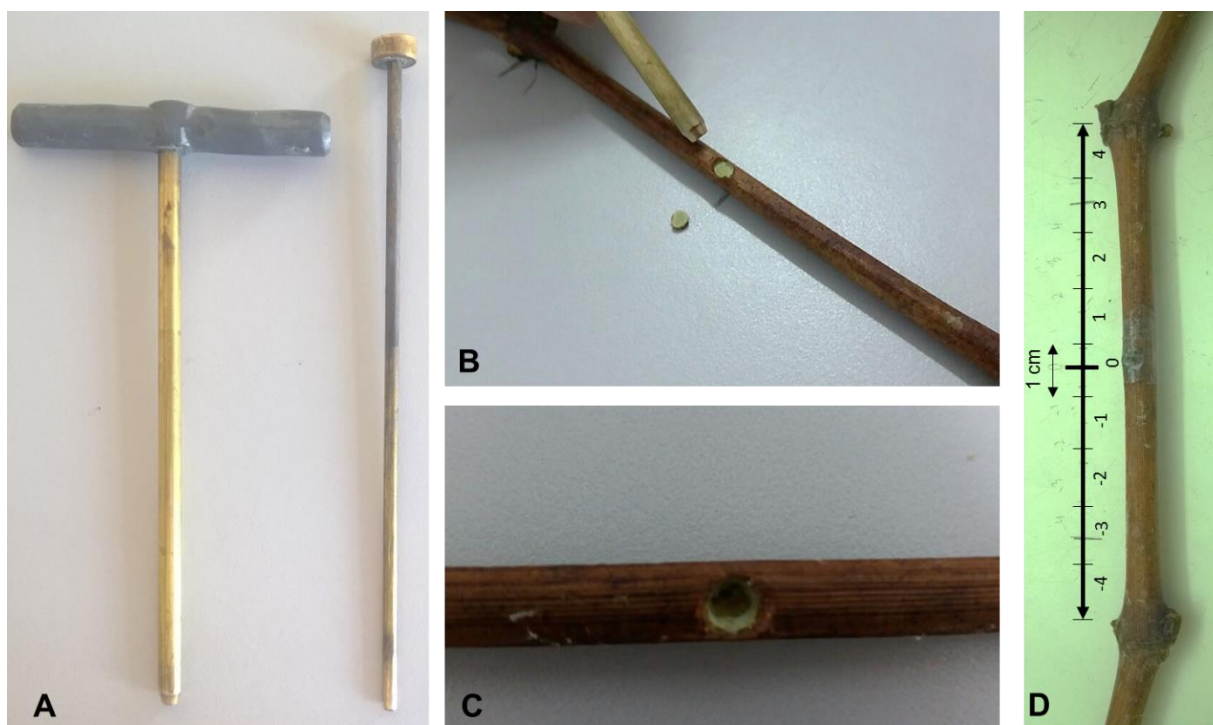


Figura 1. Protocolo de inoculação; A: furador de rolha de 4mm; B: perfuração realizada no meio da estaca; C: detalhe do furo feito até atingir a medula da estaca; D: estaca após inoculação com indicação dos pontos para posterior reisolamento.

O tratamento de água quente foi feito uma semana após a inoculação. As estacas foram agrupadas com uma fita. Os tratamentos consistiram em: testemunha, com água fria por 30 minutos, 50°C por 30 min, 51°C por 30, 45 e 60 min e 53°C por 30 minutos. Após o TAQ as estacas ficaram na água com temperatura ambiente por uma hora para esfriarem.

Após o resfriamento, as estacas foram secas sobre toalhas de papel em câmara de fluxo laminar durante duas horas, sendo em seguida colocadas em sacos plásticos individuais a temperatura ambiente por 24 horas (BILLONES-BAAIJENS et al., 2015).

Decorridas 24 horas da inoculação, as estacas foram esterilizadas superficialmente por imersão em etanol a 70% por 30 segundos e flambadas. Para cada estaca uma seção de 4 cm acima e abaixo do ponto de inoculação (~9 cm) foi removida e dividida em segmentos de 1 cm. Os segmentos foram colocados em placas com meio BDA com sua posição rotulada e incubados por sete dias em temperatura ambiente para avaliação de incidência e severidade (BILLONES-BAAIJENS et al., 2015).

A presença do fungo em qualquer um dos nove segmentos indicou a incidência do patógeno e o número de segmentos infectados indicou a severidade da doença de acordo com Billones-Baaijens et al. (2015). Os dados foram submetidos à análise de variância no programa SPSS e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,001$). A relação entre o ponto de inoculação e as posições de isolamento foram testadas com o teste Qui-quadrado de Pearson (BILLONES-BAAIJENS et al., 2015).

Resultados e Discussão

Para todos os tratamentos avaliados a incidência de *Botryosphaeria* sp. foi de 100%. A severidade no tratamento a 50°C por 30 minutos foi equivalente à testemunha, sem TAQ (Tabela 1). Os tratamentos a 51°C por 30 e 45 minutos e 53°C por 30 minutos apresentaram redução na severidade, mas não diferiram significativamente da testemunha. O tratamento a 51°C por 60 minutos diferiu significativamente da testemunha, reduzindo em 20% a severidade.

Os dados obtidos nesse trabalho indicam que, apesar de bons resultados de controle in vitro do patógeno, quando se trata da realização do tratamento de água quente em material propagativo a resposta pode ser diferente.

Tabela 1. Percentual médio de incidência e severidade em estacas de 'Bordô' tratadas com diferentes temperaturas e tempos de tratamento de água quente uma semana após inoculação com *Botryosphaeria* sp.

Tratamento com água quente	Incidência (%)	Severidade (%)
50°C - 30 min	100,0	100,0 a ¹
51°C - 30 min	100,0	98,9 a
51°C - 45 min	100,0	98,3 a
51°C - 60 min	100,0	80,0 b
53°C - 30 min	100,0	96,1 a
Sem TAQ	100,0	100,0 a

¹ Letras diferentes na coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P<0.001). TAQ: tratamento com água quente.

Em trabalho conduzido na Espanha, Elena et al. (2015) observaram completa inibição do crescimento micelial in vitro, de um isolado de *Botryosphaeria dothidea* a 52°C por 45 minutos e 53°C por 15 minutos. Quando a avaliação foi realizada através de inoculação artificial de estacas, observaram redução de 100% nas temperaturas de 51, 52 e 53°C por 30 minutos, enquanto que na temperatura de 50°C pelo mesmo intervalo de tempo, houve redução de 63,5%.

Quanto à incidência de infecção ao longo dos nove segmentos da estaca avaliados, foi observado efeito significativo entre a distância e número de segmentos infectados para os tratamentos a 51°C por 30 e 60 minutos e 53°C por 30 minutos. A partir dos isolamentos, observa-se que na testemunha e no tratamento a 50°C por 30 minutos houve incidência de 100% em todas as posições avaliadas. Esse tratamento corroborou com os resultados que mostraram a tolerância do isolado de *Botryosphaeria* sp. (164TD) ao TAQ a 50°C por 50 minutos.

No tratamento a 51°C por 60 minutos foi observado um efeito altamente significativo da incidência de infecção ao longo das posições da estaca, o que permite inferir sobre a importância do efeito do tempo de tratamento no controle deste patógeno, como sobre a tolerância de cada espécie. Billones-Baaijens et al. (2015) relataram redução total de infecção por *Neofusicoccum luteum* a partir de 53°C por 30 e 60 minutos, enquanto que para *N. parvum* a redução da incidência foi de 50% e 15% respectivamente, em trabalho realizado na Austrália.

Na Figura 2A, pode-se observar o crescimento fúngico no ponto de inoculação na estaca e a partir dos segmentos retirados da estaca em placas de Petri (Figura 2B).

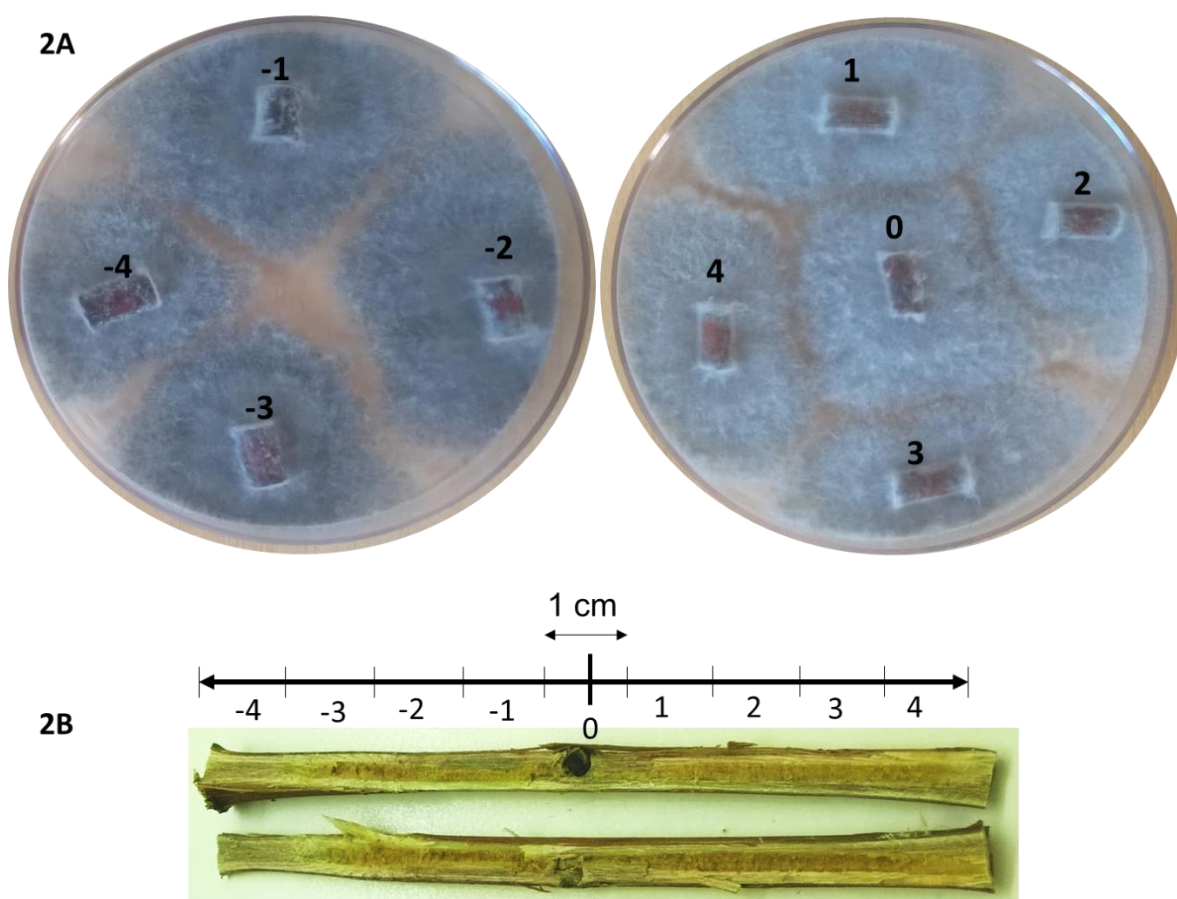


Figura 2. 2A: placas contendo os nove segmentos retirados da estaca com as posições rotuladas; 2B: estaca com 9 cm de entrenó e marcações demonstrando os nove segmentos (1cm) feitos no momento do reisolamento. Detalhe do crescimento fúngico na estaca percebido através do escurecimento do ponto de inoculação.

Em experimento semelhante, Bleach et al. (2013) relatam a inibição do crescimento micelial in vitro de *Cylindrocarpon* spp. quando submetidos a 47°C por 30 minutos. No entanto, em estacas inoculadas houve ausência de crescimento do patógeno somente a 48,5°C por 30 minutos, o que revela a interação entre patógeno, hospedeiro e aplicação do TAQ. Fatores referentes ao manejo dos viveiros, como cultivar, comprimento e diâmetro da estaca e/ou muda, a época de coleta do material, tempo de hidratação e refrigeração em água pós-TAQ, assim como as condições de armazenamento podem afetar significativamente a tolerância do material ao TAQ (WAITE; MAY, 2005).

Tabela 2. Incidência de infecção de *Botryosphaeria* sp. em posições contínuas ao longo de segmentos da estaca, com 0 indicando o ponto de inoculação, números negativos seções de 1 cm abaixo e números positivos seções de 1 cm acima da posição 0, após diferentes tratamentos de água quente realizados após uma semana da inoculação.

Tratamento de água quente	Seções do tecido a 1 cm de distância do ponto de inoculação (0)									Sig. ²
	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	
50°C - 30 min	20 ¹	20	20	20	20	20	20	20	20	ns
51°C - 30 min	19	20	20	20	20	20	19	20	20	0,019
51°C - 45 min	19	19	19	20	20	20	20	20	20	ns
51°C - 60 min	15	16	18	19	18	14	15	16	13	0,000
53°C - 30 min	19	19	19	20	20	20	20	18	18	0,019
Sem TAQ	20	20	20	20	20	20	20	20	20	ns

¹ Referente a 20 repetições. ² Associação entre as seções de tecido infectado e a distância do ponto de inoculação pelo teste Qui-Quadrado de Pearson ($P < 0.05$) e ($P < 0.001$); ns: não significativo. TAQ: tratamento com água quente.

Conclusões

A combinação a 51°C por 60 minutos de tratamento de água quente é eficaz na redução da severidade de *Botryosphaeria* sp. inoculada artificialmente em estacas da cultivar Bordô.

Agradecimentos

Ao professor José Carlos Fachinello *in memoriam* pelos ensinamentos.

Ao IFRS – Campus Bento Gonçalves pelo apoio técnico e estrutura de pesquisa.

Referências

AROCA Á.; GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; RAPOSO, R. Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. And *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, p. 165–174, 2010.

BILLONES-BAAIJENS R.; RIDGWAY, H.J.; JONES, E.E.; CRUICKSHANK, R. H.; JASPERS, M.V. Prevalence and distribution of Botryosphaeriaceae species in New Zealand grapevine nurseries. **European Journal of Plant Pathology**, v. 135, p. 175–185, 2013a.

BILLONES-BAAIJENS R.; JONES, E.E.; RIDGWAY, H.J.; JASPERS, M.V. Inoculum sources of Botryosphaeriaceae species in New Zealand grapevine nurseries. **European Journal of Plant Pathology**, v. 135, p. 159–174, 2013b.

BILLONES-BAAIJENS, R.; JASPERS, M.; ALLARD, A.; HONG, Y.; RIDGWAY, H.; JONES, E. Management of Botryosphaeriaceae species infection in grapevine propagation materials. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 54, n.2, p.355-367, 2015.

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.

ELENA, G.; DI BELLA, V.; ARMENGOL, J.; LUQUE, J. Viability of Botryosphaeriaceae species pathogenic to grapevine after hot water treatment. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 54, n. 2, p. 325–334, 2015.

FOURIE P.H.; HALLEEN, F. Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagating material. **Plant Disease**, v. 88, p. 1241–1245, 2004.

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**, v. 29, p. 322-324, 2004.

GRAMAJE D.; ARMENGOL, J.; SALAZAR, D.; LÓPEZ-CORTÉS, I.; GARCIA-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, 2009.

HALLLEN, F.; CROUS, P.W.; PETRINI, O. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. **Australasian Plant Pathology**, v. 32, p. 47-52, 2003.

HALLEEN F.; FOURIE, P.H.; CROUS, P.W. Control of black foot disease in grapevine nurseries. **Plant Pathology**, v. 56, p. 637–645, 2007.

PITT W.M.; HUANG, R.; STEEL, C.C.; SAVOCCHIA, S. Identification, distribution and current taxonomy of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine decline in New South Wales and South Australia. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 16, p. 258–271, 2010.

SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 90–106, 2007.

ÚRBEZ-TORRES, J.R.; LEAVITT, G.M.; VOEGEL, T.M.; GUBLER, W.D. Identification and distribution of Botryosphaeria spp. associated with grapevine cankers in California. **Plant Disease**, v. 90, p. 1490–1503, 2006a.

ÚRBEZ-TORRES J.R.; GUBLER, W.D.; PELÁEZ, H.; SANTIAGO, Y.; MARTÍN, C.; MORENO, C. Occurrence of *Botryosphaeria obtusa*, *B. dothidea*, and *B. parva* associated with grapevine trunk diseases in Castilla y León region, Spain. **Plant Disease**, v. 90, p. 835–835, 2006b.

ÚRBEZ-TORRES J.R.; BATTANY, M.; BETTIGA, L.J.; GISPERT, C.; MCGOURTY, G.; RONCORONI, J.; GUBLER, W.D. Botryosphaeriaceae species spore-trapping studies in California vineyards. **Plant Disease**, v. 94, p. 717–724, 2010.

VAN NIEKERK J.M.; FOURIE, P.H.; HALLEEN F.; CROUS, P. 2006. Botryosphaeria spp. as grapevine trunk disease pathogens. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 45, p. 43–54, 2006.

VAN NIEKERK J.M.; CALITZ, F.J.; HALLEEN, F.; FOURIE, P.H. Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens in South Africa. **European Journal of Plant Pathology**, v. 127, p. 375–390, 2010.

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.

8 Considerações finais

A falta de uma legislação sobre produção de mudas de videira agrava a discussão em torno da obtenção de mudas com qualidade fitossanitária, uma vez que são necessários também padrões mínimos de qualidade fisiológica, que norteiem os viveiristas durante o processo de produção e garantam ao viticultor a aquisição de material propagativo com características adequadas e capacidade produtiva esperada, acabando com os infortúnios entre viveiristas e viticultores.

O tratamento com água quente é uma alternativa de controle de fungos patogênicos e pragas utilizado em várias culturas em vários países. Os artigos desenvolvidos expressam o potencial da utilização do tratamento de água quente no Brasil. Apesar de ainda necessitar de alguns ajustes, a tecnologia é promissora na utilização durante o processo de propagação de mudas por viveiristas no controle ou redução de patógenos causadores de doenças de tronco da videira.

A utilização do tratamento de água quente é uma tecnologia sustentável e portanto, viável e de fácil aplicação, que pode ser adequada aos diversos tamanhos de viveiros presentes no Brasil.

Afim de melhorar a eficiência desta tecnologia nas condições singulares de cada região produtora de uva, estudos para identificar os fungos presentes no solo, nos matrizeiros e mudas devem ser realizados, assim como, avaliar o efeito do tratamento com água quente sobre a viabilidade de cultivares copa e portaenxertos em outras regiões antes de sua aplicação em longa escala.

Estudos também devem ser realizados visando combinar a tecnologia com outros métodos de controle, como o químico e o biológico, além de trabalhos na melhoria do processo de propagação de mudas, que é uma das principais fontes de contaminação e disseminação de patógenos causadores de doenças de tronco.

Apesar da facilidade de aplicação do tratamento de água quente, é importante o conhecimento geral de como manejar o material que será submetido ao tratamento, antes, durante e após o tratamento, a fim de evitar danos ao material propagativo.

A presente tese cumpriu com o objetivo de avaliar a utilização do tratamento de água quente no controle de patógenos causadores de doenças de tronco na videira na produção de mudas, apresentando resultados promissores e pontos a serem melhorados para a utilização comercial por viveiros.

9 Anexo

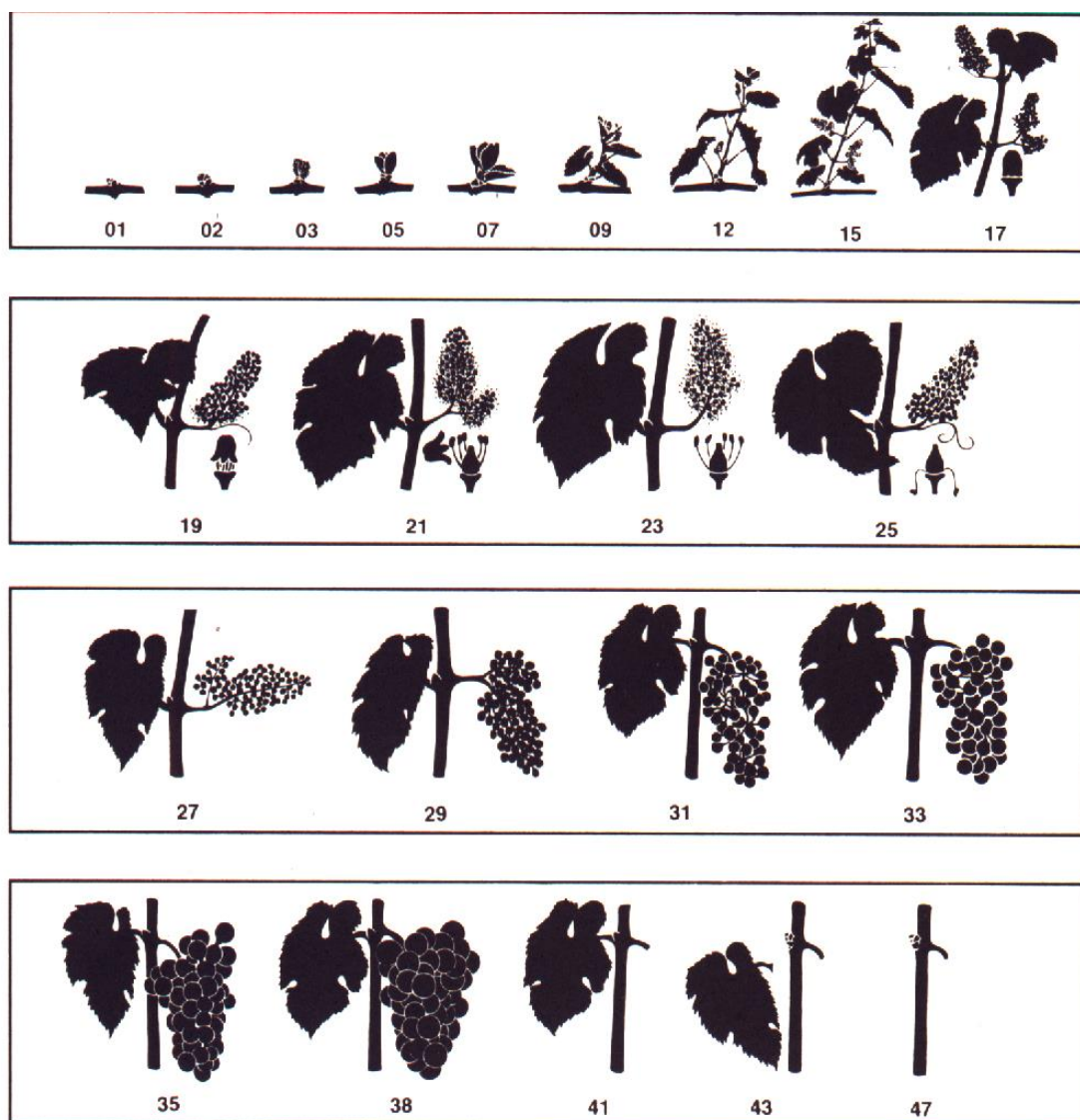


Fig. 1. Estádios fenológicos da videira de acordo com Eichhorn & Lorenz.

- | | |
|--|---|
| 01 - gemas dormentes | 23 - 50% das flores abertas (pleno florescimento) |
| 02 - inchamento de gemas | 25 - 80% das flores abertas |
| 03 - algodão | 27 - frutificação (limpeza de cacho) |
| 05 - ponta verde | 29 - grãos tamanho "chumbinho" |
| 07 - 1ª folha separada | 31 - grãos tamanho "ervilha" |
| 09 - 2 ou 3 folhas separadas | 33 - início da compactação do cacho |
| 12 - 5 ou 6 folhas separadas; inflorescência visível | 35 - início da maturação |
| 15 - alongamento da inflorescência; flores agrupadas | 38 - maturação plena |
| 17 - inflorescência desenvolvida; flores separadas | 41 - maturação dos sarmentos |
| 19 - início de florescimento; 1ª flores abertas | 43 - início da queda de folhas |
| 21 - 25% das flores abertas | 47 - final da queda de folhas |

EICHHORN, K.W.; LORENZ, D.H. Phaenologische entwicklungsstadien der rebe. **European and Mediterranean Plant Protection Organization**, v.14, n.2, p.295-298, 1984.