

CAPÍTULO 4

Manejo Fitossanitário: Manejo de Doenças da Videira na Campanha Gaúcha

Fabio Rossi Cavalcanti

4.1. Introdução

Com uma extensão territorial considerável, a Campanha impõe características agroclimáticas com variabilidade suficiente para que, em épocas específicas do ano, possa favorecer o aparecimento de doenças típicas da viticultura, essencialmente as causadas por fungos. Na região, foi verificado que, em função das variações no número total de dias em relação às épocas de brotação e o desenvolvimento fenológico, evidenciados em diferentes municípios, o aparecimento das principais doenças segue o padrão típico observado na Serra Gaúcha, com a sequência: antracnose/escoriose, míldio e podridões do cacho (Lobato et al., 2017).

O míldio é considerado a principal doença da videira, tanto pela abrangência geográfica - presente em todos os vinhedos do mundo em regiões temperadas e úmidas - como também pela sua capacidade destrutiva. A doença é causada por um microrganismo chamado *Plasmopara viticola* (Berk & Curtis) Berl & de Toni. O processo de parasitismo é favorecido com médias térmicas entre 20-26°C associadas à alta umidade relativa do ar. Os propágulos do microrganismo são espalhados pelo vento e podem penetrar via folhas, inflorescências, flores, bagas e demais partes da planta. Manchas amareladas nas folhas (manchas de óleo) aparecem e necrosam, promovendo desfolha da planta. Na parte de baixo, há a formação de uma pulverulência branca com estruturas microscópicas do patógeno. O ataque na inflorescência e na fase de floração ocasiona os maiores prejuízos na produção, com o abortamento das flores e conseqüente má formação dos cachos.



Figura 1. Manchas definidas de cor castanho-negras em ramos e pecíolos, sintoma típico de antracnose em videira.

Plantas com antracnose também foram evidenciadas em vinhedos da Campanha (Figura 1). A presença nos vinhedos do fungo causador da antracnose, *Elsinoe ampelina* (de Bary) Shear, associada a condições ambientais parecidas com a do míldio são favoráveis ao desenvolvimento dessa doença, mas em estádios fenológicos anteriores. O fungo pode sobreviver em restos culturais infectados da safra anterior, podendo permanecer no vinhedo se um manejo adequado de remoção de material infectado não for feito. Folhas e ramos infectados mostram manchas pequenas castanho-escuras, deformações e até mesmo perfurações ou cancrios. Nas inflorescências, ocorre seca e queda de botões florais. Após o desenvolvimento dos cachos, a infecção pode se estender para o pedúnculo e para as bagas, causando perdas de produção. Acompanhando a janela fenológica da antracnose, a *escoriose* também deve ser controlada nos vinhedos gaúchos. Períodos chuvosos associados a uma ampla faixa de temperatura o fungo *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc. pode penetrar em brotações, em sua fase inicial. Também pode incidir nos frutos, reduzindo a produção e a qualidade da baga. Os sintomas têm semelhança com a antracnose e, se a doença não for controlada em safras sucessivas, *P. viticola* pode matar a planta.

Um dos problemas de doença mais preocupantes da vitivinicultura da Campanha são as podridões do cacho. As principais evidenciadas na região foram a *podridão da uva-madura* causada por *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H.Schrenk, que produz sintomas de manchas marrom-avermelhadas mais facilmente reconhecidas entre a maturação e a colheita dos cachos, e a *podridão cinzenta* causada por *Botrytis cinerea*, com sintomas que vão do marrom ao acinzentado-escuro por causa do mofo desenvolvido sobre as lesões. O fungo também ataca nervuras foliares, pecíolos e ráquis, ocasionando desfolhas. Também foram relatadas podridão amarga (*Greeneria uvicola* (Berk. & M.A. Curtis) Punith) e a *podridão ácida*, causada por microrganismos oportunistas que se aproveitam de fermentos provocados em bagas por drosófilas (moscas do vinagre). As podridões do cacho são fontes de grande preocupação para os vitivinicultores e técnicos de vinícolas

da região, por causa das altas perdas imediatas de investimento por doenças que danificam o produto final da safra.

A região da Campanha Gaúcha, por suas características de relevo com extensões em planície pouco escarpadas, favorece a implantação de sistemas de cultivo e de proteção de plantas mecanizados. Essa possibilidade se converte em aumentos de produção bruta e produtividade, com melhor aproveitamento de mão de obra especializada e manutenção de preços acessíveis ao consumidor. A mecanização agrícola é uma necessidade para o controle de doenças em vitiviniculturas de extensão, como é o caso. Isso porque os tratamentos fungicidas para as principais doenças da videira são realizados por pulverização de copa, seguindo calendários específicos (e diversificados) de intervalos, produtos comerciais, ingredientes ativos e grupos químicos. Tais calendários muitas vezes seguem critérios gerais muito flexíveis, influenciados por pontos de vista técnicos de agrônomos e representantes comerciais, mas cujo objetivo é o mesmo: o controle eficaz de doenças e qualidade da safra e do produto final (Lobato et al., 2017).

Por fim e não menos importante, outro problema “silencioso” e latente que foi evidenciado na vitivinicultura da Campanha: a questão das podridões do tronco da videira (*Grapevine Trunk Diseases – GTD*), ou, problemas de declínio e morte de plantas de videira na região. Em comparação com a situação da vitivinicultura da Serra Gaúcha que engloba pequenos produtores familiares, a vitivinicultura da Campanha tem sido conduzida com maior preocupação técnica, devido, dentre outros fatores, à abordagem empresarial mais recente por parte das grandes vinícolas implantadas na região. Isso se reflete em uma melhor adoção dos princípios de instalação de vinhedos novos com mudas certificadas e de qualidade superior. No entanto, mesmo com essa preocupação por parte das grandes vinícolas, foram evidenciados patógenos associados às podridões de tronco da videira. Atualmente, essas podridões representam os principais desafios técnicos para a fitopatologia da videira, no mundo todo.

Em paralelo à questão do controle convencional de doenças, fortemente adotada pelas vinícolas da Campanha, ações buscando alta eficiência no controle por métodos alternativos também têm sido levadas em consideração por produtores e vinícolas da região. No entanto, mesmo com a busca por substâncias e métodos biológicos de controle alternativo visando à vitivinicultura orgânica e à redução do uso de produtos a base de cobre para controle de doenças nos vinhedos, a mecanização impulsionada por trator continua como a principal tecnologia de aplicação de substâncias, capaz de cobrir as extensões de vinhedos orgânicos. Por outro lado, na Campanha, a mecanização parece ceder espaço para os trabalhos manuais apenas no momento da safra, quando há uma adoção de calendários de colheita e vinificação de pequenas parcelas, para que as vinícolas possam ter um rígido controle da sanidade e maturação da sua matéria prima.

4.2. Detalhamento das ações de pesquisa

Como apoio da parte da Fitopatologia para o estabelecimento da Indicação de Procedência para Campanha Gaúcha, ações de pesquisa foram selecionadas para prospectar e, na medida do possível, dar encaminhamento e soluções para questões técnicas:

1. Levantamento e monitoramento das principais doenças em vinhedos da Campanha;
2. Coleta, identificação e registro dos isolados fitopatogênicos associados a doenças típicas;
3. Obtenção dos ajustes ideais para esquemas de proteção de planta envolvendo controle químico;

4. Experimentação, configuração e validação do uso do sistema *Thermal Pest Control* (TPC) consorciado ou não com controle químico;
5. Experimentação e validação de esquemas alternativos de proteção de vinhedos, envolvendo elicitores e/ou controle biológico;
6. Estabelecimento de medidas e práticas culturais para o controle de doenças em vinhedos da Campanha;
7. Recomendações de adoção de bases de resistência genética para doenças em porta-enxertos;

4.2.1. Levantamento e monitoramento das principais doenças em vinhedos da Campanha, e obtenção dos ajustes ideais para esquemas de proteção de planta envolvendo controle químico

Com relação aos itens (i) e (iii) da lista de tarefas de 4.2., devido à gigantesca diversidade e variedade de dados associados aos esquemas de controle químico que são adotados pelas vinícolas da Campanha Gaúcha, calendários de pulverização das safras de 2013/2014 foram utilizados para o desenvolvimento de um Método de Análise Exploratória Multivariada (AEM) para caracterização da proteção de vinhedos contra doenças.

Esse método AEM foi considerado razoável e adequado para abordar o fato de que, nos ciclos produtivos de vinhedos comerciais (manejo convencional da videira), diferentes esquemas de pulverização de fungicidas sintéticos são aplicados, em diferentes vinhedos da mesma vinícola e/ou em diferentes vinícolas. Embora a sequência de doenças da videira a serem combatidas ao longo do ciclo produtivo siga basicamente um calendário similar em toda a Metade Sul do RS, os esquemas de pulverização são frequentemente montados de modos diferentes, irregulares e heterogêneos entre si, por diferentes técnicos. Mesmo dentro de uma mesma vinícola.

Foram parceiras da pesquisa as vinícolas: Almadén, Dunamis, Guatambú, Nova Aliança, Seival/ Miolo e Peruzzo, gentilmente fornecendo informações sobre seus esquemas de controle.

A AEM abordou: intervalo de aplicação (I); marca comercial do fungicida (M); ingrediente ativo (IA); grupo químico (G) e dosagem (m/v) em 100L de calda (D). Para a matriz de variáveis originais (VO), os calendários de pulverização adotados nos vinhedos estudados foram divididos em 40 momentos (n=40 indivíduos). A matriz VO serviu para análise de *clusters* (dendogramas) para cada variável estudada, por Distância Euclidiana. Análises de Fatores (AF) e de Componentes Principais (ACP) foram realizadas a partir de autovalores (Av) e matrizes de autovetores extraídos das VOs não transformadas-padronizadas. Na presente pesquisa, foram verificados seis componentes principais (CP), pelo critério de Kaiser (1960), ($Av > 1,00$) e variância explicada acumulada $> 70\%$ (Lobato et al., 2017).

4.2.2. Caracterização de fungos fitopatogênicos associados a podridões de tronco da videira

Isolados de patógenos do tronco obtidos de plantas de videira doentes na região da Campanha foram usados em um levantamento do estado do Rio Grande do Sul sobre o tema, e apresentados no 10º *workshop* internacional de doenças do tronco da videira (10th IWGTD, realizado em Reims, França, no ano de 2017). O estudo tratou da caracterização de novas linhagens de agentes causais

de doenças do tronco da videira (GTD) isoladas de vinhas doentes encontradas em vinhedos do sul do Brasil, entre 2013 e 2016. Ao todo, 30 isolados de patógenos fúngicos do tronco (*Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium* sp., *Fusarium* sp., *Ilyonectria macrodidyma*, *Neofusicoccum parvum* e *Botryosphaeria dothidea*) foram morfológicamente caracterizados e comparados através de dados da sequência de DNA da região do espaçador transcrito interno do DNA ribossomal nuclear (ITS1/2) (Berlatto et al., 2017).

Os alinhamentos de sequência foram testados para a maioria das árvores obtidas em Máxima Parcimônia (MP) a partir dos dados da sequência ITS e 450 replicações de bootstrap e foram comparadas entre si e com as sequências ITS1-2 do Genbank de patógenos GTD de outros países. Paralelamente, testes de patogenicidade com alguns isolados de referência foram realizados em mudas para confirmação dos postulados de Koch. Ensaios de PCR-RFLP (CAPS) com as enzimas de restrição *CfoI* e *HaeIII* foram realizados a fim de caracterizar padrões de fragmentação que possam ser usados para apoiar o diagnóstico rápido desses patógenos em qualquer amostra de videira (Berlatto et al., 2017; Lobato; Cavalcanti, 2021).

4.2.3. Experimentação, configuração e validação do uso do sistema *Thermal Pest Control* (TPC) consorciado ou não com controle químico

No âmbito das atividades de pesquisa inerentes à IP-Campanha, um pedido de caracterização de um método de controle alternativo de doenças chamado *Thermal Pest Control* (TPC) foi completamente atendido, e três publicações técnicas geradas (Monteiro et al., 2014; Cavalcanti et al., 2014a; Cavalcanti, 2014).

O TPC consiste em um implemento para aplicação de ar quente propelido por ventilador e de propulsão por trator (Figura 2). Os equipamentos TPC eram vendidos com promessas de ganhos agronômicos em termos de melhora de polinização, ganho de cor e peso em frutos, teor antioxidante, enrijecimento de casca e ativação de fenômenos associados à Resistência Sistêmica Adquirida (*System Acquired Resistance*, SAR), que é um importante mecanismo de defesa da célula vegetal a infecções por biotróficos (Cavalcanti et al., 2014b).

A primeira publicação apresenta a caracterização completa do tratamento de fluxo de ar quente (FAQ) em videiras em condições de campo, quantificando as variações típicas de temperatura em plantas tratadas com FAQ produzido pelo TPC e determinando o perfil térmico e a velocidade do fluxo quente na saída do implemento. Também foram definidos os limites de tolerância das folhas ao tempo de exposição e às altas temperaturas do fluxo de ar, e foi testado um método equivalente ao tratamento TPC de campo, em escala reduzida, para ser usado em condições controladas (Monteiro et al., 2014). No segundo trabalho foram conduzidas avaliações de diversas combinações de tratamentos TPC baseados em FAQ sobre estruturas da planta e patógeno, em termos de: i) redução do míldio (modelo de estudo) em experimentos de casa de vegetação e campo; ii) investigar atividade de injúria e inibição de estruturas do patógeno (esporangióforos, esporângios e zoósporos de *Plasmopara viticola*) e iii) investigar respostas de IR, por monitoramento de atividades enzimáticas de PR-proteínas, atividade de PPOs, teores de fenóis totais e lignina (Cavalcanti et al., 2014a).

Foto: Fabio R. Cavalcanti



Figura 2. Implemento de ventilação de ar quente (fluxo de ar quente, FAQ) associado à tecnologia Thermal Pest Control (TPC) sendo puxado por trator.

Por fim, o terceiro trabalho investigou o efeito de FAQs de 0,5 s, em dois níveis de temperatura (60 °C e 120 °C), como possível promotor de injúria sobre o tecido foliar em folhas jovens de videira. Para isso, foram monitoradas, por meio de avaliações dentro de um intervalo após a exposição da folha ao FAQ, as atividades das principais enzimas que compõem um sistema antioxidativo vegetal básico. Também foram medidos os danos em membranas provenientes de células foliares e alterações em parâmetros fotossintéticos, em simulação ao tratamento TPC sobre o dossel vegetativo (Cavalcanti, 2014).

4.2.4. Experimentação e validação de esquemas alternativos de proteção de vinhedos, envolvendo elicitores e/ou controle biológico

Esforços para investigar alternativas ao controle de doenças baseado puramente em pesticidas sintéticos foram realizados. Estudos envolvendo diluições, agentes de controle biológico e substitutivos com ação protetora foram realizados tendo como contexto o problema da deposição excessiva de cobre em solos de vinhedos, causada pelo uso por muitos anos de substâncias a base de cobre para controle de doenças. Como a redução do uso de cúpricos é tendência na viticultura orgânica mundial, foi realizado um trabalho de avaliação do controle de míldio em condições de vinhedo, por diferentes diluições da calda bordalesa, reduzindo-se a relação cobre:cal. Além disso, avaliou-se o efeito da redução da porção cobre da calda bordalesa em uma associação com calda sulfocálcica (Fioravanço et al., 2015).

Paralelamente, substituintes ao cobre concentrado foram investigados em experimentos de casa de vegetação e de campo. Buscou-se avaliar o desempenho de glucona de cobre, fosfito de cobre e oxiclreto de cálcio, comparativamente à calda bordalesa para controle do míldio da videira, com potencial aplicação em qualquer modelo de viticultura. Para isso, experimentos de monitoramento de doença foram realizados para avaliar reduções no progresso de lesões e eficiência de proteção de plantas nas cultivares Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*), em casa de vegetação, e Isabel (*Vitis labrusca*) em condições de campo (Cavalcanti et al., 2019).

Ensaio envolvendo substâncias biológicas atuando por mecanismos como Indução de Resistência (IR) e controle biológico foram também realizados. Aqui, foi investigado o desempenho de substâncias baseadas em agentes de controle biológico (Biological Control Agents – BCAs, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* e *Reynoutria sachalinensis*), extrato pirolenhoso e fertilizante organomineral com potencial aplicação como substituintes ao cobre no controle do míldio. Para isso, investigações foram realizadas em condições de casa de vegetação e campo, sendo monitoradas estruturas vegetativas (folhas, em experimentos de casa de vegetação e campo) e reprodutivas (cachos, em condições de campo) das cultivares Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) e Isabel (*Vitis labrusca* L.) (Cavalcanti et al., 2020).

4.2.5. Estabelecimento de medidas e práticas culturais para o controle de doenças em vinhedos da Campanha

Para atendimento dessa demanda, um compêndio sobre o assunto foi sintetizado e inserido em um programa de Produção Integrada para a cadeia produtiva de uvas para processamento. Tal esforço fez parte de uma iniciativa mantida pela Embrapa Uva e Vinho e do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento para divulgação de informação técnica atualizada sobre o controle de doenças em vinhedos (Cavalcanti; Garrido, 2015).

4.2.6. Recomendações de adoção de bases de resistência genética para doenças em porta-enxertos

Para mitigar a ameaça do declínio e morte de plantas de videira associados a fungos causadores de podridões de tronco, dois caminhos são usualmente aceitos como soluções para o problema: i) a busca por mudas de qualidade superior para implantação de vinhedos novos e ii) resistência genética. Com relação à (i), a Embrapa Uva e Vinho vem, desde 2013, desenvolvendo um programa para produção e transferência de plantas matrizes de videira de qualidade superior, em parceria com a RECIVITIS e financiado pelo sistema SIBRATEC/FINEP, com resultados muito positivos em toda a cadeia produtiva (Grohs et al., 2016).

Paralelamente, um método de prospecção preliminar por resistência genética foi desenvolvido para fenotipagem e seleção de genótipos candidatos a fornecer caracteres associados à resistência e/ou tolerância. A técnica rápida para seleção preliminar de genótipos de videira resistentes a patógenos de tronco se baseia em uma metodologia que possibilita a colocação dentro de um tubo de ensaio uma planta de videira micropropagada (*plantlet*) e, posteriormente, um disco contendo micélio de um fungo causador de podridão do tronco da videira. Este *co-cultivo* possibilita que técnicos possam acompanhar, a olho nu, todo o desenvolvimento de sinais e sintomas específicos das podridões.

Ensaio de co-cultivo planta regenerada (em meio Galzy) *versus* disco micelial de linhagem de fungo causador de podridão puderam ser desenhados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial A x B, sendo o fator A os diferentes genótipos de videira candidatos à verificação de seu nível de resistência/tolerância a podridões do tronco, e o fator B, diferentes isolados (considerando a agressividade) de diferentes fungos causadores de podridões de tronco. As parcelas experimentais (um tubo com um plantlet, uma repetição) foram determinadas em um mínimo de três repetições por tratamento $A_{(i)} \times B_{(j)}$.

Esta técnica traz vantagens para seleção de variedades resistentes a podridões do tronco, tais como: a) facilidade para realização de testes em grandes lotes; b) fácil inoculação; c) ensaios extremamente rápidos (até 30 dias); d) fácil observação de sintomas; e) fácil e precisa quantificação de sintomas; f) baixo custo; g) uso reduzido de repetições e espaço físico, dentre outras (Cavalcanti, 2021a).

4.3. Resultados obtidos

4.3.1. Diferentes esquemas de controle químico adotados na macrorregião Campanha Gaúcha podem ser discriminados por Análise Multivariada

Um método de caracterização do controle químico (esquemas de pulverização) por Análise Exploratória Multivariada (AEM) pôde discriminar e agrupar as diversas abordagens técnicas na Campanha Gaúcha, safra 2013/2014, em função dos vinhedos de cada vinícola (detalhado em 4.2.1). A Análise de Componentes Principais (ACP) gerada a partir da matriz de correlação de variáveis originais *versus* Componentes Principais (VO x CP) revelou que todas as variáveis descritoras do controle químico, ou seja, a marca comercial do fungicida (M), o ingrediente ativo (IA), o grupo químico (G) e a dosagem (m/v) em 100 L de calda (D), explicaram o Fator 1. As variáveis associadas a fungicidas (IA e G) explicaram o Fator 2. O plano fatorial (AF) e a nuvem de variáveis (ACP) 1 *versus* 2 revelaram que o vinhedo “D” seguiu um calendário de pulverização distinto e o vinhedo “A” foi protegido por um grupo específico de fungicidas (Figura 3).

O método conseguiu mapear os diferentes esquemas de pulverizações em função das variáveis estudadas, mostrando que a maioria dos vinhedos recebeu um calendário relativamente homogêneo, com alguns vinhedos apresentando diferenciações no regime de pulverização, principalmente em função das variáveis associadas ao Fator 2 (IA e G).

Neste trabalho, a identificação das vinícolas parceiras foi feita por uma codificação em letras (“A”, “B”, “C” etc) para proteção das fontes, uma vez que os dados gentilmente cedidos foram usados apenas para o desenvolvimento de um método de pesquisa.

Na safra 2013/2014 da região da Campanha Gaúcha, todos os vinhedos protegidos, mesmo os discrepantes, apresentaram eficiência no controle de doenças, em termos gerais. Uma das vantagens do método é que o Plano Fatorial-2D (AF), com as variáveis associadas aos esquemas de controle químico adotados na região da Campanha, poderia incorporar facilmente mais dados (variáveis suplementares), produzindo outros estudos em conjunto com a Análise de Componentes Principais (PCA). Esses estudos, por sua vez, produziriam novas inferências e caracterizações. Um exemplo de bloco de dados a ser naturalmente acrescentado ao método seria uma coluna de variáveis associadas à incidência das doenças (Lobato et al., 2017).

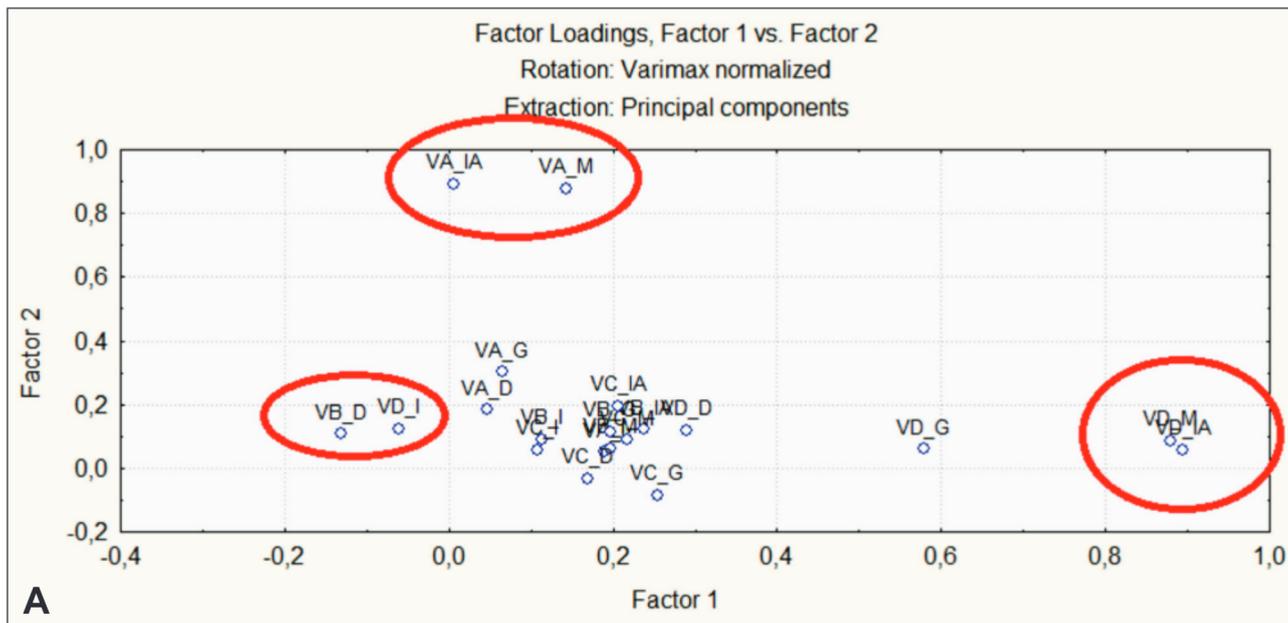
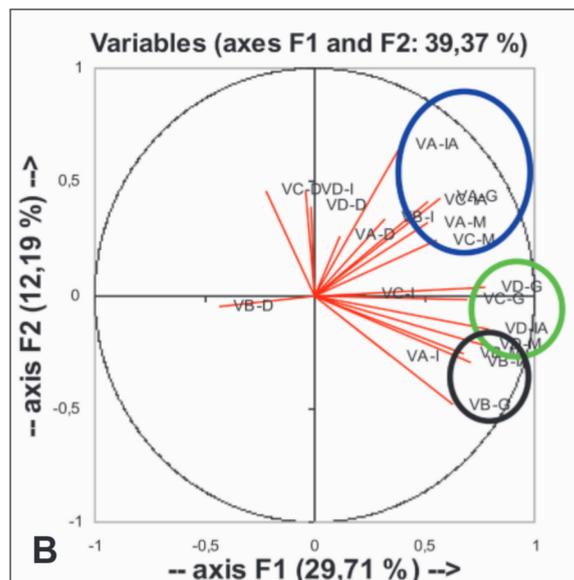


Figura 3. Análise Fatorial (AF) (A). Para a matriz de variáveis originais (VO), os calendários de pulverização adotados nos vinhedos estudados foram divididos em 40 pulverizações (n=40), sincronizadas no tempo. Em (A) o Plano Fatorial para as duas Componentes Principais (CPs) mais representativas (1 e 2), mostrando que ingrediente ativo (IA) e marca (M) dos fungicidas possuem alta relevância para particularização dos esquemas como, por exemplo, no vinhedo “A”. Em (B), temos as C coordenadas fatoriais/2D da Análise de Componentes Principais (PCA), ilustrando a participação relevante das variáveis IA, G e M nos vinhedos A (azul), D (verde) e B (preto).



No entanto, embora esse método tenha facilidade de trabalhar com grande massa de informações (*Big Data*), a aquisição de certos dados pode ser difícil e trabalhosa por prospecção humana (ex. levantamento de incidência de doenças envolvendo avaliadores humanos). Por isso, soluções envolvendo amostragem territorial ainda se fazem necessárias, mesmo que isso acarrete perda de acurácia da AEM. Paralelamente, com o advento de novas tecnologias de imagens envolvendo sensores hiperespectrais em satélites e VANTs (drones), levantamentos mais extensivos de incidência de doença podem ser realizados, aumentando o poder de entrada para o método de AEM proposto.

4.3.2. Grupos de patógenos do tronco da videira estão caracterizados no Rio Grande do Sul, inclusive indivíduos isolados de vinhas de Santana do Livramento

A partir da década de 2000, plantas de videira infectadas por fungos causadores de podridões do tronco vêm sendo evidenciadas de modo crescente na região Sul do Brasil (Cavalcanti et al., 2013).

Doenças como chocolate, doença de Petri e a Esca são exemplos de podridões do tronco causadas por *Phaeoacremonium* spp. e *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M. J. Wingf. & L. Mugnai) Crous & W. Gams. Paralelamente à vigência do projeto IP-Campanha, foi realizado um trabalho de levantamento e caracterização abrangente desses patógenos no estado do Rio Grande do Sul incorporando esta região. No âmbito da Campanha, foi verificada uma prevalência do agente causador da doença de Petri e Esca, o *P. chlamydospora*, tendo sido identificadas, até o último levantamento, três linhagens no município de Santana do Livramento (TD635, TD636 e TD642 referentes aos acessos Genbank/NCBI KY984077, KY984074 e KY984075, respectivamente) (Figura 4). Ajustes para técnica de PCR foram realizados para estudar os isolados locais desses fungos, inclusive com iniciadores específicos (Pmo1/2 e Pch1/2).

Padrões de fragmentação enzimática pelas enzimas *CfoI* e *HaeIII* a partir dos produtos de PCR de todas as regiões estudadas, ITS1/2, BTUB e fator de alongação EF-1 α foram obtidos por PCR-RFLP (CAPS) para facilitar a identificação molecular de material de videira com sintomas de podridão em materiais da Campanha (Figura 5).

De modo geral, a caracterização filogenética das linhagens gaúchas causadoras de podridão, inclusive as encontradas na região da Campanha, apresentou alta similaridade com base nas sequências obtidas da região ITS1/2. Entretanto, foram evidenciadas variações intra- e interespecíficas diferenciadoras de BTUB e EF-1 α para *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp., considerando as delimitações geográficas estudadas e outras áreas de vinhedos no mundo (Berlatto et al., 2017).

4.3.3. *Thermal Pest Control* demonstra uma discreta capacidade para garantir proteção em vinhedos, que precisam de pulverização complementar contra o míldio

Com relação aos estudos para elucidação dos mecanismos físicos associados ao *Thermal Pest Control* (TPC), foi observado que as diferenças de temperatura observadas entre os pontos de medida revelaram falta de uniformidade na distribuição dos volumes de ar aplicados pelo TPC, tanto na direção vertical, quanto na horizontal. O TPC foi capaz de produzir um fluxo de ar quente (FAQ) em altas temperaturas. Porém, o tempo de tratamento se mostrou muito curto, permitindo que apenas uma pequena quantidade de calor fosse transferida para as folhas, resultando em aumento não substancial de temperatura das folhas. Na verdade, o FAQ disponibiliza uma faixa muito estreita de temperatura capaz de discriminar lesões sobre o tecido infectado (contendo o patógeno) de lesões foliares espúrias, causadas por injúria térmica sobre o tecido vegetal clorofilado sadio. Isso dificulta enormemente a regulagem de trabalho do aparelho capaz de levar a um tratamento térmico homogêneo (Monteiro et al., 2014; Cavalcanti, 2014).

Quanto ao efeito biológico da máquina, no contexto de proteção de vinhedos contra o míldio, foi verificado que o FAQ não inativa e nem mata esporângios de *P. viticola*. Na verdade, o FAQ promoveu aumento na atividade de lançamento de zoósporos (estrutura de penetração). Além disso, o FAQ do TPC pareceu suspender para o ar estruturas reprodutivas maduras e ativas do patógeno, reduzindo inóculo na superfície do tecido foliar, mas promovendo sua dispersão.

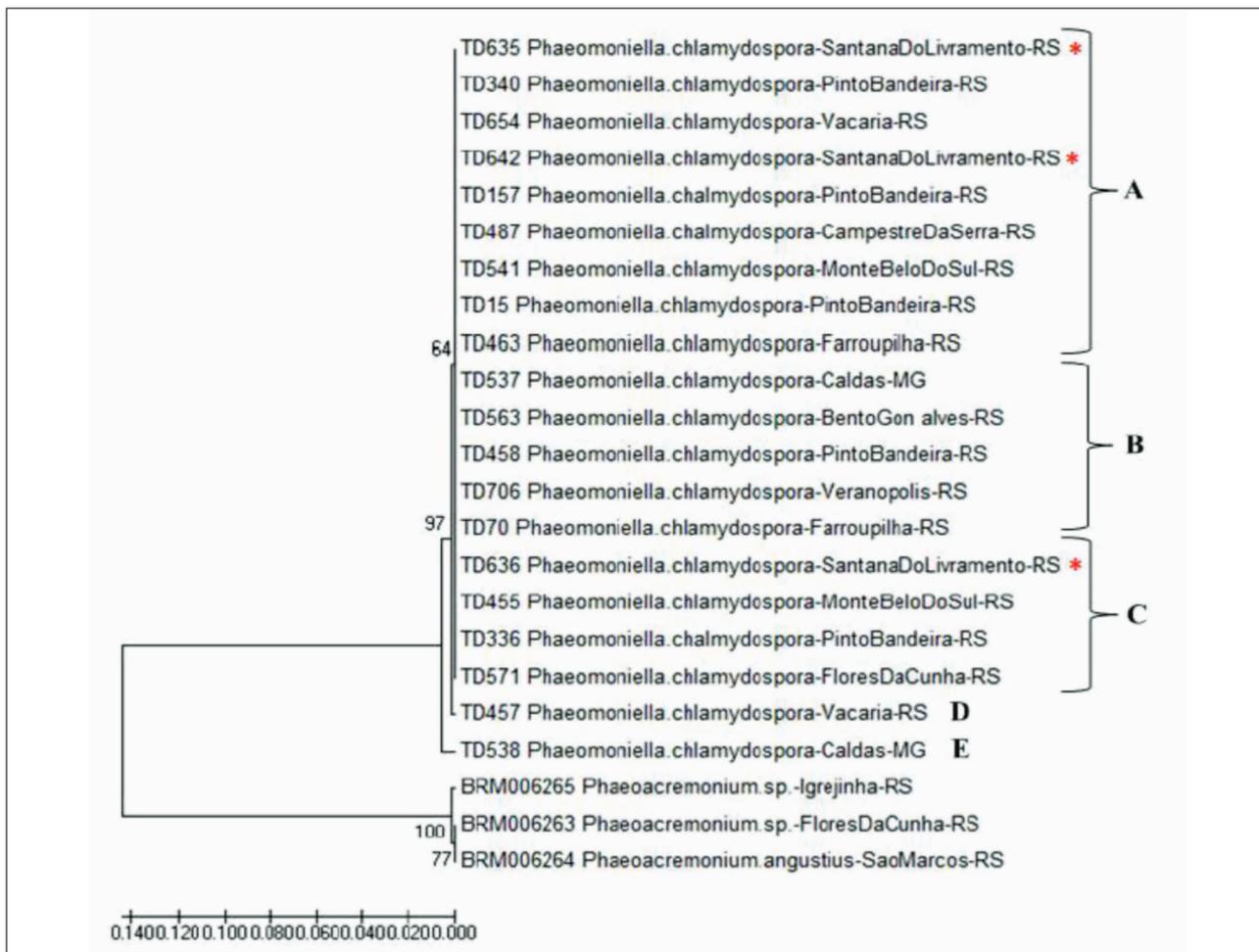


Figura 4. Árvore filogenética reconstruída com base em sequências obtidas da região da β -tubulina do DNA genômico (BTUB) de patógenos de tronco, em vinhedos gaúchos. O método de reconstrução foi o UPGMA com modelo p-distance. Valores de bootstrap foram gerados após 1500 repetições com escala aferida por número de substituições por sítio, 80% de critério de eliminação para gaps, falhas e bases ambíguas. Considerando BTUB, as linhagens obtidas na Campanha se desdobraram em dois grupos, “A” e “C” (asteriscos vermelhos), revelando um indício de polimorfismo e diversidade genética entre as populações desse patógeno na região.

O fluxo de ar quente não induz respostas claras em atividades de β -1,3-glucanases (GLU) e quitinases (CHI), PR-Proteínas associadas à *resistência sistêmica adquirida* (SAR), extraídas de células foliares de ‘Cabernet Sauvignon’ e ‘Bordô’. O fluxo de ar quente promoveu alterações nas atividades de peroxidases (GPX), e, principalmente, em polifenoloxidasas (PPO) de ‘Bordô’, sem acúmulo significativo de lignina, a 72 HAT. A biossíntese de lignina seria o principal papel para as enzimas GPX e PPO na defesa da videira contra patógenos. Aliás, sabe-se que, contra o míldio da videira, um mecanismo de indução de resistência per se parece não ser suficiente para subsidiar um programa de controle do doença mais robusto (Cavalcanti, 2021b). De qualquer modo, diferentes combinações de temperatura de FAQ e número de aplicações não puderam reduzir incidência e severidade do míldio das estruturas vegetativas (folhas), em ambiente controlado (casa de vegetação) e em condições de campo. No entanto, aplicações de FAQ suplementadas a um esquema de controle químico, puderam reduzir lesões de míldio em cachos. Essa observação poderia indicar uma função para o TPC na “limpeza” do botão floral, na fase de floração (Cavalcanti et al., 2014a).

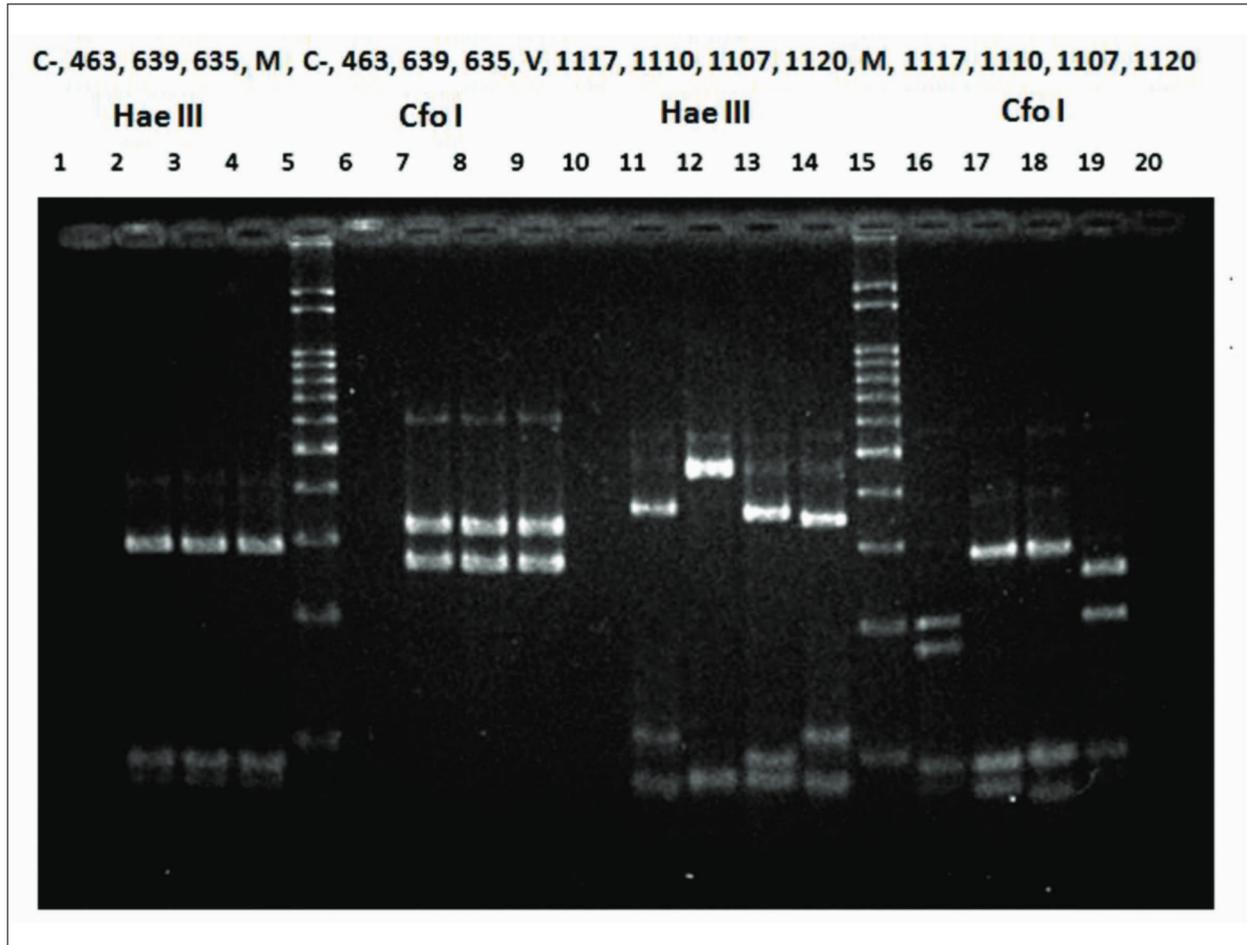


Figura 5. Perfis de restrição com as enzimas HaeIII e CfoI sobre produtos de PCR obtidos da amplificação da região do Espaçador Interno Transcrito, DNA ribossomal ITS1/2. Isolados estudados no gel são: TD463, TD639 (Santana do Livramento-RS), TD635 (Santana do Livramento-RS), TD157, TD537, TD642 (*P. chlamydospora*); TD1117, TD1120 (*Fusarium* sp.) e TD1110, TD1107 (*Ilyonectria* sp.)

4.3.4. Substâncias biológicas podem substituir parcialmente o cobre e produzir controle alternativo aos agroquímicos

Para o controle alternativo do míldio da videira, experimentos em casa de vegetação e em campo foram realizados. Esses ensaios foram conduzidos com o objetivo de buscar substâncias e métodos que pudessem servir como substituintes a calendários intensivos de controle químico, ou mesmo mitigar a introdução de cobre nos vinhedos. Um dos trabalhos envolveu avaliações em campo de diluições sequenciais da calda bordalesa clássica, e uma mistura em tanque com a calda sulfocálcica (Fioravanço et al., 2015). Foi visto que diluições de cobre sobre a calda bordalesa original, com aumento da cal hidratada, não reduziram a proteção do vinhedo ao míldio, tanto nas folhas como nas bagas e cachos (Figura 6). A suplementação de calda sulfocálcica 0,4% na mistura bordalesa foi capaz de sustentar a possível perda de rendimento fungicida da diluição do cobre, mas pode ter causado fitotoxidez em bordaduras. Por isso, mais testes precisam ser feitos para confirmação da eficiência da calda sulfocálcica como substituinte direto.

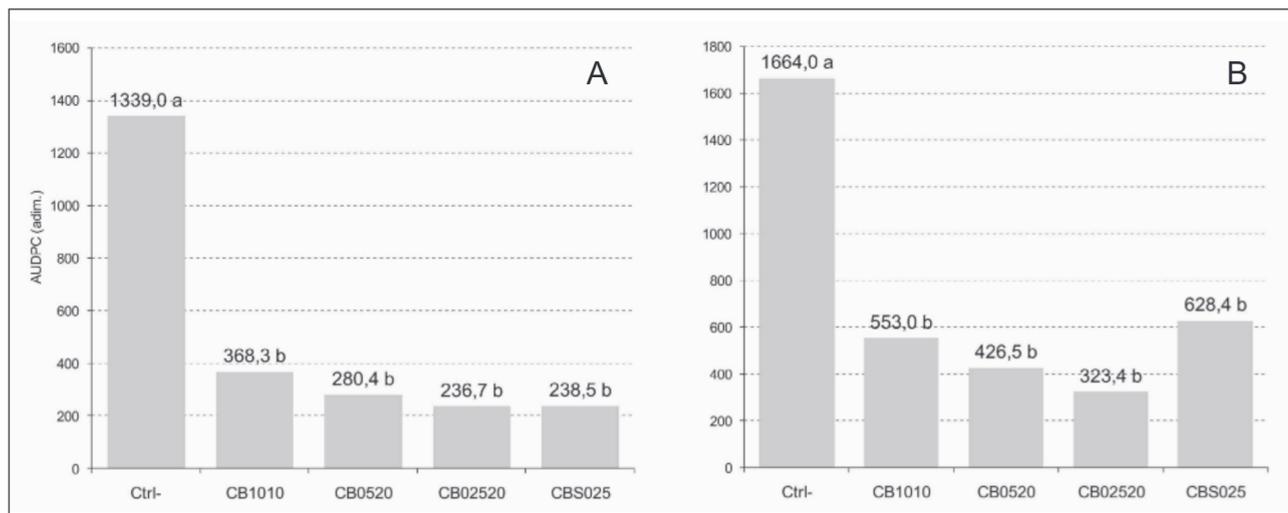


Figura 6. Áreas abaixo da curva de progresso do míldio (AACPD) em (A) folhas e (B) cachos de videira, após 91 dias e três avaliações em vinhedo experimental 'Isabel'. As AACPDs foram obtidas de acordo com Campbell & Madden (1990) sobre um Índice de doença calculado a partir da metodologia de Czermainski (1999). As parcelas testemunhas (Ctrl-) foram deixadas sem tratamento. Médias seguidas por letras distintas são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). Os tratamentos estudados foram: i) CB1010, calda bordalesa 1% + 1% (cobre:cal); ii) CB0520, calda bordalesa 0,5% + 2,0% (cobre:cal); iii) CB02520, calda bordalesa 0,25% + 2,0% (cobre:cal); ij) CBS025, calda bordalesa 0,25% + 0,25% + 0,4% (cobre:cal:sulfocálcica).

Em outro ensaio experimental de campo, glucona de cobre e fosfito de cobre demonstraram proteção do vinhedo ao míldio em níveis equivalentes aos garantidos pela calda bordalesa (Figura 7). Ambos os produtos são baseados em concentrações reduzidas de cobre (menores do que 10% do produto), com aditivos associados à ativação de respostas vegetais de defesa contra patógenos e/ou inibição direta sobre estruturas de infecção. Tais substituintes podem contribuir para a redução de inserções de cobre em vinhedos com histórico de utilização frequente desse elemento como fungicida de contato. Na mesma oportunidade, oxiclreto de cálcio, mesmo aplicado semanalmente a 1 g/L, promoveu proteção da videira contra o míldio que não ultrapassou 50% da eficiência da calda bordalesa (Cavalcanti et al., 2019).

Abordagens envolvendo agentes de controle biológico (BCAs), extratos naturais e indutores de resistência também foram experimentadas, com *screenings* iniciais feitos em casa de vegetação e testes mais competitivos em campo (Cavalcanti et al., 2020). Nesse trabalho foi verificado que substâncias baseadas em agentes de controle biológico (BCA), *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, extrato de "Falópiã" (*Reynoutria sachalinensis*) possuem potencial como alternativas ao controle do míldio, adequadas às normativas de viticultura orgânica. No entanto, suas eficiências são menores do que as verificadas em plantas protegidas pela calda bordalesa (Figura 7).

Dosagens com extrato pirolenhoso promoveram proteções intermediárias das plantas de videira ao míldio. O fertilizante organomineral classe "A" (FOA) demonstrou grande potencial no controle do míldio, com performances equiparadas ao do controle químico (metalaxil-M + mancozeb) e da calda bordalesa em condições de campo. Este produto protegeu tanto as partes vegetativas como as reprodutivas da planta, no entanto continha fosfito em sua formulação. O FOA atua inativando estruturas de propagação do patógeno, com indicativo de indução de resistência vegetal (Cavalcanti et al., 2020). No entanto, até o momento, substâncias baseadas em fosfonatos (fosfitos) não são permitidas para viticultura orgânica.

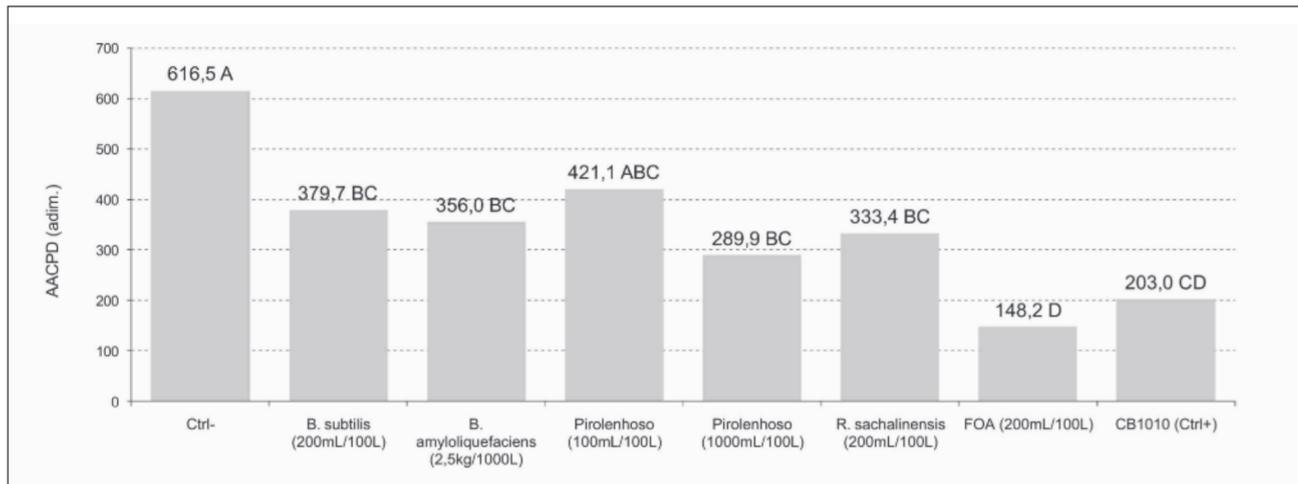


Figura 7. Áreas abaixo da curva de progresso do míldio (AACPD) em folhas tratadas com substâncias biológicas diversas, após três avaliações em experimento em DBC com parcelas de 'Cabernet Sauvignon'. As AACPDs serviram de base para um Índice de Doença (%) calculado a partir da metodologia de Czermainski (1999). As parcelas testemunhas (Ctrl-) foram deixadas sem tratamento. Médias seguidas por letras distintas são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.3.5. Um método preliminar para monitorar o progresso da interação planta-patógeno pode auxiliar a busca por resistência genética contra doenças do tronco da videira

Ações buscando prospecção por resistência genética a podridões do tronco da videira também foram abordadas durante a composição da IP-Campanha. Nesse ínterim, um método de *screening* preliminar para fenotipagem por resistência e/ou tolerância a podridões do tronco foi proposto (Cavalcanti, 2021a).

As respostas do início do co-cultivo, a partir da inoculação com a introdução com o disco micelial (BDA) com ou sem o fungo, e o progresso das podridões (com evolução de lesões e sinais do patógeno), foram monitoradas a cada 6 horas e, depois de dois ou três dias, diariamente. Em ensaios piloto, o progresso da doença, até um índice máximo medido após a completa destruição do tecido do plantlet hospedeiro, cobriu entre 20-30 dias (para *Neofusicoccum parvum*, *Ilyonectria* spp. e *Fusarium* sp.) a 80 dias, no caso de *P. chlamydospora*.

O *screening* para seleção de fontes de resistência a podridões do tronco proposto pela presente técnica é baseado em plantas de videira regeneradas por técnica de cultura de tecidos (organogênese somática ou cultura de meristema). Tais plantas estão estabelecidas em uma condição de células de raízes e parte aérea diferenciadas com tecidos completamente estabelecidos, e células foliares com capacidade fotossintetizante.

Um resultado importante verificado pelo método envolveu uma das dezenas de *co-cultivos* realizados nos vários ensaios de prospecção por resistência: - o que trabalhou com material genético validado em condições de campo. O *co-cultivo* em questão pôs em IPP o agente causador do problema para o qual a variedade foi desenvolvida: o porta-enxerto Paulsen-1103 (P1103) desafiado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis*.

Os ensaios seguiram o método, correndo sempre com dois isolados de *Fusarium*, um mais agressivo que o outro. Como poderíamos esperar, neste *co-cultivo* foi verificado um atraso significativo da curva de progresso da IPP em questão, considerando AACPD e demais taxas e índices calculados (Figura 8) (Cavalcanti, 2021a).

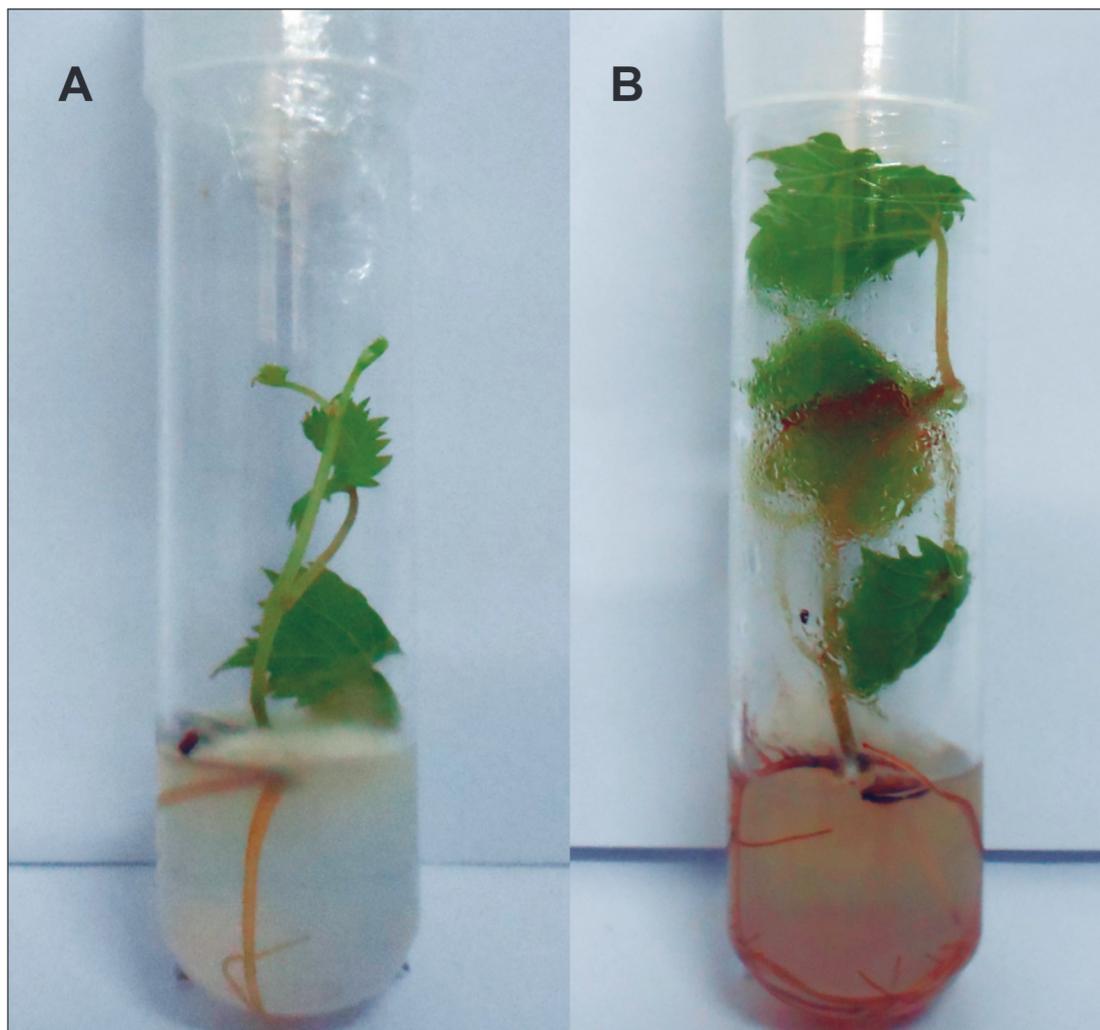


Foto: Fabio Rossi Cavalcanti

Figura 8. Detalhes de dois plantlets de videira co-cultivados com a linhagem TD100/2015 de *Neofusicoccum parvum*, dois (2) dias após co-cultivo (DAC). Genótipo 548-57 (A) e genótipo EV13-218 (B). Verifica-se onde há menor deposição de substância amarronzada/escura, o micélio cresce mais rápido.

4.4 Benefícios e diferencial das ações de Fitopatologia

Os impactos técnicos e científicos advindos dos trabalhos envolvendo levantamentos e identificação de patógenos e doenças nos vinhedos da Metade Sul, controle de doenças e proteção alternativa de plantas possuem potencial para aplicação na vitivinicultura de outras regiões do Brasil e do Mundo. As investigações abrangeram sistemas de produção convencional e a produção orgânica. Os achados técnicos extraídos das atividades de pesquisa impulsionadas pelo IP-Campanha podem contribuir para a redução de aplicação de fungicidas químicos e para a racionalização do controle de doenças em âmbito de produção de uvas para processamento, para a redução dos custos de manejo do cultivo e para agregação de valor ao produto final.

Em paralelo, os trabalhos da área de Fitopatologia associados ao IP-Campanha podem incrementar a base de informações para o alinhamento de melhores esquemas de Manejo Integrado de Pragas e Doenças (MIPD).

4.5. Referências

- BERLATTO, J. T.; ALMANÇA, M. A. K.; LOESER, B. G.; TORMENTE, F. V.; CAVALCANTI, F. R. Phylogenetic characterization of grapevine trunk pathogens isolated from vineyards in southern Brazil. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 56, n. 3, p. 513–588, Dec. 2017. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/165479/1/FabioRossi2017-10IWGTS-Reims-poster-Jessica.pdf>. Acesso em: 20 out. 2020.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532 p.
- CAVALCANTI, F. R. **Co-cultivo in vitro pode discriminar severidade de podridões do tronco em genótipos de videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2021a. 36 p. (Embrapa Uva e Vinho. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 20). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1130954>. Acesso em: 02 set. 2021.
- CAVALCANTI, F. R. **Indução de resistência não deve ser o único mecanismo de defesa associado a um controle biológico eficiente para o míldio da videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2021b. 28 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 157). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1131630>. Acesso em: 03 set. 2021.
- CAVALCANTI, F. R. **Thermal Pest Control (TPC) III**: percepção do fluxo de ar quente no tecido foliar da videira e impactos sobre o metabolismo antioxidativo, membrana celular e fotossíntese. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014. 16 p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 165). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1001237>. Acesso em: 27 out. 2020.
- CAVALCANTI, F. R.; BUENO, C. J.; ALMANÇA, M. A. K. **Declínio e morte de plantas de videira**. Documentos. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013. 44p. (Embrapa Uva e Vinho. Série Documentos, 82). Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc082.pdf>. Acesso em: 27 out. 2020.
- CAVALCANTI, F. R.; MONTEIRO, J. E. B. de A.; ALMANÇA, M. A. K.; HUNOFF, T. S.; RUSIN, C. **Thermal Pest Control (TPC) II**: aspectos gerais do efeito biológico do fluxo de ar quente na proteção da videira contra o míldio. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014a. 20 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 100). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/106021/1/Circular-Tecnica-100.pdf>. Acesso em: 27 out. 2020.
- CAVALCANTI, F. R.; PEREIRA, V. F.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M. **Aspectos da indução de resistência em plantas de videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014b. (Embrapa Uva e Vinho. Série Documentos, 88). Disponível em: < <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/991909/1/Documentos88.pdf> >. Acesso em: 27 out. 2020.
- CAVALCANTI, F. R.; GARRIDO, L. da R. Controle de doenças. In: GARRIDO, L. da R.; HOFFMANN, A.; SILVEIRA, S. V. da. (Ed.). **Produção integrada de uva para processamento**: manejo de pragas e doenças. Brasília, DF: Embrapa, 2015. v. 4, cap. 2, p. 33-48. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/132389/1/manual-4-manejo-cap2.pdf>. Acesso em: 27 out. 2020.
- CAVALCANTI, F. R.; CASSUBA, K. F.; FIORAVANÇO, J. C. **Produtos com menor teor de cobre para o controle do míldio em viticultura**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2019. 24 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 146). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/205894/1/Circ-Tec146.pdf>. Acesso em: 27 out. 2020.
- CAVALCANTI, F. R.; CASSUBA, K. F.; FIORAVANÇO, J. C. **Avaliação de produtos biológicos e um indutor de resistência no controle do míldio da videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2020. 24 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 149). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1124483/1/CIRCULAR-TECNICA-149-PUBLICA-229-BIOLOGICOS-versao-2020-08-19.pdf>. Acesso em: 27 out. 2020.
- CZERMAINSKI, A. B. C. Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de avaliação de doenças em plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 1545-1555, set. 1999. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X1999000900004>.
- FIORAVANÇO, J. C.; HUNOFF, T. S.; ZILIO, R. A.; CAVALCANTI, F. R. **Alternativas para redução de cobre em caldas usadas no controle do míldio da videira**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2015. (Embrapa Uva

e Vinho. Circular Técnica, 119). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/130797/1/Circular-Tecnica-119.pdf>. Acesso em: 27 out. 2020.

GROHS, D. S.; BOTTON, M.; GARRIDO, L. da R.; MELO, G. W. B. de. **Guia prático: dez indicações técnicas para o plantio de mudas de videira**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2016. (Embrapa Uva e Vinho. Manuais). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/147203/1/guia-10-recomendacoes-WEB.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2020.

KAISER, H. F. The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. **Psychometrika**, v. 23, n. 3, p. 187-200, Sept. 1958.

LOBATO, A. C.; CAVALCANTI, F. R. **Padrões de restrição de DNA para detecção molecular de *Lasiodiplodia theobromae* em videira e estudos filogenéticos em sequências concatenadas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2021. 27 p. (Embrapa Uva e Vinho. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 19). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1130397>. Acesso em: 02 set. 2021.

LOBATO, A. C.; GALARZA, B.; CAVALCANTI, F. R. Desenvolvimento de um método de caracterização de esquemas de controle químico em vinhedos por Análise Explanatória Multivariada. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15.; ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO, 11., 2017. Bento Gonçalves. **Resumos...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. p. 55. Disponível em: Desenvolvimento de um método de caracterização de esquemas de controle químico em vinhedos por Análise Explanatória Multivariada. Acesso em: 27 out. 2020.

MONTEIRO, J. E. B. de A.; CAVALCANTI, F. R.; FINGER, G.; DULLIUS, M. de V. **Thermal Pest Control (TPC) I: caracterização do tratamento de fluxo de ar quente em vinhedo**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014. 12 p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 158). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/106018/1/Comunicado-Tecnico-158.pdf>. Acesso em: 27 out. 2020;

