

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CAROLINA BERTUZZI PEREIRA

Patogenicidade de *Alternaria* spp. na videira ‘Niágara Rosada’ e severidade de míldio em
‘BRS Vitória’

Maringá
2015

CAROLINA BERTUZZI PEREIRA

Patogenicidade de *Alternaria* spp. na videira ‘Niágara Rosada’ e severidade de míldio em
‘BRS Vitória’

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Área de concentração: Proteção de Plantas

Orientador: Prof. Dr. Dauri José Tessmann

Co-orientadora: Dra. Rosemeire de Lellis Naves

Maringá
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

P436p Pereira, Carolina Bertuzzi
Patogenicidade de *Alternaria* spp. na videira 'Niágara Rosada' e severidade de míldio em 'BRS Vitória' / Carolina Bertuzzi Pereira. -- Maringá, 2015.
xi, 88 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Dauri José Tessmann.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Rosemeire de Lellis Naves.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2015.

1. Míldio - Videira. 2. Requeima das folhas - Videira. 3. Viticultura. I. Tessmann, Dauri José, orient. II. Naves, Rosemeire de Lellis, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD 21.ed. 634.82

AMMA-003117

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAROLINA BERTUZZI PEREIRA

Patogenicidade de *Alternaria* spp. na videira ‘Niágara Rosada’ e severidade de míldio em
‘BRS Vitória’

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Dauri José Tessmann
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Dra. Rosemeire de Lellis Naves
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Dr. Reginaldo Teodoro de Souza
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Aprovada em 19 de fevereiro de 2015.

DEDICATÓRIA

À minha amada mãe, Lucimar Bertuzzi Pereira, pelo incentivo, amor, força e pela ajuda nos meus experimentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela dádiva da vida e por nos conceder saúde para que possamos lutar dia a dia pelos nossos sonhos;

À minha família, pelo amor, incentivo, suporte, força e por estar ao meu lado em todos os momentos;

Ao Professor Dr. Dauri José Tessmann, pela excelente orientação, ensinamentos, confiança, oportunidade, paciência, motivação, pelos desafios propostos e referência como grande profissional;

À Dra. Rosemeire de Lellis Naves e ao Dr. Reginaldo Teodoro de Souza, pesquisadores da Embrapa Uva e Vinho, pela co-orientação, confiança e por ter sido simplesmente um prazer conviver com profissionais tão queridos e renomados;

Ao produtor Antônio Martinez, que cedeu a área para condução dos experimentos e que me acolheu com muito carinho, proporcionando valiosos conhecimentos;

À professora Dra. Rosangela, pelos esclarecimentos concernentes à análise estatística, pelos valiosos ensinamentos e por ser uma pessoa admirável;

Aos professores Dr. William Mário de Carvalho Nunes, Dr. João Batista Vida e Dra. Kátia Regina de Freitas Schwan-Estrada pelos ensinamentos durante o curso;

À professora Dra. Cláudia Regina Dias Arieira, pela amizade, alegria, ensinamentos, inspiração e motivação;

À Cleiltan Novais da Silva, pela amizade, auxílio, conselhos e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao meu amigo Vinícius Hicaro Frederico Abe, pela amizade, auxílio nos experimentos e por não medir esforços em me ajudar;

À Cleia Cabral, pela grande amizade, motivação, conselhos e estar sempre disposta a me ajudar;

À funcionária do Departamento de Agronomia, Vilma Melo, pelo amor, cuidado, proteção e incentivo;

Ao funcionário Mauro Moreira, pela amizade, companheirismo e auxílio nos trabalhos;

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação: Erika e Reinaldo, pelo profissionalismo e amizade;

Aos meus amigos da pós-graduação: Caroline De Marchi Bordon, Danilo Lima Neves, Mariana Nasser Saab, Juliana Oliveira, Lilianne Ribeiro, Heriksen Higashi Puerari, Jéssica Brassau, Virlene Amaral, Antônio Jussê Solino, Giovanna Mariucci, Mariana Alencar e Patrícia Carnelossi, pela amizade, carinho, incentivo e por me proporcionarem tanta felicidade;

À Universidade Estadual de Maringá e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos auxílios concedidos.

Patogenicidade de *Alternaria* spp. na videira ‘Niágara Rosada’ e severidade de míldio em ‘BRS Vitória’

RESUMO

A requeima das folhas é uma doença importante na cultivar Niágara Rosada (*Vitis labrusca*) na região de Jales, estado de São Paulo, por causar desfolhamento precoce das plantas e com isso prejudicar o desenvolvimento e a maturação de frutos e ramos. Embora a doença tenha sido constatada ainda no final da década de 90, sua etiologia ainda não foi elucidada, havendo apenas relatos da associação da doença com fungos do gênero *Alternaria*. Na primeira parte deste estudo, objetivou-se determinar a patogenicidade de isolados desse fungo. Os testes de patogenicidade foram realizados em mudas de videira ‘Niágara Rosada’. As folhas foram inoculadas por aspersão de suspensão de conídios em água e também em emulsão de água com óleo mineral, alternativamente a inoculação foi feita pela deposição de plugs de micélio na superfície das folhas. As plantas foram mantidas por diferentes períodos de câmara úmida e em seguida em casa de vegetação. Também foi investigada a indução de sintomas de requeima das folhas mediante aplicações sucessivas de hidróxido de cobre, bem como aplicações de paraquat para acelerar a colonização endofítica. A identificação das espécies baseou-se em características morfológicas e na análise de DNA de uma porção do gene *Alt a1.*, o qual é considerado informativo da filogenia de espécies deste gênero. Verificou-se que aplicações sucessivas de hidróxido de cobre nas folhas podem causar clorose e necrose nas folhas, com alguma semelhança com os sintomas de requeima. Além disso, espécies de *Alternaria* spp. podem ser encontradas colonizando tecidos sadios de folhas de videira, caracterizando-se assim como colonização endofítica. Sete isolados foram identificados como *A. reseauae* (= *A. septorioides*) e dois isolados como *A. alternata*. Na segunda parte do estudo, os danos de míldio (*Plasmopara viticola*) foram avaliados na nova cultivar ‘BRS Vitória’ em comparação com a tradicional cultivar de uva de mesa Benitaka (do grupo Itália, *Vitis vinifera*) no norte do Paraná. Observou-se que a cultivar BRS Vitória apresenta menos danos por míldio, tanto em folhas como nos cachos, mostrando maior tolerância à doença do que a cultivar Benitaka (*V. vinifera*).

Palavras-chave: Míldio. Requeima das folhas. Viticultura.

Pathogenicity of *Alternaria* spp. in the vine 'Niágara Rosada' and downy mildew severity in 'BRS Vitória'

ABSTRACT

The leaf blight is an important disease in cultivating Niágara Rosada (*Vitis labrusca*) in the region of Jales, São Paulo, for causing early defoliation of the plants, damaging the development and maturation of fruits and branches. Although it has been found since the end of the nineties, the etiology of leaf blight of grapevine remains not elucidated, with only reports of its association with fungi of the genus *Alternaria*. In the first part of this study, we investigated the pathogenicity of *Alternaria* isolates on grapevine leaves. Pathogenicity tests were performed in young plants of 'Niagara Rosada'. were inoculated by spraying a spore suspension in sterile water or in water/oil emulsion, as well as by depositing plugs of mycelium on the surface of leaves. The plants were kept in a humid chamber for different periods and then in greenhouse. It is also investigated the induction of leaf blight symptoms of by successive applications of copper hydroxide and paraquat applications to accelerate endophytic colonization. The species identification was based on morphological characteristics and DNA analysis of a portion of Alt a1 gene, which is considered informative about *Alternaria* phylogeny. It was found that successive applications of copper hydroxide can cause chlorosis and necrosis on leaves, having some resemblance with the symptoms of leaf blight. In addition, *Alternaria* spp. were found colonizing healthy leaves, evidencing their endophytism. Seven isolates were identified as *A. resedae* (= *A. septorioides*) and two isolated as *A. alternata*. In the second part of the study, damages of downy mildew (*Plasmopara viticola*) were assessed in the new seedless table grape cultivar BRS Vitória in comparison with the traditional table grape cultivar Benitaka (from Italy group, *Vitis vinifera*) in northern Paraná. It was observed that the cultivar BRS Vitória is less damaged by downy mildew than the cultivar Benitaka.

Keywords: Leaf blight. Mildew. Viticulture

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

| | |
|--|---|
| Tabela 1. Produção de uvas no Brasil, em toneladas..... | 5 |
| Tabela 2. Área plantada de videiras no Brasil, em hectares | 6 |

CAPITULO 1

Patogenicidade de *Alternaria* spp. na videira ‘Niágara Rosada’

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Permanência em câmara úmida dos isolados utilizados nos testes de patogenicidade | 33 |
| Tabela 2. Análise de variância dos dados referentes à severidade | 41 |
| Tabela 3. Análise de variância dos dados referentes à severidade | 42 |
| Tabela 4. Estatística descritiva da quantificação de esporos (conídios.cm ⁻²) das amostras de folhas sadias submetidas à câmara úmida por 10 dias..... | 46 |
| Tabela 5. Frequência de infecção de <i>Alternaria</i> spp. em folhas assintomáticas da cultivar Niágara Rosada, coletadas em Jales, SP, 2014..... | 47 |
| Tabela 6. Identificação molecular de isolados de <i>Alternaria</i> endofíticas em folhas de videira com base na similaridade de sequências de DNA do gene Alt a1..... | 50 |
| Tabela 7. Características morfológicas de conídios de isolados de <i>Alternaria</i> spp., proveniente de videira | 52 |

CAPÍTULO 2

Severidade de míldio na cultivar BRS Vitória no sistema de produção de uva de mesa do norte do Paraná

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Fungicidas e doses utilizadas nos tratamentos..... | 70 |
| Tabela 2. Quantificação de míldio nas folhas, expresso pela quantidade máxima de doença (QMD) nas cultivares BRS Vitória e Benitaka conduzidas sob diferentes programas de fungicidas na safra temporã de 2014 | 76 |
| Tabela 3. Teste de hipótese para os efeitos fixos | 77 |
| Tabela 4. Contrastes ortogonais dos tratamentos na safra temporã de 2014..... | 77 |
| Tabela 5. Valores médios mensais de temperatura máxima e mínima, chuva e número de dias de chuva, em Marialva, no período de agosto de 2013 a maio de 2014..... | 81 |
| Tabela 6. Variáveis climáticas nos períodos de maior suscetibilidade da cultura da videira a infecção e desenvolvimento do míldio (<i>Plasmopara viticola</i>)..... | 84 |

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Patogenicidade de *Alternaria* spp. na videira ‘Niágara Rosada’

| | |
|--|----|
| Figura 1. Métodos de inoculação. A e B: com e sem fermento. C e D: deposição de discos de micélio. | 32 |
| Figura 2. Folhas de videira da cultivar Niágara Rosada tratadas com aplicações sucessivas de hidróxido de cobre (A, B, C, D e E) e folhas sem tratamento (F). | 43 |
| Figura 3. Box plot da quantificação de conídios de <i>Alternaria</i> spp. para os diferentes tratamentos. Sendo tratamento 1, sem desinfestação superficial; 2, com desinfestação superficial; 3, sem desinfestação superficial e com paraquat; 4, com desinfestação superficial e com paraquat. Box plot da incidência de <i>Alternaria</i> spp. para os tratamentos pulverizados com paraquat (1) e os não pulverizados (2)..... | 45 |
| Figura 4. Produto de amplificação do fragmento do gene Alt a1 analisado em gel de agarose 1% corado com Sybr Safe®. Em que M, é o marcador de 100 pb; NR1, NR2, ZM1, ZM2, ZM4, ZM5, D1, ZM7 e ZM6 são os isolados. | 49 |
| Figura 5. Árvore filogenética inferida a partir de sequências de DNA do gene Alt a1 de isolados de <i>Alternaria</i> spp. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem da análise de <i>bootstrap</i> nas quais as repetições foram observadas (1.000 repetições). | 49 |
| Figura 6. Fotos dos isolados NR1 (A), NR2 (B), ZM1 (C), ZM2 (D), ZM4 (E), ZM5 (F). ... | 53 |
| Figura 7. Fotos dos isolados ZM6 (G), D1 (H) e ZM7 (I). | 54 |

CAPÍTULO 2

Severidade de míldio na cultivar BRS Vitória no sistema de produção de uva de mesa do norte do Paraná

| | |
|--|----|
| Figura 1. Escala diagramática colorida e em preto-e-branco para avaliação da severidade do míldio da videira..... | 72 |
| Figura 2. Curvas de progresso do míldio (<i>Plasmopara viticola</i>) em videira da cv. BRS Vitória, expresso pela severidade na safra temporã. | 78 |
| Figura 3. Sintomas e sinais de míldio em folhas de videira cv. BRS Vitória. A e B, sintomas e sinais iniciais; C, esporulação cobrindo parte do limbo foliar; e D, sintomas necróticos após a aplicação de fungicidas..... | 79 |
| Figura 4. Sintomas e sinais de míldio em folhas de videira cv. Benitaka. A e B, esporulação e sintomas necróticos cobrindo parte do limbo foliar. | 79 |
| Figura 5. Valores normais mensais (período 1983-2013) de temperatura máxima (T _{máx}), mínima (T _{min}) e chuva para Marialva/PR. | 80 |
| Figura 6. Temperaturas mínima, média, máxima (°C) e precipitação (mm) na safra normal de 2013 (A) e na safra temporã de 2014 (B).. | 82 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 4 |
| 2.1 Hospedeira | 4 |
| 2.1.1 Origem e classificação botânica da videira | 4 |
| 2.1.2 Aspectos sócio-econômicos..... | 5 |
| 2.2 Características das cultivares Niágara Rosada e BRS Vitória..... | 6 |
| 2.3 Principais doenças fúngicas da videira..... | 7 |
| 2.3.1 Míldio da videira | 8 |
| 2.3.2 Requeima das folhas..... | 10 |
| 2.4 Fungos endofíticos..... | 11 |
| 2.5 O gênero <i>Alternaria</i> | 14 |
| 3 REFERÊNCIAS | 17 |
| CAPÍTULO 1 | 24 |
| RESUMO | 25 |
| ABSTRACT | 26 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 27 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 29 |
| 2.1 Obtenção dos isolados | 29 |
| 2.2 Isolados de <i>Alternaria</i> spp. e produção de inóculo | 29 |
| 2.3 Teste de patogenicidade dos isolados..... | 30 |
| 2.3.1 Aspersão da parte aérea da planta..... | 30 |
| 2.3.2 Deposição de discos de micélio..... | 31 |
| 2.4 Avaliação da indução de sintomas de requeima das folhas mediante aplicações sucessivas de hidróxido de cobre..... | 33 |
| 2.5 Detecção de espécies de <i>Alternaria</i> endofíticas | 34 |
| 2.6 Caracterização e identificação molecular | 36 |
| 2.6.1 Preparação do micélio e extração de DNA..... | 36 |
| 2.6.2 Reação da polimerase em cadeia (PCR) e caracterização filogenética | 37 |
| 2.7 Caracterização morfológica | 38 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 40 |
| 3.1 Testes de patogenicidade | 40 |

| | |
|---|----|
| 3.2 Avaliação da indução de sintomas de queima das folhas mediante aplicações sucessivas de hidróxido de cobre..... | 41 |
| 3.3 Detecção de espécies de <i>Alternaria</i> endofíticas | 44 |
| 3.4 Caracterização e identificação molecular | 48 |
| 3.5 Caracterização morfológica | 50 |
| 4 CONCLUSÕES | 55 |
| 5 REFERÊNCIAS | 56 |
| ANEXOS | 60 |
| CAPÍTULO 2 | 63 |
| RESUMO | 64 |
| ABSTRACT | 65 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 66 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 68 |
| 2.1 Caracterização do Local e da Área Experimental | 68 |
| 2.2 Progresso temporal e dano do míldio | 68 |
| 2.3 Análise da favorabilidade climática ao míldio | 72 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 75 |
| 3.1 Progresso temporal e danos de míldio..... | 75 |
| 3.2 Análise da favorabilidade climática ao míldio | 80 |
| 3.2.1 Condições meteorológicas durante o período experimental..... | 81 |
| 4 CONCLUSÃO..... | 86 |
| 5 REFERÊNCIAS | 87 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

A viticultura é uma atividade de grande importância econômica e social para o Brasil, ocupando uma área de aproximadamente 82 mil hectares, situando-se entre o paralelo 30°S, no Estado do Rio Grande do Sul, e o paralelo 9°S, na região Nordeste do país. Em função da grande diversidade ambiental, existem polos com viticultura característica de regiões temperadas, com período de repouso hibernar definido; polos em áreas subtropicais onde, normalmente, a videira é cultivada com dois ciclos anuais, definidos em função de um período de temperaturas mais baixas em que há risco de geadas e polos de viticultura tropical onde é possível a realização de podas sucessivas, com dois ciclos vegetativos por ano. Os principais estados produtores de uva são: Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Pernambuco e Bahia (SATO, 2004; MELLO, 2000).

Os diversos polos vitícolas apresentam diferenças marcantes em relação ao impacto das diferentes doenças que afetam a videira. Dentre as doenças, as fúngicas são as mais importantes e representam um dos principais entraves para a produção quantitativa e qualitativa de uva (SÔNEGO et al., 2005). Sua importância, individualmente ou no conjunto, é variável de acordo com as características edafo-climáticas das diferentes regiões vitícolas do país. No polo de viticultura tropical de Jales, no noroeste do estado de São Paulo, entre as principais doenças que afetam a videira está a requeima das folhas. Essa doença, cuja etiologia é desconhecida, causa a desfolha antecipada das plantas de videira em consequência da necrose dos tecidos foliares, prejudica a perfeita maturação dos frutos, o que acarreta baixos teores de açúcar, elevada acidez e fraca coloração, tornando-os inadequados para a comercialização. Além disso, compromete a formação dos ramos responsáveis pela próxima colheita, devido ao menor acúmulo de reservas de carboidratos (NAVES et al., 2006).

Observou-se a requeima primeiramente na cultivar Niágara Rosada (*Vitis labrusca*), em 1998, e posteriormente em uvas europeias (*V. vinifera*). A doença tem sido associada a fungos do gênero *Alternaria*, constantemente presentes nos tecidos necrosados de folhas sintomáticas, muito embora testes de patogenicidade com esse fungo não tenham sido conclusivos (NAVES et al., 2006). Assim, no Capítulo 1, foi relatado um estudo que teve como objetivo inicial aprofundar os conhecimentos sobre a etiologia dessa doença, em que foi explorada a hipótese de que espécies de *Alternaria* atuam como agentes causais da requeima das folhas da videira. Espécies de *Alternaria* foram identificadas com o emprego de técnicas moleculares (HONG et al., 2004; LAWRENCE et al., 2013).

A elucidação da etiologia da requeima das folhas da videira é importante devido às questões regulatórias e para o estudo de medidas de controle da doença. A Lista de Pragas Quarentenárias A1, do Ministério da Agricultura e Pecuária (Instrução Normativa SDA nº 41, 01 de Julho de 2008) inclui a espécie *A. vitis*, de modo que a confirmação da ocorrência desse patógeno no território nacional é uma questão estratégica para a defesa sanitária vegetal do país. Ademais, a identificação do agente causal da doença é uma etapa primordial para o desenvolvimento de medidas de controle, especialmente em processos de seleção de genótipos mais resistentes à doença em condições controladas e que requerem a inoculação do agente causal.

No Capítulo 2 foram avaliados danos do míldio na cultivar BRS Vitória, em diversos tratamentos com variações no número de aplicações de fungicidas. A hipótese explorada foi de que nas condições de produção do norte do Paraná a cultivar BRS Vitória requer menor emprego de fungicidas para o controle da doença, por ser mais tolerante.

O míldio é considerado a doença mais importante da videira no Brasil (LIMA et al., 2009; TESSMANN et al., 2007; NAVES et al., 2006) e nas principais regiões vitícolas do mundo (LAFON; CLERJEAU, 1988). A doença é causada pelo pseudofungo *Plasmopara viticola* e se caracteriza por ser a doença mais devastadora da videira, uma vez que afeta todos os tecidos verdes da videira, causando danos em brotos, ramos novos, folhas e cachos, podendo causar a perda total da produção. Na região norte do Paraná, o míldio é a principal doença que afeta a viticultura. As videiras de origem europeia (*V. vinifera*), tais como a cultivar Itália e suas mutantes, cultivares Rubi, Benitaka e Brasil são altamente suscetíveis à doença. O míldio também prejudica a produção de videiras de origem americana (*V. labrusca*), como Niágara Rosada e Isabel, muito embora essas últimas apresentem maior resistência genética ao míldio do que as videiras europeias.

Em função da ocorrência de condições climáticas altamente favoráveis ao míldio, à produção de uvas do norte do Paraná requer o emprego de numerosas pulverizações de fungicidas químicos durante o ciclo de produção, o que significa o aumento do custo de produção de uva e o risco da atividade. Embora as videiras de origem americana, como as cultivares Niágara Rosada, Isabel, entre outras, apresentem níveis mais elevados de resistência genética à doença do que as videiras de origem europeia, originadas de *V. vinifera*, ainda assim sua produção econômica geralmente é dependente do uso de fungicidas. Mais recentemente, visando oferecer cultivares de uva que possam ser utilizadas em sistemas de produção com maior sustentabilidade ambiental, a Embrapa Uva e Vinho desenvolveu a

cultivar de uva de mesa BRS Vitória, a qual além de não ter sementes em seus frutos, o que é uma característica muito desejável pelo mercado, também é mais tolerante ao míldio do que as demais cultivares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hospedeira

2.1.1 Origem e classificação botânica da videira

O centro paleontológico de origem da videira foi provavelmente a atual Groelândia e outras regiões hiperbóreas. Foram nessas áreas que se encontraram os fósseis mais antigos de plantas ancestrais das atuais vides cultivadas (SOUZA, 1996).

Ao iniciar-se a glaciação em vastas proporções no hemisfério setentrional, as espécies do gênero *Vitis* eram encontradas em grande abundância, com dois subgêneros diferenciados: *Euvitis* e *Muscadinia*, desde a Groenlândia, a Islândia e o Alasca até as orlas do Mediterrâneo. Durante o período de glaciação da Terra, imensas extensões ficaram cobertas sob um espesso manto de gelo. Os centros de refúgio da videira se formaram nos locais menos atingidos pela glaciação, constituindo-se em três principais: um americano, um europeu e um asiático-ocidental (SOUZA, 1996; ALVARENGA et al., 1998).

O centro de refúgio americano, localizado nas partes atlânticas dos Estados Unidos e México, deu origem as atuais espécies americanas de *Vitis*: *labrusca*, *V. vulpina*, *V. rupestris*, *V. aestivalis*, *V. rotundifolia*, *V. tiliaefolia*, *V. smalliana*, *V. lincecumii*, *V. cordifolia*, *V. berlandieri*, etc. O centro de refúgio europeu situou-se nas áreas mediterrâneas francesas e italianas até a península balcânica e aí conseguiu sobreviver uma única espécie: *V. vinifera silvestris*. O centro de refúgio asiático-ocidental se formou nas montanhosas paragens ao sul do mar Negro, entre o Ararat, Cáucaso e o Taurus, compondo-se de espécimes de *V. vinifera caucasica* (SOUZA, 1996).

A videira, a vinha ou parreira é uma trepadeira com tronco retorcido, ramos flexíveis, folhas grandes e repartidas em cinco lóbulos pontiagudos, flores esverdeadas em ramos, cujo fruto é a uva. A botânica sistemática situa a videira *Vitis* no grupo mais importante do Reino Vegetal, isto é, na Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Subclasse Rosidae, Ordem Rhamnales, Família Vitaceae (CRONQUIST, 1981).

O gênero *Vitis* consiste em dois subgêneros, *Euvitis* e *Muscadinia* e caracteriza-se por apresentar plantas trepadeiras perenes, monóicas ou dióicas. As inflorescências são opostas às folhas e as flores podem ser hermafroditas perfeitas, masculinas ou femininas (GALET, 1998).

2.1.2 Aspectos sócio-econômicos

Segundo o IBGE, a produção de uvas no Brasil, em 2013 foi de 1.412.854 toneladas, 2,95% inferior ao ano de 2012 (Tabela 1). No Estado de Santa Catarina ocorreu a maior redução da produção (25,04%). Também nos Estados da Bahia, São Paulo e Rio Grande do Sul foram constatadas reduções na produção de uvas de 15,23%, 2,28% e 3,81%, respectivamente. O aumento na produção foi verificado nos Estados de Pernambuco (1,77%), Minas Gerais (25,99%), Paraná (12,13%), em relação ao ano de 2012.

Tabela 1. Produção de Uvas no Brasil, em toneladas

| Estado/Ano | 2012 | 2013 | 2014* |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|
| Ceará | 767 | 664 | 914 |
| Pernambuco | 224.758 | 228.727 | 236.767 |
| Bahia | 62.292 | 52.808 | 58.287 |
| Minas Gerais | 10.107 | 12.734 | 11.537 |
| São Paulo | 176.902 | 172.868 | 158.781 |
| Paraná | 70.500 | 79.052 | 80.910 |
| Santa Catarina | 70.909 | 53.153 | 66.106 |
| Rio Grande do Sul | 840.251 | 808.267 | 812.537 |
| Goiás | 4.570 | 4.581 | 5.101 |
| Brasil | 1.461.056 | 1.412.854 | 1.430.940 |

Fonte: IBGE. *Dados capturados em setembro de 2014.

De acordo com dados estatísticos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), houve, em 2013, redução de 1,34% da área plantada de uvas no Brasil, em relação ao ano de 2012 (Tabela 2).

No Brasil, os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Paraná, Bahia, Santa Catarina e Minas Gerais destacam-se como os principais produtores de uva, sendo a produção destinada ao consumo em estado fresco e à produção de vinho, suco, geléia e passa. As sementes são utilizadas para a extração do óleo (KISHINO et al., 2007).

Tabela 2. Área plantada de videiras no Brasil, em hectares

| Estado/Ano | 2012 | 2013 | 2014* |
|-------------------|--------|--------|--------|
| Ceará | 44 | 50 | 51 |
| Pernambuco | 6.813 | 6.817 | 6.833 |
| Bahia | 2.624 | 2.395 | 1.987 |
| Minas Gerais | 762 | 849 | 827 |
| São Paulo | 9.750 | 9.526 | 8.160 |
| Paraná | 6.202 | 5.824 | 5.580 |
| Santa Catarina | 5.176 | 4.474 | 4.989 |
| Rio Grande do Sul | 51.152 | 51.450 | 51.005 |
| Goiás | 166 | 222 | 219 |
| Brasil | 82.689 | 81.607 | 79.651 |

Fonte: IBGE. *Dados capturados em setembro de 2014.

No Brasil, além das uvas finas (*V. vinifera*) que são utilizadas mundialmente para consumo *in natura* e processamento, é comum o uso de uvas americanas (*V. labrusca* e outras espécies). Assim, o diversificado Setor Vitivinícola Brasileiro engloba várias cadeias produtivas: uvas finas, americanas e híbridas para mesa, uvas para elaboração de vinhos finos, e uvas americanas e híbridas para a elaboração de vinhos de mesa e sucos (CAMARGO et al., 2010). Em relação às uvas finas de mesa, a cultivar Itália apresenta presença marcante em todas as áreas de produção. Entretanto, houve diversificação da produção, destacando-se as cultivares coloridas, derivadas da cultivar Itália, Rubi, Benitaka e Brasil. A ‘Niágara Rosada’, além de bastante apreciada e com grande aceitação no mercado, destaca-se como praticamente a única alternativa de uva americana de mesa, com presença marcante em todas as regiões produtoras (CAMARGO et al., 2011). No cenário internacional, é crescente o interesse por uvas sem sementes (ALBUQUERQUE, 1996). Tal fato vem de encontro com uma das principais demandas do segmento da viticultura nacional que produz uvas para a exportação. Desta forma, surge a ‘BRS Vitória’, nova cultivar de uva sem sementes com sabor especial e tolerante ao míldio (MAIA et al., 2012).

2.2 Características das cultivares Niágara Rosada e BRS Vitória

A cultivar Niágara Rosada surgiu pela mutação somática natural de ‘Niágara Branca’, em 1933, na propriedade de Antônio Carbonari, localizada em Louveira, distrito de Jundiaí, SP (SOUSA; MARTINS, 2002). Essa cultivar apresenta fácil cultivo e boa adaptabilidade às condições paulistas. Os cachos são de tamanho médio, cônicos e compactos,

pesando em média de 200 a 300 gramas, com baixa resistência ao transporte e armazenamento. A coloração típica das bagas é rosado-avermelhada, peso médio de 5 a 6 gramas, de forma ovalada, sucosa, muita pruína e sabor foxado (típico das uvas labruscas) (MANICA; POMMER, 2006).

Em relação às doenças fúngicas, a cultivar Niágara Rosada apresenta comportamento semelhante ao da cultivar Niágara Branca, com média resistência ao míldio (*Plasmopara viticola*) e antracnose (*Elsinoe ampelina*); sensível à podridão-da-uva-madura (*Colletotrichum lindemuthianum*), podridão-amarga (*Melanconium fuligineum*) e cercosporiose mancha-das-folhas (*Isariopsis clavispora*); boa resistência à podridão-cinzenta, causada por *Botrytis cinerea*, e ao oídio (*Oidium necator*), tanto nas folhas como nos cachos. Similarmente a Niágara Branca, apresenta suscetibilidade à ferrugem da videira (*Phakopsora euvitis*) e requeima das folhas (agente etiológico ainda não identificado) (MAIA et al., 2012).

A cultivar ‘BRS Vitória’ é resultado do cruzamento entre CNPUV 681-29 x ‘BRS Linda’, realizado em 2004, na Embrapa Uva e Vinho, Estação Experimental de Viticultura Tropical (EVT), em Jales, no Estado de São Paulo. É uma cultivar de uva sem sementes vigorosa; que apresenta ampla adaptação climática; alta fertilidade de gemas, em média, dois cachos por ramo e levemente compactados; boa tolerância à rachadura de bagas e tolerância ao míldio, principal doença da videira no Brasil. A produtividade varia entre 25 a 30 t/ha, em regiões com dois ciclos anuais (um ciclo produtivo) (MAIA et al., 2012).

2.3 Principais doenças fúngicas da videira

A complexa interação entre patógeno, hospedeiro e ambiente resulta na ocorrência de doenças em plantas (VALE et al., 2004). Os elementos que mais afetam a incidência de doenças fúngicas na videira são condições de temperatura e umidade elevadas, assim como as precipitações (SENTELHAS, 1998).

O míldio é a doença de maior importância econômica na região noroeste do Paraná (GENTA et al., 2001). Essa doença além de afetar a longevidade, a produtividade e a qualidade dos frutos, pode acarretar em perdas totais da produção (TESSMANN et al., 2007).

A requeima das folhas é uma doença relativamente recente e que representa um obstáculo à viticultura, uma vez que torna os frutos inadequados para a comercialização, visto que prejudica a maturação dos mesmos (NAVES et al., 2006).

2.3.1 Míldio da videira

O agente causal do míldio da videira foi descrito inicialmente em 1837 como *Botrytis cana* Link por Schweinitz. Em 1848, Berkeley e Curtis renomearam para *Botrytis viticola*, *Peronospora viticola* por De Bary em 1863. Entretanto, apenas em 1888 foi finalmente denominado de *Plasmopara viticola* por Berlese e De Toni (LAFON; BULIT, 1981). Segundo Alexopoulos et al. (1996), o míldio da videira causado pelo pseudofungo parasita obrigatório *P. viticola* é pertencente ao Reino Chromista, Filo Oomycota, Classe Oomycetes, ordem Peronosporales, família Peronosporaceae.

Por volta de 1865, um pulgão de raiz nativo da América do Norte foi introduzido nos vinhedos franceses, cujas variedades de *Vitis vinifera* mostraram-se extremamente suscetíveis à praga. Com o intuito de controlar o pulgão, foram importados porta-enxertos americanos, que por sua vez apresentavam boa tolerância. Entretanto, decorrente do desconhecimento foi introduzido junto com o material importado, o fungo *Plasmopara viticola*, que ameaçou a continuidade da indústria do vinho, devido à extrema suscetibilidade das videiras francesas. O primeiro fungicida utilizado para o controle da enfermidade, calda bordalesa, foi elaborado por Aléxis Millardet em 1882, que descobriu ocasionalmente através de observações de videiras que foram aspergidas sulfato de cobre e cal (TRIGIANO et al., 2010).

A primeira constatação do míldio no Brasil foi realizada em 1891 nas parreiras existentes no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Assim, foram realizados os primeiros trabalhos de controle da doença com caldas cúpricas (RIBEIRO, 2003).

O míldio, comumente conhecido como mofo ou mufa é a principal doença da videira e infecta todas as partes verdes da planta, podendo causar perdas de até 100% na produção (NAVES et al., 2012). A ocorrência desta doença é favorecida por condições climáticas chuvosas e úmidas. Desta forma, a chuva atua como principal fator na promoção das epidemias. Por sua vez, a temperatura exerce papel moderador, acelerando ou retardando o desenvolvimento do patógeno (PEARSON; GOHEEN, 1988).

O entendimento do progresso da doença no tempo e no espaço baseia-se no conhecimento do ciclo de vida do patógeno e o ciclo da doença. Assim, para que ocorra o desenvolvimento de epidemias em plantas fazem-se necessários elementos correspondentes às fases de infecção, colonização, produção de inóculo, dispersão e sobrevivência do patógeno (CAMPBELL; MADDENN, 1990; VALE; ZAMBOLIM, 1996).

O agente causal do míldio da videira, *Plasmopara viticola*, apresenta ciclo de reprodução sexuada e assexuada. No hospedeiro, o crescimento intercelular ocorre através da hifa cenocítica, a qual emite haustórios globosos ao interior das células parasitadas. Na fase assexuada do patógeno, que é a mais comum e que pode repetir-se várias vezes durante o ciclo de produção da videira, são formados esporangióforos ramificados monopodialmente que emergem dos estômatos e deles produzem os esporângios ovalados e hialinos. As condições climáticas requeridas para o desenvolvimento dessas estruturas consistem em 95-100% de umidade relativa, pelo menos 4 horas de escuro e intervalo de temperatura de 18-22°C. A disseminação dos esporângios ocorre pelo vento ou respingos de chuva. No interior dos mesmos são formados de 1 a 10 zoósporos biflagelados. Estes esporos são móveis na água, movimentam-se na superfície do hospedeiro até localizar o estômato do tecido. Após o encistamento, o fungo emite o tubo germinativo e penetra no hospedeiro (LAFON; BULIT, 1981; LAFON; CLERJEAU, 1990).

A fase sexuada ocorre no interior dos tecidos ou órgãos do hospedeiro, onde são liberadas durante o inverno as estruturas de sobrevivência do patógeno, denominado de oósporos. Na presença de água, esses oósporos germinam, emitem o tubo germinativo e sobre ele forma o esporângio, que por sua vez, produz 30-56 zoósporos, os quais são responsáveis pela infecção dos tecidos sadios da planta. (LAFON; BULIT, 1981; LAFON; CLERJEAU, 1990). A formação de oósporos é a principal forma de sobrevivência do fungo em regiões de inverno rigoroso, todavia no Brasil, a sobrevivência ocorre por micélio no interior de tecidos vivos (NAVES et al., 2006; 2012). Na região norte do Paraná essas estruturas não tem sido detectadas em condições de campo (TESSMANN et al., 2007).

O controle de míldio envolve diversas medidas, que incluem práticas culturais e controle químico com fungicidas, muito embora essas medidas não sejam eficazes se aplicadas isoladamente (PEARSON; GOHEEN, 1988; NAVES et al., 2006; TESSMANN et al., 2007). Entre as práticas culturais que se destacam no controle da doença, temos: remoção de brotos e ramos em excesso, visando melhor aeração dos pomares, evitar o acúmulo de umidade no solo e adubação equilibrada. Com relação à resistência genética as cultivares de origem americana (*V. labrusca* e outras espécies), tais como: Niágara Rosada, Isabel, Concord e Bordô são mais resistentes do que as cultivares originadas de uvas europeias (*V. vinifera*), tais como as uvas finas de mesa do grupo Itália (cultivares Itália, Rubi, Benitaka e Brasil) e uvas finas para vinho (cultivares Merlot, Cabernet Sauvignon, etc). Mais recentemente, a

Embrapa Uva e Vinho lançou a cultivar BRS Vitória que se caracteriza por ser uva de mesa sem sementes, mais tolerante/resistente ao míldio (MAIA et al., 2012).

Para o manejo da doença, existem vários fungicidas com diferentes mecanismos de ação. Dentre os fungicidas protetores, encontram-se: oxicloreto de cobre, clorotalonil, captan, mancozebe, manebe e metiram. A calda bordalesa é um dos fungicidas protetores mais antigos, porém eficiente no controle do míldio. Dentre os fungicidas sistêmicos e de ação translaminar, destacam-se: cimoxanil, metalaxil, fosetil, azoxistrobina, piraclostrobina, ditianona, famoxadona e benalaxil (PEARSON; GOHEEN, 1988; NAVES et al., 2006, TERAO et al., 2012; TESSMANN et al., 2007).

2.3.2 Requeima das folhas

A requeima das folhas da videira observada pela primeira vez, em 1998, em uvas americanas (*Vitis labrusca* L.) e híbridas cultivadas na região de Jales, no estado de São Paulo, no início da maturação dos frutos e, no ano seguinte, o problema passou a ser constatado também nas cultivares de uvas finas (*V. vinifera* L.), durante o ciclo de formação (NAVES; PAPA, 2008).

A etiologia dessa doença não está elucidada, e em regiões tropicais tem gerado preocupações, principalmente, para os produtores de ‘Niágara Rosada’, uma vez que prejudica a perfeita maturação dos frutos, o que acarreta baixos teores de açúcar, elevada acidez e fraca coloração, tornando-os inadequados para a comercialização. Além disso, compromete a formação dos ramos responsáveis pela próxima colheita, devido ao menor acúmulo de reservas de carboidratos. No campo, observou-se que a ocorrência da requeima das folhas está associada às plantas em condições de estresse hídrico, nutricional ou excesso de carga. Tem-se verificado a associação constante da doença com fungos do gênero *Alternaria*, no entanto, os testes de patogenicidade não foram concluídos (NAVES et al., 2006).

A sintomatologia da doença não está completamente caracterizada (TESSMANN et al., 2007). Os sintomas em cultivares de *V. vinifera*, são lesões castanha-claras com bordos escuros, podendo apresentar anéis concêntricos e halo amarelado bem visível, essas lesões predominam nos bordos foliares e podem coalescer cobrindo quase todo o limbo. Em cultivares americanas e híbridas, como a Niágara Rosada, as manchas são bem definidas, de contorno irregular e coloração arroxeadas na face superior das folhas que, em seguida, tornam-

se necróticas e de coloração cinza-escuro. Essas lesões, predominantes nos bordos foliares, aumentam rapidamente de tamanho e podem coalescer, cobrindo quase todo o limbo, o que provoca a morte e queda das folhas. (NAVES et al., 2006).

Até o presente momento, não há resultados de pesquisas que permitam a recomendação de medidas adequadas para o controle da requeima das folhas. Contudo, em observações de campo foi possível verificar uma redução tanto na incidência quanto na severidade dos sintomas quando pulverizações semanais com fungicidas a base de mancozeb e quinzenais com fungicidas do grupo do triazóis (tebuconazole e difenoconazole), normalmente utilizadas para o controle de oídio são iniciadas 30 dias após a poda e se estendem até uma semana após o início do amolecimento das bagas (NAVES et al., 2005).

2.4 Fungos endofíticos

O termo endofítico se origina do grego (*endon*, no interior; *phyton*, planta) e vem sendo constantemente utilizado para descrever a microbiota interna das plantas vivas (SHULZ; BOYLE, 2005; STONE, 2000). Existem várias formas de definir este termo, todavia a definição mais utilizada é a de Petrini (1991) “Todos os organismos que habitam os órgãos das plantas em algum momento de sua vida, podendo colonizar os tecidos internos das plantas sem causar prejuízos aparentes ao hospedeiro”.

Os microrganismos endofíticos têm sido detectados em todas as espécies vegetais já pesquisadas e foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, entretanto, maior notoriedade em trabalhos científicos foi evidenciada apenas no final dos anos 70 do século XX (AZEVEDO, 1999, STONE et al., 2000. STROBEL ; DAISY, 2003). As interações simbióticas com as plantas e sua capacidade de protegê-las demonstram as relevantes funções que esses microrganismos possuem com seus hospedeiros (AZEVEDO, 1999). Nestas associações o microrganismo se beneficia com nutrição e proteção contra estresses abióticos (BACON; HILL, 1996) e a proteção contra patógenos e herbívoros é adquirida pela planta, através de alcaloides tóxicos produzidos na associação simbiótica (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Existem registros que incluem os fungos, as bactérias, os protozoários e nematoides como organismos endofíticos. Todavia, os fungos destacam-se como o grupo de microrganismos mais comumente isolado (GAMBOA; BAYMAN, 2001; GUNATILAKA, 2006). Em sua maioria, os fungos endofíticos pertencem ao filo *Ascomycota* e ao grupo dos

fungos conidiais, havendo também, representantes dos filos *Zigomycota*, *Chytridiomycota*, *Basidiomycota* e *Glomeromycota* (SCHULZ et al., 1999).

A distinção entre fungos endofíticos e de fungos patogênicos, consiste no fato dos primeiros não ocasionarem doença à planta hospedeira, e dos epifíticos, que habitam a superfície dos vegetais. Tal diferenciação entre microrganismos endofíticos e fitopatogênicos foi esclarecida por Bary em 1866 (AZEVEDO, 1999). Segundo SAIKKONEN et al. (1998), os fungos endofíticos surgiram de fungos patogênicos ou parasitas e que teriam desenvolvido uma extensão dos períodos de latência e redução de virulência, devido a íntima relação com a planta hospedeira. Assim, existe gradiente entre endofíticos, epifíticos e fitopatogênicos e não um limite claro. Por exemplo, um fungo endofítico pode tornar-se um patógeno conforme as condições de ambiente ou equilíbrio com outros endofíticos; um epifítico pode, ocasionalmente, introduzir-se na planta e permanecer por certo período, causando ou não danos à mesma (AZEVEDO, 1999). Os endofíticos podem ser patógenos latentes, mutualísticos, comensalistas e/ou saprofíticos (BACON; WHITE, 2000; SCHULTZ; BOYLE, 2005, KOGEL et al., 2006).

A penetração de endófitos na planta é realizada por várias vias, e uma das principais é através das raízes, por ranhuras causadas pelo atrito com o solo durante o crescimento, permitindo a entrada de microrganismos. Outros fungos podem penetrar por aberturas naturais do hospedeiro como estômatos e hidatódios (WAGNER; LEWIS, 2000). Em outros casos, a entrada dos endófitos no tecido vegetal ocorre por meio da secreção de enzimas hidrolíticas (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004), alguns com estruturas especializadas como haustórios e apressórios (STONE et al., 2000) e ainda existe os que atravessam diretamente a parede celular (STONE, 1987).

A colonização dos tecidos vegetais pelos endófitos pode ser intracelular ou intercelular, localizada ou sistêmica e ocorre no primeiro ano de vida da planta e aumenta com o passar do tempo (PUTZKE; PUTZKE, 2002; STONE et al., 2004). Diversos órgãos vegetais como folhas, ramos, caules, raízes e estruturas florais, tais como pólen, ovários, anteras e estames, podem ser colonizados. Todavia, fungos e bactérias parecem apresentar distintas preferências quanto às regiões da planta hospedeira que colonizam (ARAÚJO et al., 2000).

O modo de transmissão de fungos endofíticos pode ser realizado através da dispersão de esporos de planta a planta (horizontalmente) ou por meio do crescimento do fungo em sementes (verticalmente) (SAIKKONEN et al., 1998).

A quantidade de espécies de fungos endofíticos pode variar de acordo com a espécie hospedeira, características do local onde o endófito se instala e a fase de desenvolvimento da planta (OKI et al., 2008). Geralmente uma ou duas espécies de endófitos costumam predominar em um hospedeiro, enquanto outras se encontram em reduzida frequência de colonização (CARROL; CARROL, 1978; ARNOLD et al., 2003).

As estações do ano e o clima local podem influenciar a quantidade e a diversidade desses fungos (OKI et al., 2008). Plantas perenes de áreas tropicais e semitropicais do mundo hospedam uma elevada quantidade de endófitos quando comparada àquelas pertencentes às áreas mais secas ou frias (STROBEL, 2003).

Dificuldades são detectadas na identificação de micróbios endófitos e na descoberta *In vivo*, ao fato de que a relação endófito/hospedeiro tende a ser imperceptível (PADHI et al., 2013). Todavia, vários métodos podem ser utilizados para a detecção e identificação dos fungos presentes nos tecidos vegetais, como a observação histológica, a desinfestação superficial do tecido do hospedeiro seguida de isolamento dos fungos emergentes em meio de cultura adequado, ou ainda a detecção por métodos químicos específicos (como métodos imunológicos ou amplificação do DNA fúngico diretamente nos tecidos das plantas) (SCHULZ; BOYLE, 2005).

O isolamento de um grande número de espécies endofíticas pode ser efetuado dos tecidos saudáveis de um único hospedeiro. A interferência quantitativa e qualitativa na biodiversidade da microbiota endofítica pode ser influenciada por diversos fatores como a idade da planta, o tecido ou órgão e até mesmo o tempo gasto até serem submetidos ao isolamento (PEIXOTO NETO et al., 2004). O isolamento pode ser executado a partir de raízes, caules, ramos, folhas, sementes e estruturas florais como pólen, ovário, anteras e sementes (ARAÚJO et al., 2010).

A detecção de microrganismos endofíticos pode contar com o auxílio da microscopia ótica e eletrônica, no entanto não descarta a necessidade de isolamento destes (PEREIRA et al. 1993; ARAÚJO et al., 2002). Os processos de esterilização superficial delimitam o *habitat* endofítico, ou seja, o caráter endofítico é determinado a partir de isolamentos efetuados em tecidos vegetais superficialmente estéreis (SAKIYAMA et al., 2001).

Outra metodologia consiste na observação direta dos fungos endofíticos em tecidos senescentes de seus hospedeiros, entretanto tal método é dificultado pelo crescimento de saprófitas nestes tecidos, impedindo a distinção entre esses dois grupos. Todavia, segundo SINCLAIR; CERKAUSKAS (1996), esse mecanismo pode ser facilitado com o uso do

herbicida Paraquat®, o qual induz a esporulação precoce dos fungos colonizadores do interior dos tecidos (ABREU, 2005).

2.5 O gênero *Alternaria*

As espécies de *Alternaria* formam um grupo heterogêneo de fungos, que incluem patógenos de plantas, saprófitas e endofíticos difundidos em uma variedade de habitats (LOURENÇO et al., 2009; WOUDEBERG et al., 2013). Esses fungos desenvolvem-se melhor em condições tropicais, caracterizadas por clima quente e úmido e ainda são resistentes a temperaturas baixas e extremamente altas. A ocorrência em ambientes desfavoráveis deve-se a tolerância a extremos ambientais. (ROTEM, 1994).

Em 1816, o gênero *Alternaria* foi estabelecido por Nees, sendo *A. alternata* (originalmente *A. tenuis*) como a espécie-tipo (ROTEM, 1994). O número de espécies que compõem o gênero apresenta muita variação, ademais, a avaliação de dados específicos é difícil, em virtude, da proliferação de sinônimos nomenclaturais de validação duvidosa (SIMMONS, 2007).

O gênero *Alternaria* pertence ao reino Fungi, subreino Eumycotera, filo Fungo Imperfeito (não filogenética ou filo artificial de fungos, sem fases sexuais conhecidas, cujos membros podem ou não estar relacionados, a taxonomia não reflete relações), classe Hyphomycetes, ordem Moniliales, família Dematiaceae, gênero *Alternaria*. Apesar de não ter uma fase sexual conhecida ou esporos de hibernação, o fungo pode sobreviver como micélio ou esporos de restos de plantas em decomposição por um tempo considerável, ou como uma infecção latente em sementes (THOMMA, 2003).

As espécies de *Alternaria* apresentam como principais características a produção de melanina, bem como a produção de toxinas específicas do hospedeiro, no caso de espécies patogênicas (THOMMA, 2003). A maioria das toxinas possui baixo peso molecular e são componentes celulares que ocasionam mudanças fisiológicas e histológicas no hospedeiro. Com base na seletividade, as toxinas podem ser divididas em duas categorias que incluem as específicas e as não específicas do hospedeiro (ROTEM, 1994).

Muitas toxinas não específicas foram identificadas nas espécies de *Alternaria*, as quais apresentam um efeito fitotóxico relativamente leve quando comparadas com as toxinas específicas e não é um pré-requisito para infecção. Entretanto, as toxinas específicas estão envolvidas no desenvolvimento de algumas doenças destrutivas que geralmente apresentam

efeitos graves para espécies ou cultivares que servem como hospedeiros do patógeno produtor da toxina (THOMMA, 2003).

A principal característica taxonômica e que facilita no reconhecimento pela morfologia do gênero *Alternaria* consiste na produção de conídios grandes, multicelulares, de cores escuras (melanizados), bem como septos longitudinais e transversais. Esses conídios são mais amplos perto da base e diminuem gradualmente para um bico alongado. Eles são formados em cadeias simples ou ramificados ou ainda solitariamente (HONDA et al., 1987, 1990). A formação do conídio é realizada apenas pela parede interna da célula conidiogênica (conidiogênese politétrica). Os conidióforos são solitários, eretos ou subdecumbentes, septados, simples ou ramificados, escuros e, frequentemente, a ponta do conidióforo apresenta o mesmo diâmetro de suas outras células (SIMMONS, 1995).

Embora os conídios do gênero *Alternaria* sejam distintos e fáceis de reconhecer e facilmente separados em esporulados grandes e grupos de espécies de esporulados pequenos, é difícil elucidar as várias espécies dentro do gênero devido a um elevado grau de semelhança nas suas características morfológicas, elevada variabilidade e polimorfismo que ocorre mesmo em culturas puras (SIMMONS, 1992). As características morfológicas dos conídios e padrões de conidiogênese são critérios utilizados para classificação e identificação de espécies de *Alternaria*. Assim, foi proposto que as espécies de *Alternaria* cujos conídios mostram a mesma faixa de tamanho podem ser classificadas em diferentes táxons com base nos padrões de esporulação (SIMMONS, 1992). Alguns critérios morfológicos são mais relevantes do que os outros, quando se pretende identificar as espécies individualmente. Para determinadas espécies, a dimensão do corpo do esporo, incluindo o rostro, é considerada a característica de maior importância. O comprimento do conídio aparenta ser mais importante que a largura na parte mais larga, sendo que a maioria das espécies apresenta semelhança neste quesito. Todavia, variam bastante no comprimento (ROTEM, 1994).

Tradicionalmente, a identificação e a classificação evolutiva das espécies de fungos são fundamentadas principalmente na caracterização morfológica. No entanto, recentemente foi descrito estudos filogenéticos revolucionários, com base na comparação de seqüências de genes de RNA ribossômico de PCR amplificado, que abriram o caminho para a caracterização e classificação mais avançada dos fungos (MIADLIKOWSKA et al., 2006; JAMES et al., 2006). Essas conquistas resultaram em uma visão refinada e melhorada da sistemática molecular de fungos, na qual foi estabelecida e geralmente aceita dentro da comunidade científica (HIBBETT et al., 2007).

O estabelecimento das relações filogenéticas com base na região ITS vem sendo utilizada para espécies de *Alternaria* que produzem toxinas específicas a hospedeiras (KUSABA; TSUGE, 1995) ou que são patogênicas a crucíferas (JASALAVICH et al., 1995), assim como de outras espécies que pertencem a ordem Pleosporales (KHASHNOBISH; SHEARER 1996; MORALES et al., 1992; MORALES et al., 1995).

Análises filogenéticas do gênero também têm sido realizadas com o gene Alt a1, codificador de uma proteína alergênica encontrado em espécies de *Alternaria*. Além deste gene, o *gpd* também suporta a separação de grupos de *Alternaria*, bem como de táxons relacionados em espécies-grupos, entretanto as espécies estreitamente relacionadas não estão completamente elucidadas e outras regiões genômicas polimórficas necessitam análises (HONG et al., 2005).

Uma comparação efetuada entre homólogos do gene Alt a1 de *A. alternata* e *A. brassicicola* revelou maior divergência entre as sequências desta região, quando em comparações similares com outros genes ribossomais, como o ITS e o SSU do rDNA e codificadores de proteínas, como a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, codificada pelo gene *gpd*. O gene Alt a1 apresentou 92% de similaridade versus 96,99% e 97% para os outros genes, respectivamente (CRAMER; LAWRENCE, 2003; PRYOR; BIGELOW, 2003).

3 REFERÊNCIAS

- ABREU, L. M. **Diversidade de fungos endofíticos associados à planta parasita *Phoradendron perrottettii* (D.C.) Eichler e sua hospedeira *Tapirira guianensis* Aubl.** Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais, 2005. 96 p.
- ALBUQUERQUE, T. C. S. **Uva para exportação: aspectos técnicos da produção.** Brasília: Embrapa, 1996.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology.** 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- ALVARENGA, A. A.; ABRAHÃO, E.; REGINA, M. A.; ANTUNES, L. E. C.; PEREIRA, A. F. Origem e classificação botânica da videira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.19, n.194, p.5-8, 1998.
- AMORIM, L.; KUNIYUKI, H. Doenças da videira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; RESENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 4. ed., p.165-180, 2005.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUKLINSKY SOBRAL, J.; LACAVAL, P. T. **Manual isolamento de microrganismos endofíticos.** Piracicaba: CALQ, 2002.
- ARAÚJO, W. L.; LACAVAL, P. T.; MARCON, J.; LIMA, A. O. S.; KUKLIMSKY-SOBRAL, J.; KLEINER-PIZZIRANI, A. A.; AZEVEDO, J. L. (Cord.) **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos.** Piracicaba: CALQ, 2010.
- ARNOLD, A. E.; MEJÍA, C. L.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 10, p. 15649-15654, 2003.
- AZEVEDO, J.L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.22, p. 225-229, 1999.
- BACON, C. W.; HILL, N. S. Symptomles gras endophytes : products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of infected grasses. In: REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. (Eds.) **Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants.** Saint Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Pres, 1996.
- BACON, C. W., WHITE Jr., J. F. **Microbial endophytes.** New York, Marcel Dekker. 487p., 2000.
- CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A.; **Progressos na Viticultura Brasileira.** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 33, p. 144 – 149, 2011.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P. **Embrapa Uva e Vinho: novas cultivares brasileiras de uva**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. United States: Wiley-Liss, 1990.

CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E.; Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, p. 3034-3043, 1978.

CRAMER, R.A., LAWRENCE, C.B. Cloning of a gene encoding an *Alt a 1* isoallergen differentially expressed by the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* during *Arabidopsis* infection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 2361–2364, 2003.

CRONQUIST, A. **An Integrated system of classification of flowering plant**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262p.

ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 1. ed. Caxias do Sul: Edusc – Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2004.

GALET, P. **Grape varieties and rootstocks varieties**. Paris: Oenoplurimédia, 1998. 315 p.

GAMBOA, M.A.; BAYMAN, P. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). **Biotropica**, Lawrence, p. 352-360, 2001.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 1ª edição. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78p.

GUNATILAKA, A.A.L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, University of Illinois, Chicago. USA, v. 69, p. 509-526, 2006.

HIBBETT DS, BINDER M, BISCHOFF JF, BLACKWELL M, CANNON PF, ERIKSSON OE, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycologia**, New York, v. 111, p. 509-47, 2007.

HONDA, Y., NANBA, N. AND NOZU, M. A further study on ultrastructural aspects of photo-induced conidiogenesis and differentiation in *Alternaria solani*. **Bull. Fac. Agr.**, Hirosaki Univ., Japan, v. 24, p. 39–46, 1990.

HONDA, Y., SOTA, K. AND NOZU, M. An ultrastructural study of photo-induced conidiogenesis and dedifferentiation in *Alternaria solani*. **Bull. Fac. Agr.**, Hirosaki Univ., Japan, v. 21, p. 141–154, 1987.

HONG, S.G., CRAMER, R.A., LAWRENCE, C.B., PRYOR, B.M. *Alt a1* homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, (2005) p. 119-129. 2004.

- IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 30 maio 2013.
- JAMES, T. Y.; KAUFF, F.; SCHOCH, C. L.; MATHENY, P. B.; HOFSTETTER, V.; COX, C. J.; et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, London, v. 443, p. 818-22, 2006.
- JASALAVICH, C. A., MORALES, V. M., PELCHER, L. E., SEGUIN-SWARTZ, G. Comparison of nuclear ribosomal DNA sequences from *Alternaria* species pathogenic to crucifers. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, p. 604-614, 1995.
- KHASHNOBISH, A., SHEARER, C. A. Phylogenetic relationships in some *Leptosphaeria* and *Phaeosphaeria* species. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, p. 1355-1363, 1996.
- KISHINO, A. Y.; CARVALHO, S. L. C.; ROBERTO, S. R. Viticultura Tropical: o sistema de produção do Paraná. Londrina: **Instituto Agrônomo do Paraná**, 2007. 366 p.
- KOGEL, K. H., FRANKEN, P., HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, p. 358-363, 2006.
- KUSABA, M., TSUGE, T. Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Current Genetics**, New York, v. 28, p. 491-498. 1995.
- LAFON, R.; BULIT, J. Downy Mildew of the Vine. In: SPENCER, D. M. (ed) **The Downy Mildews**. Nova Iorque: Academic Press, p 601-614. 1981.
- LAFON, R.; CLERJEAU, M. Downy Mildew of the Vine. In: PEARSON, R. C; GOHEEN, C. **Compendium of Grape Diseases**. Saint Paul: APS Press, 1990, p. 11-13.
- LAFON, R.; CLERJEAU, M. Downy mildew. In: PEARSON, R. C.; GOHEEN, A. C. (Ed.). **Compendium of grape diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1988. p.11-13
- LAWRENCE, D. P.; GANNIBAL, P. B.; PEEVER, T. L. and PRYOR, B. M. The Sections of *Alternaria*: Formalizing species-group concepts. **Mycologia**, New York, v. 105, p. 530-546, 2013.
- LIMA, M. F.; LOPES, D. B.; TAVARES, S. C. C. H.; TESSMANN, D. J.; MELO, N. F. Doenças e alternativas de controle. In: **A Vitivinicultura no Semiárido Brasileiro**. 659-675. Embrapa Semi-Árido, Petrolina, p.543-566, 2009.
- LOURENÇO, J. R. V.; MOY, A. A.; GONZÁLEZ-CANDELAS, F.; CARBONE, I., MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Molecular diversity and evolutionary processes of *Alternaria solani* in Brazil inferred using genealogical and coalescent approaches. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, p. 765-774, 2009.
- MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P. S.; CAMARGO, U. A.; SOUZA, R. T. de; FAJARDO, T. V. M.; NAVES, R. de L.; GIRARDI, C. L. **‘BRS Vitória’: nova cultivar de uva de mesa sem sementes com sabor especial e tolerante ao míldio**. Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 126. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2012.

MANICA, I.; POMMER, C. V. **Uva do plantio a produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Ed. Cinco Continentes, 2006. 185p.

MELLO, L. M. R. **Avaliação de impactos da uva niágara rosada para regiões tropicais**. Disponível em: < http://bs.sede.embrapa.br/2013/relatorios/uvaevinho_2013_uvaniagara.pdf>. Acesso em 28 jan. 2015.

MELLO, L. M. R. **Mercado brasileiro de uvas e vinhos**. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br>>. Acesso em: 15 jul. 2014.

MIADLIKOWSKA J, KAUFF F, HOFSTETTER V, FRAKER E, GRUBE M, HAFELLNER J, et al. New insights into classification and evolution of the Lecanoromycetes (Pezizomycotina, Ascomycota) from phylogenetic analyses of three ribosomal RNA- and two protein-coding genes. **Mycologia**, New York, v. 98, p.1088-103, 2006.

MORALES, V. M., PELCHER, L. E., TAYLOR, J. L. Comparison of the 5.8s rDNA and internal transcribed spacer sequences of isolates of *Leptosphaeria maculans* from different pathogenicity groups. **Current Genetics**, New York, v. 23, p. 490-495. 1992.

MORALES, V. M., JASALAVICH, C. A., PELCHER, L. E., PETRIE, G. A., TAYLOR, J. L. Phylogenetic relationship among several *Leptosphaeria* species based on their ribosomal DNA sequences. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, p. 593-603, 1995.

NAVES, R. L.; GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R.; KUHN G.B. Sistema de produção de uvas rústicas para processamento em regiões tropicais do Brasil. 2005. Disponível em: < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasRusticasParaProcessamento/doencas.htm>> Acesso em: 08 jun. 2013.

NAVES, R. L.; GARRIDO, L. R.; FAJARDO, T. V. M. Doenças da videira causadas por fungos, vírus e bactérias. In: **O cultivo da videira Niágara no Brasil** / editores técnicos, João Dimas Garcia Maia, Umberto Almeida Camargo. – Brasília, DF : Embrapa. Cap. 10, p. 189-228, 2012.

NAVES, R. de L.; PAPA, M. de F. S. Doenças em cultivares de uvas rústicas em regiões tropicais. In: BOLIANI, A. C.; FRACARO, A. A.; CORRÊA, L. de S. (Ed.). **Uvas rústicas de mesa: cultivo e processamento em regiões tropicais**. Jales: [s.n.], 2008.

NAVES, R. L.; GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R. **Controle de doenças fúngicas em uvas de mesa na região Noroeste do Estado de São Paulo**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2006. 17 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 68).

OKI, Y.; FERNANDES, G. W.; CORREA JUNIOR, A. Fungos: amigos ou inimigos? **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 42, n. 252, p. 64-6, 2008.

PADHI L.; MOHANTA, Y. K.; PANDA, S. K. Endophytic fungi with great promises: A review, **Journal of Advanced Pharmacy Education & Research**, 3(3), p. 152-170, 2013.

PEARSON, R. G.; GOHEEN, A. C. **Compendium of grape diseases**. Minnesota: APS, 1988. 93 p.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. Santiago, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic Fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**, New York, v. 85, p. 362-364, 1993.

PETRINI, O. **Fungal endophyte os tree leaves**. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. (Ed.). *Microbial ecology of leaves*. Washington: Springer Verlag, p. 179-197, 1991.

PRYOR, B.M., BIGELOW, D.M. Molecular characterization of *Embellisia* and *Nimbya* species and their relationship to *Alternaria*, *Ulocladium*, and *Stemphylium*. **Mycologia**, New York, v. 95, p. 1139–1152, 2003.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os Reinos dos Fungos**. Editora EDUNISC, Rio Grande do Sul, v.2, p. 617-829, 2002.

RIBEIRO, I. J. A. Doenças e pragas. In: POMMER, C. V. (Ed.). **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 525-633, 2003.

ROTEM, J. **The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity**. Saint Paul, MN, USA: APS press, 1994.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T.J. Fungal endophytes: continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, p. 319-343, 1998.

SAKIYAMA, C.C.H.; PAULA, E.M.; PEREIRA, P.C.; BORGES, A.C.; SILVA, D.O. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.33, p.1-5, 2001.

SATO, G. S. Análise do consumo de uva para mesa no Brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, n. 7, v. 34, 2004.

SCHULZ, B.; RÖMMERT, A-K.; DAMMANN, U.; AUST, H-J.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? **Mycology Research**, Cambridge, v. 10, p.1275-1283, 1999.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycology Research**, Cambridge. p. 661-686, 2005.

SENTELHAS, P.C. Aspectos climáticos para a viticulture tropical. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 194, p. 9-14, 1998.

SIMMONS, E. G. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint and challenge. In: Chelkowski J, Visconti A (eds) ***Alternaria, Biology, Plant Diseases and Metabolites***. Elsevier Science Publishers, Amsterdam-London-New York-Tokyo. 1-36, 1992.

SIMMONS, E. G. *Alternaria* themes and variations (112–144). **Mycotaxon**, Ithaca, v. 55, p. 55–163, 1995.

SIMMONS, E. G. ***Alternaria: an identification manual***. Utrecht: CBS. CBS Biodiversity Series, 6. P.775. 2007.

SINCLAIR, J. B.; CERKAUSKAS, R. F. Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. In: REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. (Ed.) **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. St. Paul: APS Press, p. 03-29, 1996.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. (Circular Técnico, 56). 2005.

SOUZA, J. S. I. **Uvas para o Brasil**. Piracicaba: FEALQ, 1996. 791 p.

SOUZA, J. S. I.; MARTINS, F. P. **Viticultura Brasileira: Principais variedades e suas características**. Piracicaba: FEALQ, 368 p. 2002.

STONE, J. K., J. F. WHITE, Jr., J. D. Polishook. Endophytic fungi. pp. 241-270. In: **Measuring and Monitoring Biodiversity of Fungi. Inventory and monitoring methods**. G. Mueller, G. Bills, M. Foster (eds.). Elsevier Academic Press, Boston, MA, 2004.

STONE, J.K., BACON, C.W. & WHITE, J.F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: C.W. BACON & J.F. WHITE (Ed.) **Microbial Endophytes**, New York: Marcel Dekker.pp. 3-30, 2000.

STONE, J. K. Initiation and development of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, p. 2614–2621, 1987.

STROBEL, G. A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Review**, New York, v. 67, p. 491-502, 2003.

TERAO, D.; BARBOSA, M. A. G.; BATISTA, D. C. Doenças causadas por fungos. In: **Uva de mesa: fitossanidade**. 2 ed. Rev ampl.-Brasília, DF: Embrapa, cap. 2, p. 11-31, 2012.

TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B.; GENTA, W.; KISHINO, A. Y. Doenças e seu manejo. In: Antonio Y. Kishino; Sérgio, L. C. Carvalho; Sérgio R. Roberto. (Org). **Viticultura Tropical – O sistema de Produção do Paraná**. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), p.25-293, 2007.

THOMMA, B. P. H. J. *Alternaria* spp.: From general saprophyte to specific parasite. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, p. 225-236, 2003.

TRIGIANO, R. N.; AMENT, M. H.; LAMOUR, K. H. Oomicetos. In: TRIGIANO, Roberto N.; WINDHAM, Mark T.; WINDHAM, Alan S. (Ed.). **Fitopatologia**. II Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 20, p. 215-225.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. Influência da temperatura e da umidade nas epidemias de doenças de plantas. In: **Revista Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 149-207, 1996.

VALE, F. X. R.; JESUS JÚNIOR, W. C.; ZAMBOLIM, L. Natureza das epidemias. In: VALE, F. X. R. et al. **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte:Perfil, p. 21-46, 2004.

WAGNER, B. L.; LEWIS, L. C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3468-3473, 2000.

WOUDENBERG, J.; GROENEWALD J.; BINDER, M.; CROUS, P. *Alternaria* redefined. **Stud Mycol**. Utrecht, v. 75, p. 171-212, 2013.

CAPÍTULO 1

Patogenicidade de *Alternaria* spp. em videira ‘Niágara Rosada’

RESUMO

A requeima das folhas da videira é uma doença de etiologia desconhecida, importante na região de Jales, estado de São Paulo, a qual tem sido constantemente associada a fungos do gênero *Alternaria*. O objetivo do trabalho foi determinar a patogenicidade de nove isolados de *Alternaria* em mudas de videira ‘Niágara Rosada’. As folhas foram inoculadas por aspersão de suspensão de conídios em água e também em emulsão de água com óleo mineral. Alternativamente, a inoculação foi feita pela deposição de plugs de micélio na superfície das folhas. As plantas foram mantidas por diferentes períodos de câmara úmida e em seguida em casa de vegetação. Investigou-se também a indução de sintomas de requeima das folhas mediante aplicações sucessivas de hidróxido de cobre, bem como aplicações de paraquat para acelerar a colonização endofítica. A identificação das espécies baseou-se em características morfológicas e na análise de DNA de uma porção do gene *Alt a1.*, o qual é considerado informativo da filogenia de espécies desse gênero. Verificou-se que os nove isolados não foram patogênicos e que aplicações sucessivas de hidróxido de cobre nas folhas podem causar clorose e necrose nas folhas, com alguma semelhança com os sintomas de requeima. Além disso, espécies de *Alternaria* podem ser encontradas colonizando tecidos saudáveis de folhas de videira, caracterizando-se assim como colonização endofítica. Sete isolados foram identificados como *A. resedae* (= *A. septorioides*) e dois isolados como *A. alternata*.

Palavras-chave: Niágara Rosada. Requeima das folhas. Videira.

ABSTRACT

The leaf blight is an important disease of unknown etiology in the region of Jales, in São Paulo State, Brazil, which has been consistently associated with fungi of the genus *Alternaria*. The objective was to determine the pathogenicity of nine isolates of *Alternaria* in young plants of 'Niágara Rosada'. The leaves were inoculated by spraying the spore suspension in sterile water or in water/oil emulsion. Alternatively, the inoculation was made by depositing plugs of mycelium on the surface of the leaves. The plants were kept for different periods of humid chamber and then in a greenhouse. It also investigated the induction of leaf blight symptoms by successive applications of copper hydroxide and paraquat applications to accelerate endophytic colonization. Species identification was based upon DNA analysis of a portion of *Alt a1* gene, which is considered informative about *Alternaria* phylogeny. It was found that nine isolates were not pathogenic and successive application of copper hydroxide can cause chlorosis and necrosis on leaves, having some resemblance with the symptoms of leaf blight. In addition, *Alternaria* spp. were found colonizing healthy leaves, evidencing their endophytism. Seven isolates were identified as *A. resedae* (= *A. septorioides*) and two isolated as *A. alternata*.

Keywords: Leaf blight. Niágara Rosada. Vine

1 INTRODUÇÃO

A viticultura tropical teve grande expansão no Brasil nas últimas décadas. Um dos principais polos concentra-se na região de Jales, localizada no noroeste do estado de São Paulo, que se destaca na produção de uvas de mesa, especialmente a cultivar Niágara Rosada (*Vitis labrusca*) e cultivares como a Itália e suas mutações, Rubi e Benitaka (*V. vinifera*) (COSTA et al., 2008).

O cultivo da videira nessa região é afetado por diversas doenças fúngicas, com destaque em ordem decrescente de importância, o míldio (*Plasmopara viticola*), o oídio (*Uncinula necator*), a requeima ou alternaria (etiologia não determinada), a morte descendente ou botriodiplodiose (*Botryosphaeria* spp.), a podridão dos cachos (*Glomerella cingulata*), a antracnose (*Elsinoe ampelina*) e a ferrugem (*Phakopsora euvitis*). Em ‘Niágara Rosada’, cultivar de uva rústica, não foi relatada a ocorrência de oídio e podridão dos cachos, porém é seriamente afetada pela requeima das folhas (TARSINATO et al., 2013).

A requeima das folhas da videira constantemente associada a *Alternaria* tem sido observada na região de Jales (SP) e tem gerado preocupações principalmente para os produtores de ‘Niágara Rosada’, por representar um novo desafio à viticultura nas regiões tropicais. Tal denominação está vinculada aos sintomas típicos que correspondem às manchas bem definidas, de contorno irregular e coloração arroxeada que, em seguida, tornam-se necróticas e de coloração cinza-escura. Essas lesões, predominantes nos bordos foliares, aumentam rapidamente de tamanho e podem cobrir quase todo o limbo, provocando a morte e a queda das folhas (NAVES et al., 2006).

O gênero *Alternaria* é conhecido por conter além de espécies fitopatogênicas, alergênicos em humanos, espécies saprófitas, epifíticas e endofíticas. Estas últimas ocorrem em diferentes hospedeiros, entre as quais as videiras (MUSETTI et al., 2006.; BRUM 2006, 2008; GONZÁLES e TELLO, 2011; MEDINA et al., 2005; MOSTERT et al., 2000; MUSETTI et al., 2006).

A identificação das espécies do gênero *Alternaria* tem sido baseada principalmente em características morfológicas, tais como a forma de conídios e número de esporos na cadeia, embora essas características possam ter uma grande variabilidade intraespecífica. No entanto, as ferramentas moleculares têm sido usadas recentemente com o aumento da eficiência na identificação de espécies deste gênero. (LONGRIECO et al., 2009; PEEVER et al., 2004).

Com intuito de aprofundar os conhecimentos sobre a etiologia dessa doença, a hipótese explorada do trabalho é de que espécies de *Alternaria* atuam como agentes causais da requeima das folhas na videira. Desta forma, o objetivo foi determinar a patogenicidade de nove isolados de *Alternaria* associados a folhas de videiras com sintomas de requeima na cultivar Niágara Rosada. Objetivou-se também caracterizar os isolados utilizados no teste de patogenicidade, com base em características morfológicas e moleculares, sendo a identificação baseada primordialmente no sequenciamento de DNA a partir de uma porção do gene *Alt a1*, o qual é considerado informativo sobre a filogenia deste gênero e por último, investigar *Alternaria* como fungo endofítico em folhas de videira.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e casa de vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), localizados em Maringá, no Estado do Paraná.

As mudas de videira da cultivar Niágara Rosada foram cultivadas em vasos. Nos ensaios foram utilizadas mudas de idade de seis meses, apresentando seis a oito folhas expandidas, as quais foram adquiridas da Embrapa Uva e Vinho – Estação Experimental de Jales.

2.1 Obtenção dos isolados

Os isolamentos monospóricos foram realizados a partir de folhas sintomáticas de videiras da cultivar Niágara Rosada, as quais foram coletadas na área experimental da Embrapa e em dois parreirais da região de Jales, SP. Para tanto, as folhas foram lavadas com água corrente e, em seguida, cortaram-nas em segmentos foliares, os quais foram transferidos para gerbox, que previamente foi preparado com duas folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas. Após o vedamento, o gerbox foi incubado a $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 3-4 dias. Transcorrido este período, foram preparados tubos de ensaio contendo 10 mL de água estéril, com uma suspensão de esporos, bem diluída, advindos do material proveniente da câmara úmida. Em seguida, foram vertidas 1 mL desta suspensão sobre a superfície de um meio sólido, contendo ágar-água (AA) e espalhadas uniformemente através de movimentos rotatórios das placas realizados manualmente, até que a superfície do meio seja coberta. As placas foram incubadas em posição inclinada, a temperatura de $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas durante 24 horas. No dia seguinte, estas placas foram examinadas na lupa Leica (80X). Pequenos quadrados de ágar (1 mm^2) foram retirados com os conídios germinados, transferindo-os para tubos de ensaio contendo batata-dextrose-ágar (BDA).

2.2 Isolados de *Alternaria* spp. e produção de inóculo

Foram utilizados 9 isolados de *Alternaria* spp., de distintas propriedades rurais da região de Jales, estado de São Paulo: 1 de *Alternaria* spp. oriundo da Propriedade A, denominado de D1, 6 de *Alternaria* spp. oriundos da Propriedade B, nomeado de ZM1, ZM2,

ZM4, ZM5, ZM6 e ZM7 e 2 de *Alternaria* spp. oriundos da Embrapa, denominados de NR1 e NR2.

Para produção de inóculo, os isolados monospóricos foram cultivados em placas de petri contendo o meio V8 (200 mL de suco V-8, 3 g de CaCO₃, 17 g de ágar, 800 mL de água destilada) a 25°C±2°C, fotoperíodo de 12 horas. No quinto dia de incubação, as placas de petri foram transferidas para luz negra 40W (Golden e posicionada 30 cm de altura das placas), com fotoperíodo de 12 horas por três dias a 22°C ± 2°C. As colônias incubadas por oito dias foram submetidas ao fator injuriante, raspagem do micélio aéreo com espátula em câmara de fluxo laminar. Após este procedimento, as colônias foram mantidas a temperatura de 23°C±2°C, sob fotoperíodo de 12 horas no escuro e 12 horas em luz negra, por oito dias, visando sua esporulação. Os conídios foram removidos em 10 mL de água destilada esterilizada, por raspagem da colônia com espátula. A suspensão foi filtrada em camada dupla de gaze esterilizada, a qual foi recolhida em um béquer. A concentração foi ajustada, com auxílio da câmara de Neubauer e expressa em conídios.ml⁻¹ de colônia.

2.3 Teste de patogenicidade dos isolados

2.3.1 Aspersão da parte aérea da planta

Foram realizados nove ensaios correspondentes ao número de culturas monospóricas escolhidas aleatoriamente, através da inoculação das folhas com e sem ferimentos e na presença ou ausência do óleo mineral (Assist®). Os ferimentos foram realizados com furarrolha de 2,3 cm de diâmetro que consta de uma série de 20 agulhas, sendo efetuadas na metade das folhas três perfurações na região dos bordos foliares e na outra metade procedeu-se ferimentos por meio de ranhuras (Figura 1). O óleo mineral foi adicionado à suspensão de inóculo e a água destilada esterilizada (controle), sendo permitida a hidratação 30 minutos antes da aspersão. A produção de inóculo foi realizada conforme descrito no item 2.2.

Os experimentos constaram de oito mudas de videira, sendo que quatro mudas com quatro folhas escolhidas aleatoriamente foram pulverizadas com água na presença ou ausência do óleo mineral, correspondendo à testemunha. As demais videiras foram aspergidas com suspensão de esporos misturados ou não em óleo mineral, em concentrações variando de 10⁴ a 10⁵ conídios.ml⁻¹. Em seguida, as plantas foram revestidas com saco plástico transparente umedecido, formando uma câmara úmida por períodos predeterminados em casa de vegetação e câmara climatizada (Tabela 1). Os tratamentos um, dois, três e quatro foram pulverizados

com suspensão de esporos, sendo os seguintes: T1, folhas com ferimentos na presença de óleo mineral; T2, folhas sem ferimentos na presença de óleo mineral; T3, folhas com ferimentos na ausência de óleo mineral; T4, folhas sem ferimentos e na ausência de óleo mineral. Os tratamentos cinco, seis, sete e oito foram aspergidos com água (testemunha), sendo eles: T5, folhas com ferimentos na presença de óleo mineral; T6, folhas sem ferimentos na presença de óleo mineral; T7, folhas com ferimentos na ausência de óleo mineral; T8, folhas sem ferimentos e na ausência de óleo mineral.

A patogenicidade foi avaliada no dia posterior a retirada dos sacos plásticos utilizados na formação da câmara úmida, estendendo-se de 15 a 20 dias após a inoculação. O experimento foi realizado duas vezes.

2.3.2 Deposição de discos de micélio

Os mesmos isolados e tratamentos apresentados no item 2.3.1 foram utilizados neste método de inoculação, porém não se fez uso do óleo mineral. A inoculação procedeu-se na aplicação de seis discos de micélio de 5 mm de diâmetro dos isolados de *Alternaria*, cultivados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) por oito dias sobre a superfície foliar com crescimento micelial voltado para baixo. As testemunhas constaram de cilindros de batata-dextrose-ágar (BDA) na ausência da cultura de *Alternaria*. Posteriormente, os discos de micélio foram prendidos com durex e as plantas mantidas em câmara úmida por períodos predeterminados (Tabela 1).

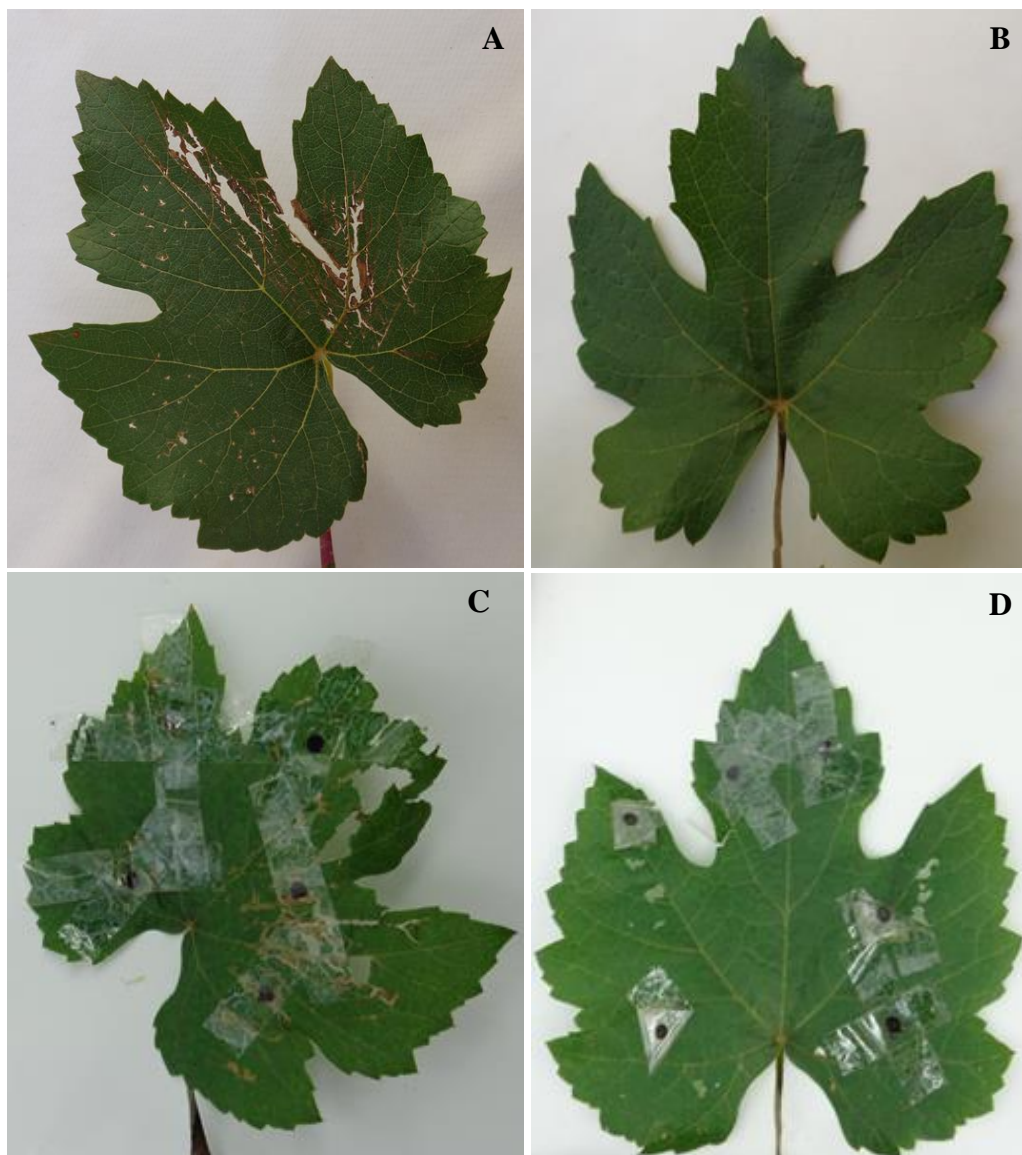


Figura 1. Métodos de inoculação. A e B: com e sem ferimento. C e D: deposição de discos de micélio.

Tabela 1. Permanência em câmara úmida (hr) dos isolados utilizados nos testes de patogenicidade

| Isolado | Permanência em câmara úmida (hr) | |
|---------|---|--|
| | 1º experimento | 2º experimento |
| ZM1 | 48 | 2 ciclos*: 1º período: 48 intervalo: 24 2º período: 48 |
| D1 | 48 | 2 ciclos: 1º período: 72 intervalo: 24 2º período: 96 |
| ZM6 | 72 | 2 ciclos: 1º período: 72 intervalo: 24 2º período: 96 |
| NR1 | 120 | 2 ciclos: 1º período: 72 intervalo: 24 2º período: 96 |
| ZM2 | 2 ciclos: 1º período: 12 intervalo: 12 2º período: 12 | 2 ciclos: 1º período: 72 intervalo: 24 2º período: 96 |
| ZM7 | 2 ciclos: 1º período: 24 intervalo: 24 2º período: 24 | 2 ciclos: 1º período: 72 intervalo: 24 2º período: 96 |
| ZM5 | 120 | 2 ciclos: 1º período: 72 intervalo: 24 2º período: 96 |
| ZM4 | 120 | 2 ciclos: 1º período: 72 intervalo: 24 2º período: 96 |
| NR2 | 48 | 2 ciclos: 1º período: 72 intervalo: 24 2º período: 96 |

*2 ciclos de Câmara úmida intermitente (dois períodos de molhamento foliar, com um intervalo ausente de molhamento foliar).

2.4 Avaliação da indução de sintomas de requeima das folhas mediante aplicações sucessivas de hidróxido de cobre

No município de Marialva, região norte do estado do Paraná, foi observada a ocorrência de sintomas da requeima das folhas da videira, na safra do primeiro semestre de 2014. Segundo relatos de alguns produtores da região, foi levantada a hipótese das aplicações de cobre ter sido a possível causa para o aparecimento da requeima das folhas. Em trabalho

realizado por Gartel (1977), citado por Rotem (1994), foi possível isolar espécies de *Alternaria* a partir de frutos de videira que foram danificados por queimaduras provocadas pelo sol. Esta informação, associada aos relatos dos produtores impulsionaram o desenvolvimento da metodologia. Desta forma, com intuito de investigar a relação destas aplicações com o aparecimento da doença na região, procedeu-se a montagem do ensaio ao ar livre na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Cerca de 16 mudas de videira da cultivar Niágara Rosada foram transferidas para o ambiente externo da casa de vegetação, com objetivo de simular as condições que ocorrem no campo e detectar a existência ou não da relação com a requeima das folhas da videira. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos e oito repetições. Foram comparados os seguintes tratamentos: T1, folhas pulverizadas com hidróxido de cobre (Kocide® WDG); T2, folhas não pulverizadas (testemunha). O fungicida cúprico (Kocide® WDG) foi aplicado na proporção de 2 gramas para 500 mL de água até o ponto de escorrimento em todas as folhas das mudas com a utilização de um borrifador. Foram realizadas cinco aplicações a intervalos de dois a três dias nos períodos mais quentes. O experimento foi repetido mais uma vez.

As avaliações procederam-se 15 a 20 dias após a finalização das pulverizações. Em seguida, cada folha foi fotografada e analisada em computador quanto à proporção de área lesionada, utilizando-se o software APS Assess para quantificação de doenças em plantas através da análise de imagens digitais. Os dados foram submetidos à análise de variância, com a utilização do pacote estatístico SAS, versão 9.3 (SAS Institute, 2003).

2.5 Detecção de espécies de *Alternaria* endofíticas

Folhas sadias de videira da cultivar Niágara Rosada foram coletadas nos mesmos locais em que se procederam às coletas das folhas sintomáticas nas épocas de julho e novembro de 2014. Uma parte da amostra foi submetida à pulverização por paraquat, com intuito de acelerar a colonização endofítica por *Alternaria*, e a outra parte foi utilizada para a realização dos isolamentos e quantificação de *Alternaria* em folhas assintomáticas desinfestadas e incubadas em câmara úmida.

As amostras de folhas assintomáticas foram submetidas à desinfestação. Individualmente, as mesmas foram pré-lavadas em água-corrente, em seguida desinfestadas superficialmente por meio de imersão sucessiva em etanol 70% por 30 segundos, solução de

hipoclorito de sódio (2-2,5% de Cl disponível) durante 2 minutos e 30 segundos. Posteriormente, as amostras foram enxaguadas três vezes em água destilada esterilizada. Por fim, as folhas foram transferidas para bandejas, contendo papel filtro embebido em água estéril, e mantidas em câmara úmida na câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas, a $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por cinco dias. Cada tratamento constou de quatro repetições, com quatro amostras cada uma. Os tratamentos comparados foram os seguintes: T1, sem desinfestação superficial; T2, com desinfestação superficial; T3, sem desinfestação superficial e tratadas com paraquat 2,5 mL/250 mL; T4, com desinfestação superficial e tratadas com paraquat 2,5 mL/250 mL. Com intuito de quantificar o número de *Alternaria* presente no interior dos tecidos vegetais, foram feitas suspensões em solução salina 0,9%, através de amostras foliares com uma área de 1 cm^2 , as quais foram trituradas na presença de 5 mL da solução com auxílio do pistilo e cadinho. Por sua vez, a quantificação foi realizada em câmara de Neubauer obtendo-se número de conídios por cm^2 . Procedeu-se a repetição do experimento com a utilização de amostras de folhas sadias correspondentes à coleta do mês de novembro.

O experimento foi também realizado utilizando-se oito mudas de ‘Niágara Rosada’, totalizando em dois tratamentos, testemunha e amostras tratadas com paraquat 2,5 mL/250 mL. Previamente quatro folhas de cada muda foram submetidas à desinfestação descrita anteriormente. Posteriormente, procedeu-se a aplicação do paraquat 2,5 mL/250 mL até o ponto de escorrimento. As mudas foram ensacadas com sacos plásticos transparentes umedecidos e mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas, a $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por oito dias. A quantificação de conídios realizada em folhas destacadas e a proporção de folhas com presença de *Alternaria* em mudas de ‘Niágara Rosada’ foram analisadas através de estatística descritiva, utilizando-se a análise exploratória de dados através do método denominado de gráfico box-plot pelo software estatístico R (R Development Core Team, 2015).

Na amostra coletada em novembro, objetivou-se detectar conídios de *Alternaria* presentes em folhas assintomáticas. Para tanto, no segundo experimento as folhas foram cortadas em segmentos e submetidas ao processo de desinfestação como descrito acima.

Os gerbox foram preparados com duas folhas de papel filtro esterilizadas e previamente umedecidas com água destilada esterilizada. Posteriormente, foi colocado um segmento foliar em cada gerbox, o qual foi lacrado com parafilme e incubado a $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 10 dias. O experimento constou de três tratamentos e seis repetições. Os dados foram analisados por estatística descritiva utilizando o programa estatístico SAS, versão 9.3 (SAS

Institute, 2003) para processar os dados e gerar informações relevantes acerca da quantificação de conídios.

No último experimento, as folhas sadias coletadas nos meses de julho e novembro foram desinfestadas superficialmente como mencionado. Posteriormente, o material vegetal foi cortado em fragmentos (4-6 mm) e colocado sobre meio BDA contendo 100 µg/mL de pentabiótico. A avaliação do processo de desinfestação consistiu na colocação de 100µl da água utilizada na última etapa do processo sobre meio batata-dextrose-ágar (BDA) seguindo-se da incubação deste material por até 14 dias a 28°C.

Após crescimento, a avaliação foi realizada pela contagem do número de fragmentos apresentando crescimento fúngico em relação ao número total de fragmentos de tecido vegetal, com isto determinou-se a frequência de infecção (FI).

$$FI = \frac{\text{Número de fragmentos foliares com crescimento fúngico}}{\text{Número total de fragmentos foliares}}$$

2.6 Caracterização e identificação molecular

2.6.1 Preparação do micélio e extração de DNA

Os fungos isolados foram crescidos em meio BDA (batata-dextrose-ágar) durante sete dias. As placas com micélio crescido foram retiradas da BOD e dentro câmara de fluxo laminar adicionou-se com auxílio de uma pipeta 2 mL de água destilada esterilizada, e assim procedeu a raspagem do micélio aéreo com uma espátula. Em seguida, os micélios foram transferidos para frascos erlenmeyers com 50 mL de meio Wikerman (40 g de glicose; 5 g de peptona; 3 g de extrato de levedura; 3 g de extrato de malte e 1000 mL de água destilada) e mantidos em incubadora (Shaker) com agitação, na rotação de 110 RPM, por três dias. A massa micelial formada foi separada por filtragem com a utilização de um funil de vidro contendo gaze esterilizada e lavada duas vezes com água destilada esterilizada. Posteriormente, a massa micelial foi retirada da gaze com pinça e colocada em microtubos de 2 mL, conservando-se em freezer.

Para a extração do DNA total dos isolados 15 mg de micélio congelado foi transferido para cadinhos gelados e macerados com nitrogênio líquido até formarem um pó fino. O macerado foi transferido para microtubos de 2 mL e adicionou-se 600 µL de CTAB 2%. Os tubos foram homogeneizados em vortex e incubados a 60°C por 60 minutos em

banho-seco. A cada quinze minutos a amostra foi homogeneizada em vortex. Centrifugou-se as amostras a 11000 rpm por 20 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido com cautela para não carregar partículas do micélio, e transferido para novos tubos. Em seguida, foram adicionados 700 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguindo-se homogeneização e centrifugação durante 10 minutos, a 11000 rpm para formação de duas fases (a superior contendo DNA e a inferior contendo a fase orgânica do material). Foi transferido 500 µL da fase superior para novos tubos. Acrescentou-se 150 µL de NaOAc pH 5,2 (3M) e posteriormente foi adicionado igual volume do sobrenadante de isopropanol. Os tubos foram invertidos suavemente para precipitação do DNA e incubados a 4°C durante 30 minutos. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 11000 rpm por 20 minutos para descarte do sobrenadante. O *pellet* do DNA precipitado foi lavado adicionando-se 100 µL de álcool 70% e centrifugado a 11000 rpm por 5 minutos. Esse processo foi repetido mais uma vez. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* e as paredes dos tubos foram emborcados sobre papel absorvente para que o DNA precipitado secasse. O DNA foi ressuspendido em 50 µL de tampão TE e incubado em banho-maria a 50°C durante 40 minutos para que ocorresse a dissolução. Foram adicionados as amostras de DNA, 5 µL de uma suspensão, contendo 20 mg mL⁻¹ de RNase, e incubados no banho-maria a 37°C durante 30 minutos. As amostras foram armazenadas no freezer.

2.6.2 Reação da polimerase em cadeia (PCR) e caracterização filogenética

Para amplificação do DNA de cada isolado foram utilizados os primers ITS4 (5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3') e ITS5 (5'-GGA-AGT-AAA-AGTCGG-G-3') que amplificam a região ITS1, ITS2 e 5.8S do DNA ribossomal (White et al. 1990), ALT-rev (5'-ACG-AGG-GTG-AYG-TAG-GCG-TC-3') e ALT-for (5'-ATG-CAG-TTC-ACCACC-ATC-GC-3') (HONG et al., 2004) e *gpd1* (5'-CAA-CGG-CTT-CGG TCG-CAT-TG-3') e *gpd2* (5'-GCC AAG CAG TTG GTT GTG C-3') (BERBEE et al., 1999).

As reações de PCR foram realizadas com volume total de 25 µL DNA genômico, 10XPCR buffer, 50 mM MgCl₂, 10mM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1mM de cada primer. Em cada reação foi utilizado um controle negativo contendo todos os reagentes, exceto o DNA. As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador Biocycler MJ96+/MJ96G (Applied Biosystems do Brasil Ltda., São Paulo, SP), utilizando-se a seguinte programação com os primers ITS: uma

desnaturação inicial de 3 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1,5 minutos a 94°C (desnaturação), 1,5 minutos a 60°C (anelamento), 2 minutos a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. O programa de amplificação para os primers Alt a1 constitui em uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto), extensão final a 72°C por 10 minutos. Para amplificação do *gpd* foi necessária uma desnaturação inicial por 2 minutos a 96°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 96°C, 1 minuto a 48°C e 45 segundos a 72°C e uma extensão final a 72°C por 4 segundos.

Os produtos de amplificação foram analisados em géis de agarose (1%), contendo o corante Syber Safe e fotodocumentado em transiluminador (L-PIX Loccus Biotecnologia). O kit ExoSap-IT (GE Health Care) foi utilizado para purificação dos fragmentos amplificados e encaminhados para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. Para a identificação da espécie, as sequências de DNA obtidas foram comparadas com sequências disponíveis no *GenBank*.

Para a análise filogenética, alinhamentos múltiplos foram obtidos utilizando-se o programa Clustal W (www.ebi.ac.uk/Clustalw). A partir dos alinhamentos (Anexo) foram inferidas árvores filogenéticas com o programa MEGA (www.megasoftware.net), utilizando-se o método de *neighbour-joining*. Os ramos das árvores foram testados por *bootstrap*, com 1000 repetições.

2.7 Caracterização morfológica

As análises foram realizadas no laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Neste estudo, foram utilizados os nove isolados selecionados para a patogenicidade e análise molecular. Estes isolados foram induzidos a esporular conforme a metodologia descrita no item 2.2. As culturas esporulantes foram capturadas com seringa e os conídios montados em lâminas com ácido láctico, para observação ao microscópio de luz, objetiva 40X. Lâminas definitivas foram seladas com duas camadas de esmalte de unha.

As dimensões dos conídios foram obtidas através das imagens capturadas pela câmara digital acoplada ao microscópio óptico, utilizando o programa computacional Motic Image Plus 2.0[®]. Foram avaliados 50 conídios para cada isolado, sendo quantificados os seguintes parâmetros: o número de septos transversais e longitudinais; os comprimentos do

corpo e do bico e a largura do conídio. Os valores obtidos foram comparados através de uma tabela contendo as medidas de dispersão, amplitude e média. Os resultados foram comparados com a descrição de Simmons (2007) sobre a morfologia das espécies de *Alternaria*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Testes de patogenicidade

Os testes de patogenicidade realizados com sete isolados identificados como *A. rezedae* (= *A. septorioides*) e dois isolados do grupo de espécies da *A. alternata* em folhas de mudas de videira Niágara Rosada não foram positivos. Diferenças de procedimentos, em que a inoculação foi realizada com ou sem ferimentos nas folhas, empregando-se esporos em suspensão em água ou em emulsão de água e óleo mineral e também de duração de molhamento foliar em câmara úmida por períodos variáveis, intermitente ou por longos períodos contínuos, não tiveram influência na manifestação dos sintomas. A inoculação pela deposição de discos de micélio na superfície foliar também não produziu resultado positivo.

A utilização do óleo mineral em mistura com a suspensão de esporos em água, formando assim uma emulsão, baseou-se no trabalho de Amsllem et al. (1990), que verificou o aumento da infectividade de esporos da *Alternaria cassiae* e *A. crassa* em inóculo de água, mediante a adição de alginato de sódio e o emprego de emulsão de óleos e ceras. Naquele estudo, um esporo por gota de inóculo foi necessário para que ocorresse a infecção, ao invés dos milhares requeridos em uma suspensão aquosa de esporos. O papel da emulsão é de não permitir a evaporação e com isto manter a umidade adequada por um longo período. Desta forma, a umidade externa não foi mais requerida para o desenvolvimento do patógeno. Boyette et al.(1992), também relatou o aumento da eficiência do inóculo pela adição de materiais como agentes molhantes, adesivos, emulsões, óleos e géis poliméricos que prolongam a duração do período foliar. O óleo de origem vegetal e seu menor teor na formulação (15%) oferecem vantagens em relação à emulsão invertida, que incluem melhores características de molhamento na superfície foliar, proteção dos esporos e alguma retenção de água. Entretanto, a emulsão invertida apresenta redução notória da evaporação da água, tal fato não constatado para a formulação (AULD, 1993; ABBAS et al. 1996).

Um longo período de umidade é requerido pela maioria das espécies de *Alternaria* para produção de esporos. No entanto, vale ressaltar que muitas, mas não todas as espécies de *Alternaria* se beneficiam com longos e ininterruptos períodos de molhamento, uma vez que necessitam de indução por luz ou seca (BASHI; ROTEM, 1975). No trabalho de Yang et al. (1993), um dos objetivos consistia em determinar o efeito de diferentes durações de períodos de orvalho na infecção de *Euphorbia esula* L. por *Alternaria angustiovoidea*. Foi observado a

não ocorrência da doença em um período inicial de orvalho de 6 horas ou menos e um segundo período de 12 horas ou menos. Para o aparecimento da infecção foi requerido um único período de pelo menos 12 horas, todavia maior severidade da doença foi relatada para o período de 24 horas de orvalho. Similaridade na severidade foi constatada quando se aplicou um segundo período de 12 horas após 1 dia do período inicial de orvalho de 12 horas a um período único de 24 horas. No entanto, se o segundo período de orvalho for aplicado 2, 3 ou 4 dias após a inoculação, ocorrerá redução significativa da severidade.

Pelo fato de não ter sido possível estabelecer a relação causal entre a doença e o microrganismo, através do cumprimento das etapas dos Postulados de Koch, pode-se inferir que os isolados utilizados não apresentam relação de patogenicidade com a videira. Em alguns casos, foi possível reisolar o fungo a partir dos tecidos das plantas, mesmo sem a ocorrência de sintomas. Tal fato evidenciou indícios de que *Alternaria* poderia estar associada endofiticamente na planta, suscitando novos estudos no sentido de demonstrar o endofitismo.

3.2 Avaliação da indução de sintomas de requeima das folhas mediante aplicações sucessivas de hidróxido de cobre

No primeiro experimento, verificou-se que as aplicações sucessivas do fungicida a base de hidróxido de cobre nas folhas não induziram a produção de sintomas típicos de requeima. Pelo fato de terem sido dois tratamentos (com e sem hidróxido de cobre), um grau de liberdade, o teste F é conclusivo. Assim, analisando-se o F inferior a um e p-valor superior ao alfa (α) fixado em 5%, conclui-se que todas as possíveis diferenças entre médias verdadeiras são nulas, ou seja, a hipótese de nulidade é aceita (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância dos dados referentes à severidade

| Fontes de variação | Graus de liberdade (GL) | Soma de quadrados (SQ) | Quadrado médio (QM) | F (Prob F) |
|--------------------|-------------------------|------------------------|---------------------|---------------------------|
| Tratamentos | 1 | 1,12 | 1,12 | 0,01 (0.92) ^{NS} |
| Erro | 14 | 1427,77 | 101,98 | |
| Total | 15 | 1428,89 | | |

NS, não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Todavia, a repetição do experimento em outra época mostrou resultado diferente e sintomas parecidos aos da requeima foram detectados nas folhas que receberam aplicações sucessivas de hidróxido de cobre. Verificou-se grande variação na intensidade dos sintomas das folhas tratadas, em que algumas folhas apresentaram cloroses e necroses que ocuparam o limbo foliar (Figura 2A), no entanto outras folhas apresentaram menor intensidade de danos, com alguma semelhança aos sintomas da requeima (Figura 2B), e ainda outras folhas com sintomas leves (Figuras 2C e 2D) ou mesmo sem sintomas (Figura 2E).

Assim, para esse experimento a hipótese alternativa foi aceita, pelo fato de existir pelo menos uma média verdadeira que difere da outra (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de variância dos dados referentes à severidade

| Fontes de variação | Graus de liberdade (GL) | Soma de quadrados (SQ) | Quadrado médio (QM) | F (Prob F) |
|--------------------|-------------------------|------------------------|---------------------|--------------|
| Tratamentos | 1 | 62,69 | 62,69 | 5,94 (0,03)* |
| Erro | 14 | 147,73 | 10,55 | |
| Total | 15 | 210,42 | | |

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

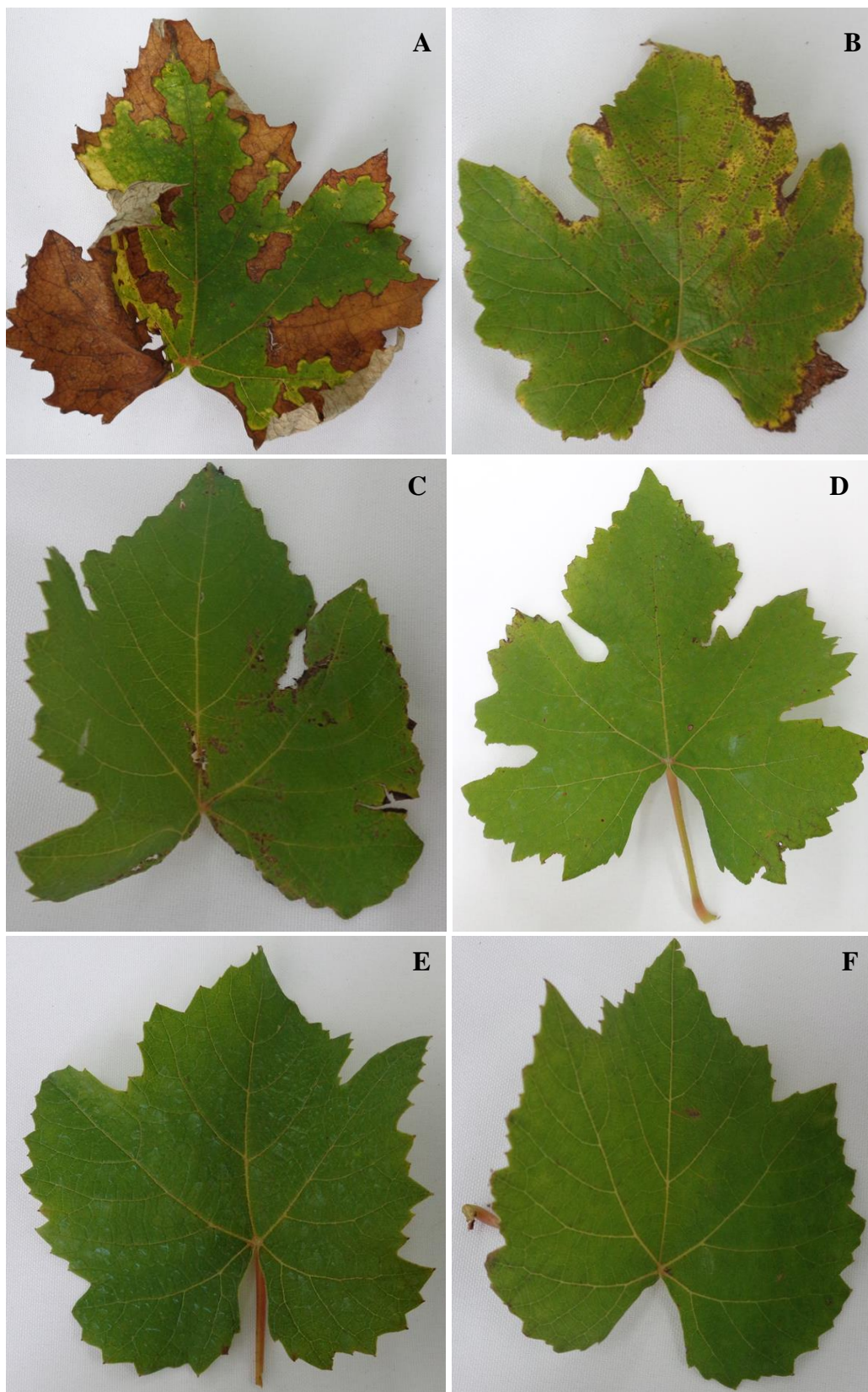


Figura 2. Folhas de videira da cultivar Niágara Rosada tratadas com aplicações sucessivas de hidróxido de cobre (A, B, C, D e E) e folhas sem tratamento (F).

3.3 Detecção de espécies de *Alternaria* endofíticas

Em experimentos com folhas de videiras destacadas, verificou-se a produção de conídios típicos de *Alternaria* nas folhas assintomáticas que sofreram ou não desinfestação superficial com solução de hipoclorito de sódio, bem como as que foram ou não tratadas com o herbicida paraquat. Ressalta-se que para caracterizar a natureza endofítica do fungo em estudo, dois tratamentos (com desinfestação superficial; com desinfestação superficial e com paraquat) dos ensaios incluíram folhas que sofreram desinfestação superficial com hipoclorito de sódio para eliminação de fungos que habitam a superfície vegetal (Figuras 3A e 3B). Os tratamentos com herbicida paraquat (sem desinfestação superficial e com paraquat; com desinfestação superficial e com paraquat) não aumentaram a colonização do fungo.

Para as amostras foliares da Propriedade A (Figura 3A), com exceção do tratamento sem desinfestação superficial, os demais apresentaram menores valores para quantificação de conídios. Em relação à variabilidade, o tratamento sem desinfestação superficial e com paraquat foi menos homogêneo, ao passo que com desinfestação superficial e com paraquat apresentou maior homogeneidade dos dados.

Nas amostras foliares da Propriedade B (Figura 3B), nos tratamentos sem desinfestação superficial e com desinfestação superficial e com paraquat obtiveram-se menores valores para quantificação de conídios. Todavia, o mesmo não pode ser observado para os tratamentos com desinfestação superficial e sem desinfestação superficial cuja concentração é a direita, ou seja, valores maiores para o parâmetro analisado. No quesito variabilidade, notou-se que os tratamentos sem desinfestação superficial e sem desinfestação superficial e com paraquat foram mais homogêneos quanto à quantificação, em relação aos tratamentos com desinfestação superficial e com desinfestação superficial e com paraquat.

No experimento realizado com mudas (Figura 3C), os resultados foram os mesmos obtidos com folhas destacadas. Também neste caso, verificou-se a produção de conídios típicos de *Alternaria* nas folhas de videira assintomáticas que sofreram ou não desinfestação superficial com solução de hipoclorito de sódio. Notou-se que a incidência de *Alternaria* spp. nos tratamentos com e sem pulverização de paraquat (tratamentos um e dois) pode ser considerada simétrica em torno dos valores medianos da incidência. A variabilidade do conjunto de dados é praticamente a mesma, indicando assim, homogeneidade.

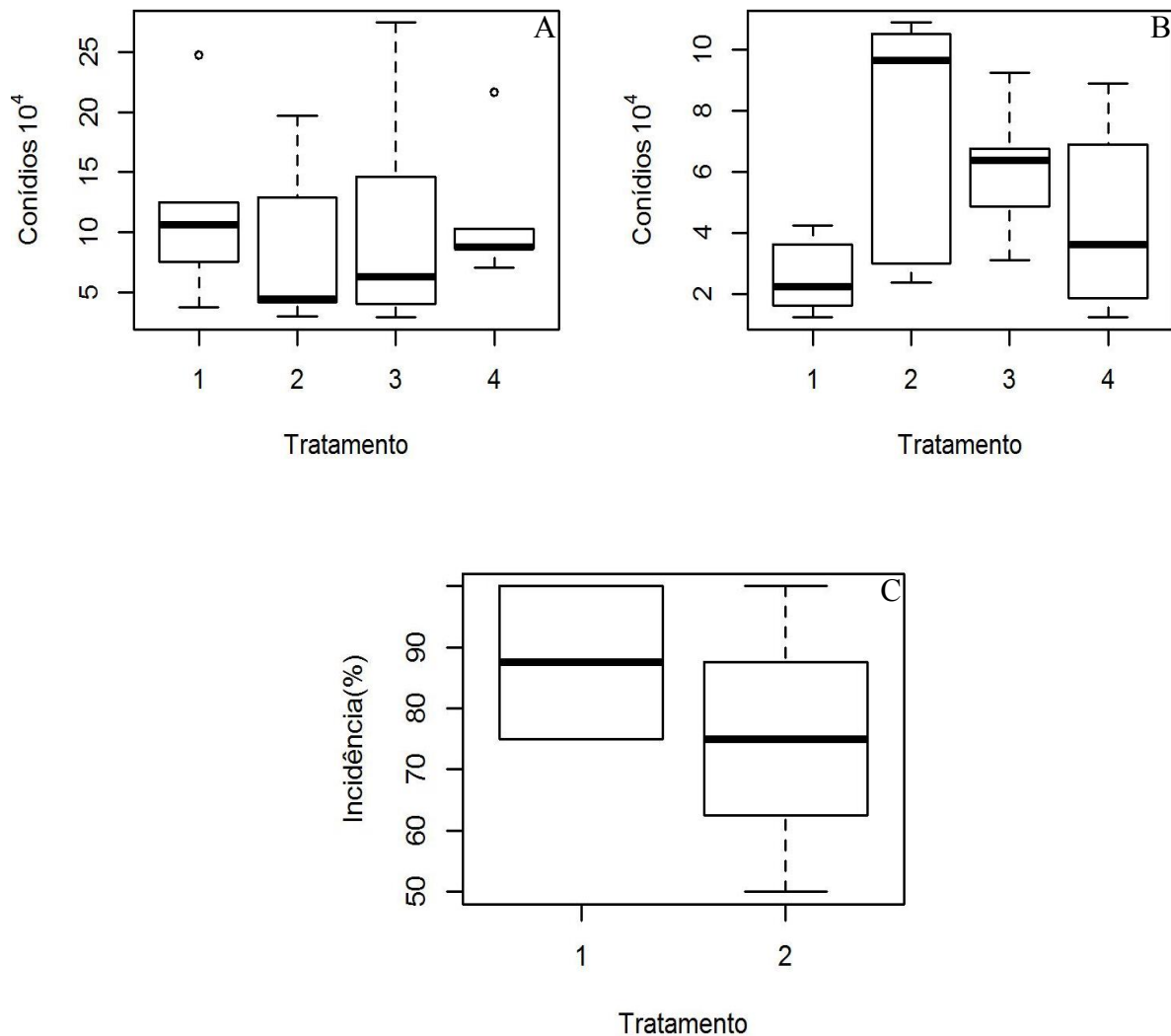


Figura 3. Box plot da quantificação de conídios de *Alternaria* spp. para os diferentes tratamento. Sendo tratamento 1, sem desinfestação superficial; 2, com desinfestação superficial; 3, sem desinfestação superficial e com paraquat; 4, com desinfestação superficial e com paraquat. Box plot da incidência de *Alternaria* spp. para os tratamentos pulverizados com paraquat (1) e os não pulverizados (2).

Neste trabalho, a utilização do paraquat teve por finalidade induzir a senescência do tecido e estimular a colonização das folhas pelo fungo. Segundo Chia et al. (1981), a perda da integridade da membrana com a consequente liberação de nutrientes a partir das células das plantas ocorrerá quando tecidos do hospedeiro forem submetidos a tratamentos com paraquat, após a desinfestação superficial. O paraquat age na presença de luz, atuando rapidamente por contato. Esse herbicida é conhecido por agir como inibidor do fotossistema I. O mecanismo de ação ocorre através do bloqueio do fluxo de elétrons da fotossíntese, impedindo a redução do NADP^+ à NADPH_2 . Com isto, sérios danos no metabolismo celular são ocasionados, devido ao acúmulo de elétrons e radicais tóxicos no cloroplasto. Por serem instáveis, os radicais sofrem auto-oxidação, produzindo radicais superóxidos, hidroxila, peróxido e oxigênio singleto. Estes reagem com os lipídios das membranas celulares, culminando com a

peroxidação, degradação das membranas, culminando com vazamento do suco celular e a morte do tecido (VARGAS et al., 1999). O paraquat atua matando os tecidos que contêm clorofila, acelerando o crescimento e esporulação de fungos e alguns endófitos (COOK, R. T., 1993).

Desde a década de 1980, o paraquat tem sido utilizado com intuito de aumentar a detecção de espécies de *Alternaria*, *Botrytis*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, e outros fungos em tecidos saudáveis do material vegetal (BIGGS, 1995; CERKAUSKAS, 1988; GINDRAT; PEZET, 1994; SINCLAIR, J. B., 1991; SUTTON ; PENG, 1993).

No segundo experimento, procedeu-se a quantificação de conídios das amostras de folhas saudáveis, submetidas em câmara úmida por um período de 10 dias. Com isto, foi possível detectar a presença da *Alternaria* nos tecidos foliares. Na estatística descritiva das variáveis analisadas (Tabela 4), observou-se grande variabilidade dos dados nas amostras 1 e 2. Tal fato deve-se a verificação de que os valores de variância foram maiores que os da média. Contrapondo-se com os valores obtidos para a amostra 3.

Na mesma tabela, observaram-se altos valores do coeficiente de variação, uma vez que foram quantificadas folhas com presença do fungo e outras folhas que não apresentavam as estruturas reprodutivas.

Tabela 4. Estatística descritiva da quantificação de esporos (conídios.cm⁻²) das amostras de folhas saudáveis submetidas à câmara úmida por 10 dias

| | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
|---------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Máximo | 28,75 x 10 ³ | 10,00 x 10 ⁴ | 0,63 x 10 ³ |
| Mínimo | 0,00 | 0,01 x 10 ⁴ | 0,00 |
| Média | 5,10 x 10 ³ | 3,07 x 10 ⁴ | 0,34 x 10 ³ |
| Mediana | 0,44 x 10 ³ | 1,63 x 10 ⁴ | 0,36 x 10 ³ |
| Variância | 134,30 x 10 ³ | 13,00 x 10 ⁴ | 0,05 x 10 ³ |
| Desvio padrão | 11,59 x 10 ³ | 3,61 x 10 ⁴ | 0,22 x 10 ³ |
| CV (%) | 227,04 x 10 ³ | 117,66 x 10 ⁴ | 63,29 x 10 ³ |

A presença de *Alternaria* colonizando segmentos foliares assintomáticos em meio BDA variou de 0,2% a 4,2% (Tabela 5). Estes índices são inferiores aos encontrados na literatura. A baixa frequência de infecção pode ser explicada por Brum (2008), que afirmou que um pouco antes das mudanças fisiológicas dos tecidos foliares da videira que resultam na idade máxima atingida pelas folhas, com a entrada do período de repouso hibernar e a perda

das folhas, atinge-se o ponto máximo de infecção por endófitos. A provável flutuação dos valores de frequência de infecção pode ocorrer por meio de mudanças locais de temperatura, nos meses que coincidem com a entrada da planta em repouso hiberna, tal fato reflete no adiantamento ou atraso do período. Com isto, os valores de frequência de infecção ficam entre o ponto máximo de infecção dos tecidos e o declínio pela chegada da época de repouso hiberna da planta hospedeira.

Tabela 5. Frequência de colonização de *Alternaria* spp. em folhas assintomáticas da cultivar Niágara Rosada, coletadas em Jales, SP, 2014

| Amostra | Mês da coleta | Frequência de colonização(%) |
|---------|---------------|------------------------------|
| 1 | Julho | 0,2 |
| 2 | Novembro | 3,1 |
| 3 | Novembro | 4,2 |

A presença de *Alternaria* em folhas sadias da videira concordam com Mostert et al. (2000), que em estudo sobre isolamento de fungos endofíticos de *Vitis vinifera* detectou que a espécie mais frequente foi *Alternaria alternata* (40%) e *Sphaeropsis* sp. (27%). O gênero *Alternaria* como endófito da videira, também foi relatado por Medina et al. (2005), que em estudos sobre a microbiota endofítica associada a cinco variedades de videiras *Vitis vinifera* cultivadas na Espanha, observaram que *Alternaria*, *Cladosporium*, e *Aspergillus* foram os principais gêneros. O fungo endofítico *Alternaria alternata* isolado de folhas de videiras atuando como inibidor da esporulação de *Plasmopara viticola*, agente causal do míldio que foi pesquisada por Musetti et al. (2006).

No Brasil, as comunidades endofíticas de videiras da cultivar Niágara Rosada foram primeiramente estudadas por Brum (2006), que observou grande diversidade genética dentro desta comunidade, destacando-se os gêneros: *Alternaria*, *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Daldinia*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Nodulisporium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma* e *Schizophyllum*. A predominância de fungos endofíticos ocorreu quando as coletas foram realizadas a temperaturas mais elevadas nas cidades de Jundiaí e Salesópolis, localizadas na região do Estado de São Paulo. Os resultados coincidem com o estudo realizado em 2008 na mesma região pelo autor.

3.4 Caracterização e identificação molecular

Após a amplificação do DNA de cada isolado, o gene *Alt a1* teve uma melhor discriminação das espécies, em relação à região ITS1-5.8S-ITS2. Ademais, o gene *gpd* só foi capaz de amplificar quatro dos nove isolados utilizados neste estudo. Desta forma, o gene *Alt a1* apresentou melhor padrão de amplificação, gerando bandas únicas em torno de 500 pares de bases (Figura 4), sendo utilizado para a caracterização molecular.

A Tabela 6, apresenta os resultados da identificação das espécies fúngicas de *Alternaria* associadas à videira e a porcentagem de identidade com as sequências depositadas no *GenBank*. As sequências encontradas mostraram 100% de identidade dos isolados NR1, NR2, ZM5 e ZM6 com *A. resedae* (= *A. septorioides*) e 99% de similaridade desta espécie com os isolados ZM1, ZM2 e ZM4. Entretanto, foi constatado que os isolados D1 e ZM7 foram enquadrados no grupo de espécies *Alternaria alternata* com 100% de identidade com sequências dessa espécie que estão depositadas no *GenBank*.

Lawrence et al. (2013), considera em seu trabalho taxonômico que aborda as seções *Alternaria* a espécie *A. resedae*, a qual é referida por Simmons (2007), e pelo Mycobank como sinônimia *A. septorioides*.

A árvore filogenética inferida pelo método de vizinhos (*neighbor joining*) agrupou os isolados de *Alternaria* da videira em dois grupos ou clados distintos (Figura 5). O primeiro clado contém sete isolados de *Alternaria*, sendo cinco pertencentes a *A. resedae* (= *A. septorioides*) (suporte de *bootstrap* de 98%), e um subgrupo composto por dois isolados que não apresentam suporte estatístico. O segundo clado reuniu dois isolados pertencentes ao grupo de espécies *A. alternata* (suporte *bootstrap* de 100%).

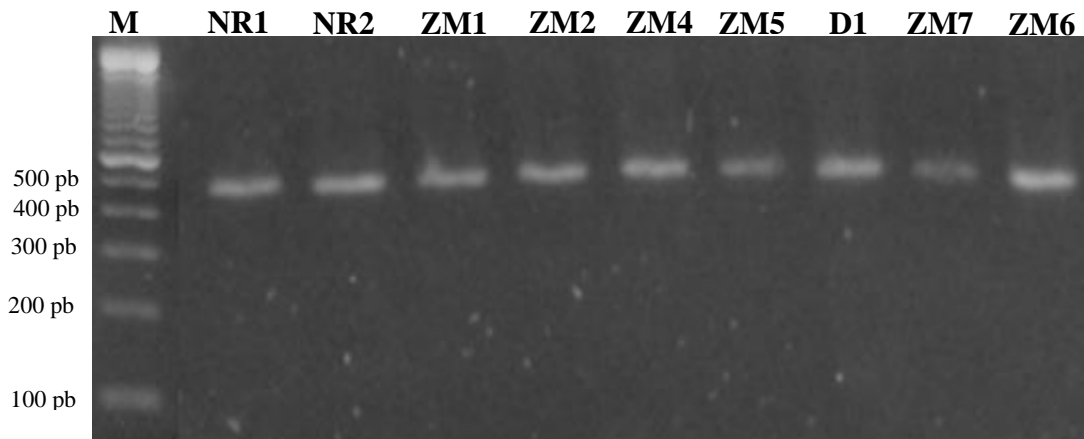


Figura 4. Produto de amplificação do fragmento do gene Alt a1 analisado em gel de agarose 1% corado com Sybr Safe®. Em que M, é o marcador de 100 pb; NR1, NR2, ZM1, ZM2, ZM4, ZM5, D1, ZM7 e ZM6 são os isolados.

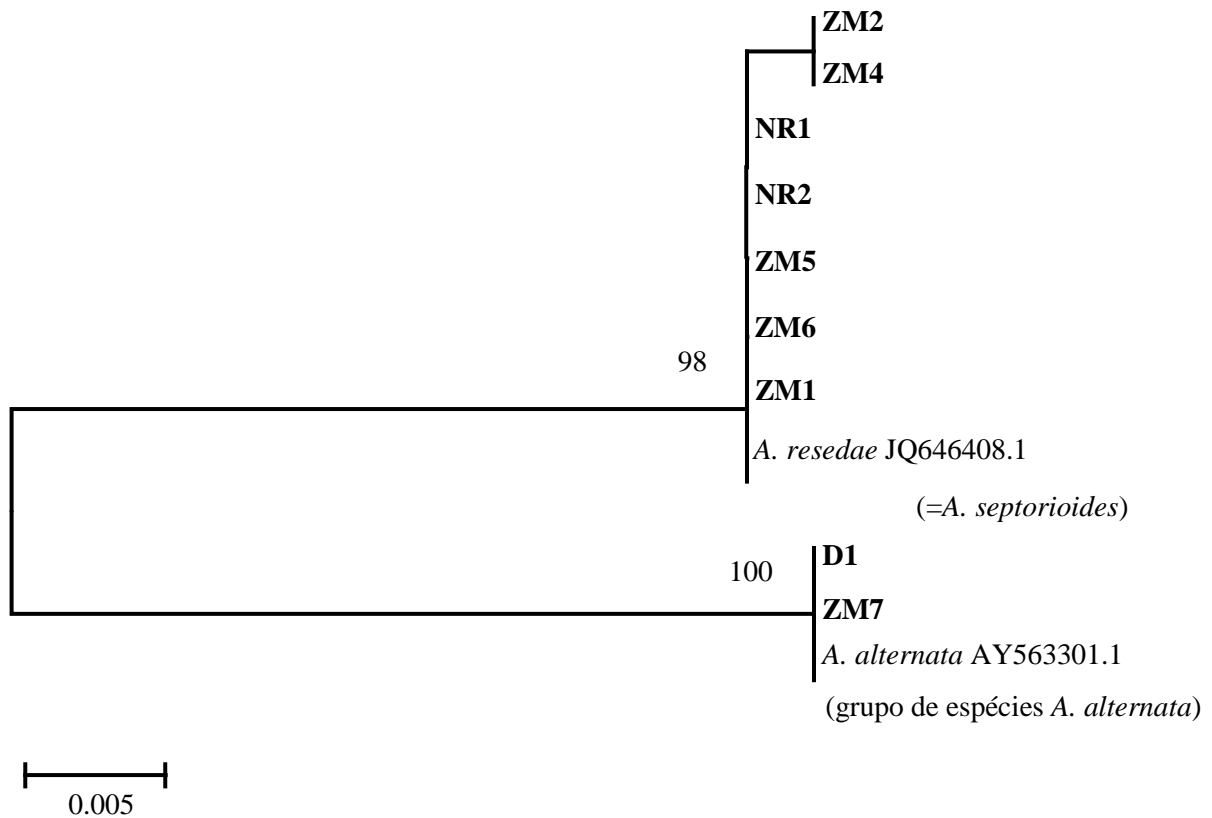


Figura 5. Árvore filogenética inferida a partir de sequências de DNA do gene Alt a1 de isolados de *Alternaria* spp. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem da análise de *bootstrap* nas quais as repetições foram observadas (1.000 repetições).

Tabela 6. Identificação molecular de isolados de *Alternaria* endofíticas em folhas de videira com base na similaridade de sequências de DNA do gene Alt a1

| Isolado | Espécie | Identidade (%) | Referência | |
|---------|--|-------------------|----------------|------------------------|
| | | | <i>GenBank</i> | Literatura |
| NR1 | <i>A. resedae</i> * | 100 | JQ646408.1 | Lawrence et al. (2013) |
| NR2 | <i>A. resedae</i> | 100 | JQ646408.1 | Lawrence et al. (2013) |
| ZM1 | <i>A. resedae</i> | 99 | JQ646408.1 | Lawrence et al. (2013) |
| ZM2 | <i>A. resedae</i> | 99 | JQ646408.1 | Lawrence et al. (2013) |
| ZM4 | <i>A. resedae</i> | 99 | JQ646408.1 | Lawrence et al. (2013) |
| ZM5 | <i>A. resedae</i> | 100 | JQ646408.1 | Lawrence et al. (2013) |
| ZM6 | <i>A. resedae</i> | 100 | JQ646408.1 | Lawrence et al. (2013) |
| D1 | Grupo de espécies <i>A. alternata</i> (<i>A. alternata</i> species-group) | 100 | AY563301 | Hong et al. (2005) |
| ZM7 | Grupo de espécies <i>A. alternata</i> (<i>A. alternata</i> species-group) | 100 | AY563301 | Hong et al. (2005) |

*Simmons (2007) bem como o Mycobank (www.mycobank.org) consideram a espécie *A. resedae* sinonímia de *A. septorioides*.

3.5 Caracterização morfológica

Todos os isolados apresentaram esporulação pelo método descrito. Segundo Rotem (1994), *A. alternata* e *A. tenuissima* que produzem esporos em cadeia e isolados saprofitos, esporulam facilmente. Em contraste, com as espécies patogênicas do gênero que apresentam conídios largos e solitários, nas quais a esporulação in vitro não ocorre facilmente. Ainda

ressalta-se, que em alguns casos uma indução externa, pode aumentar a esporulação de algumas espécies.

Pouca variação foi identificada nas características morfológicas dos conídios (Tabela 7). O número de septos transversais variou de 1 a 9. Já a variação no número de septos longitudinais foi entre 0 a 8. O comprimento do conídio variou de 7,39 a 38,34 μm e a largura de 5,06 a 16,62 μm . As medidas de comprimento do rostro foram de 1,86 a 62,49 μm , apresentando maior variação em relação aos outros parâmetros. Dentre as características utilizadas para a identificação, duas são consideradas as mais relevantes: dimensões do corpo e do bico dos conídios. Em função da similaridade dos valores para a variável largura, esta característica não se mostra tão relevante quanto o comprimento dos conídios que apresenta grande variação, sendo utilizado para separar espécies ou isolados de uma espécie (ROTEM, 1994).

Comparando-se as características morfométricas dos nove isolados utilizados no estudo com a descrição de Simmons (2007) permite o enquadramento em duas espécies distintas do gênero *Alternaria*, apesar de algumas diferenças entre os valores da literatura e os obtidos no estudo. Todavia, são comuns as variações nas características morfológicas em espécies de *Alternaria* (BONDE, 1927; BONDE, 1929; NEERGAARD, 1945; ROTEM, 1966; BÓVEDA, 1986; ROTEM, 1994). A delimitação de espécies do gênero *Alternaria*, através da utilização de caracteres morfológicos, tem sido evitada devido à considerável variabilidade no tamanho, forma e septação de conídios tanto dentro de uma espécie quanto até mesmo dentro de uma mesma colônia do fungo (SIMMONS, 1992). Tal variabilidade foi comprovada no estudo.

De acordo, com as medidas das características morfológicas, os isolados NR1, NR2, ZM1, ZM2, ZM4, ZM5, ZM6 (Figuras 6 e 7) podem ser enquadrados na espécie *A. resedae* (= *A. septorioides*), por sua vez, os isolados D1 e ZM7 (Figura 9) podem ser enquadrados no grupo de espécies *A. alternata*. Apesar, da variabilidade notada em algumas dimensões, os formatos e os aspectos dos conídios tem similaridade com o que foi descrito por Simmons (2007)

Tabela 7. Características morfológicas de conídios de isolados de *Alternaria* spp. provenientes de videira

| Isolados | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|
| Parâmetros | NR1 | NR2 | ZM1 | ZM2 | ZM4 | ZM5 | ZM6 | D1 | ZM7 |
| Número de septos transversais | | | | | | | | | |
| Amplitude | 2-9 | 1-5 | 1-6 | 1-5 | 2-8 | 2-6 | 1-7 | 1-4 | 1-5 |
| Média | 4,06 | 3,34 | 3,64 | 3,41 | 3,69 | 3,47 | 3,52 | 3,38 | 3,22 |
| Número de septos longitudinais | | | | | | | | | |
| Amplitude | 0-8 | 0-3 | 0-4 | 0-4 | 0-3 | 0-4 | 0-4 | 0-3 | 0-3 |
| Média | 1,46 | 0,72 | 1,42 | 1,39 | 0,77 | 1,28 | 1,10 | 1,20 | 0,94 |
| Comprimento do corpo (µm) | | | | | | | | | |
| Amplitude | 11,15-38,34 | 9,95-26,05 | 7,39-28,27 | 10,61-24,29 | 9,63-28,35 | 9,63-28,72 | 8,47-33,19 | 11,36-26,66 | 7,81-28,92 |
| Média | 22,19 | 17,45 | 18,21 | 17,42 | 17,28 | 18,37 | 20,60 | 18,03 | 18,09 |
| Largura do corpo (µm) | | | | | | | | | |
| Amplitude | 6,04-13,06 | 6,92-12,59 | 7,23-13,38 | 5,22-13,14 | 5,77-16,62 | 5,06-12,07 | 2,89-14,87 | 7,18-13,13 | 5,37-14,5 |
| Média | 10,05 | 9,35 | 9,45 | 9,47 | 8,63 | 9,25 | 9,79 | 9,49 | 9,58 |
| Comprimento do bico (µm) | | | | | | | | | |
| Amplitude | 3,0-62,49 | 2,19-21,39 | 2,43-28,07 | 1,96-18,22 | 2,31-47,54 | 2,19-17,54 | 1,86-15,01 | 1,97-22,67 | 1,96-15,40 |
| Média | 10,31 | 7,03 | 7,82 | 5,51 | 8,25 | 6,78 | 4,90 | 4,37 | 4,70 |

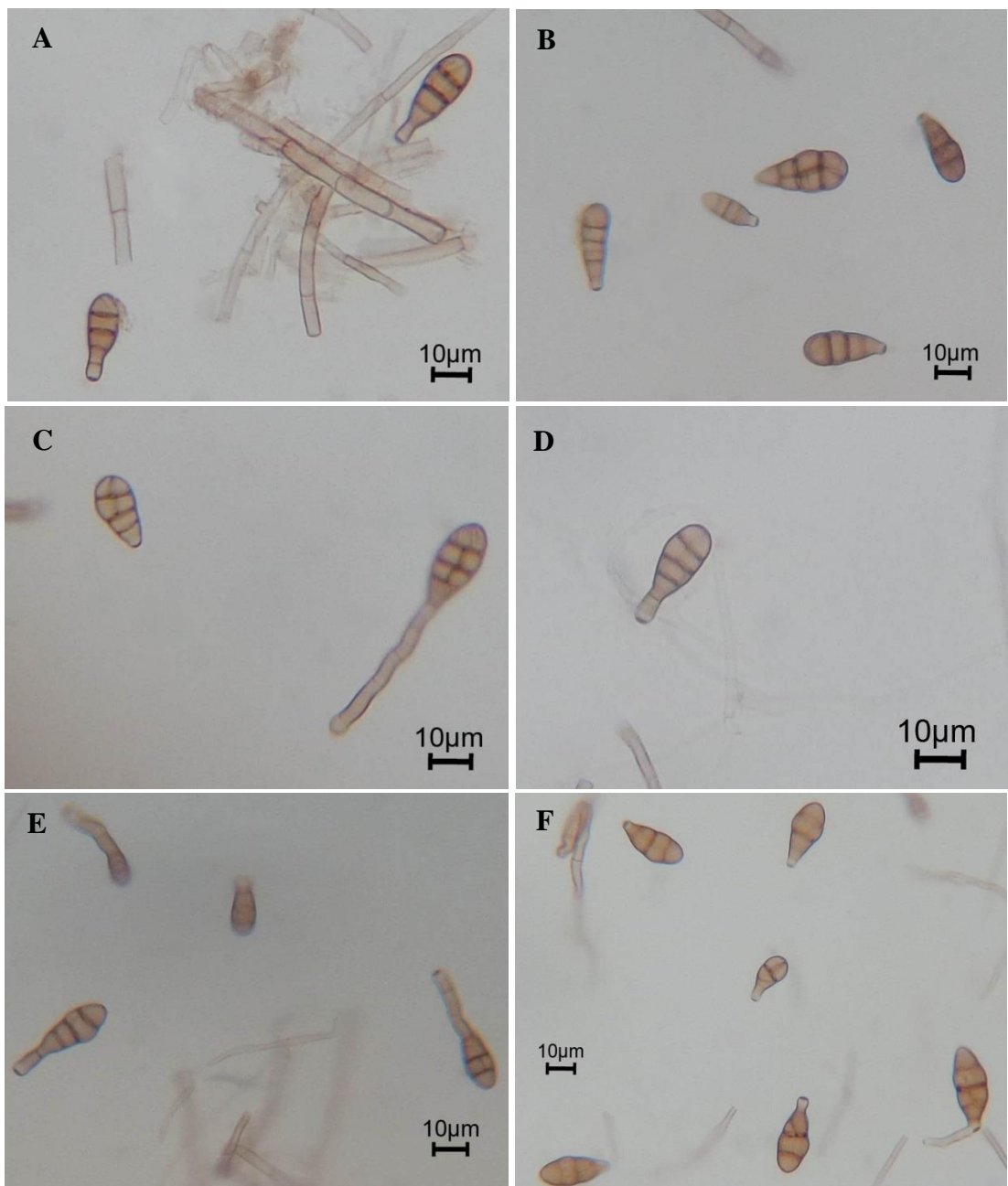


Figura 6. Fotos dos isolados NR1 (A), NR2 (B), ZM1 (C), ZM2 (D), ZM4 (E), ZM5 (F).

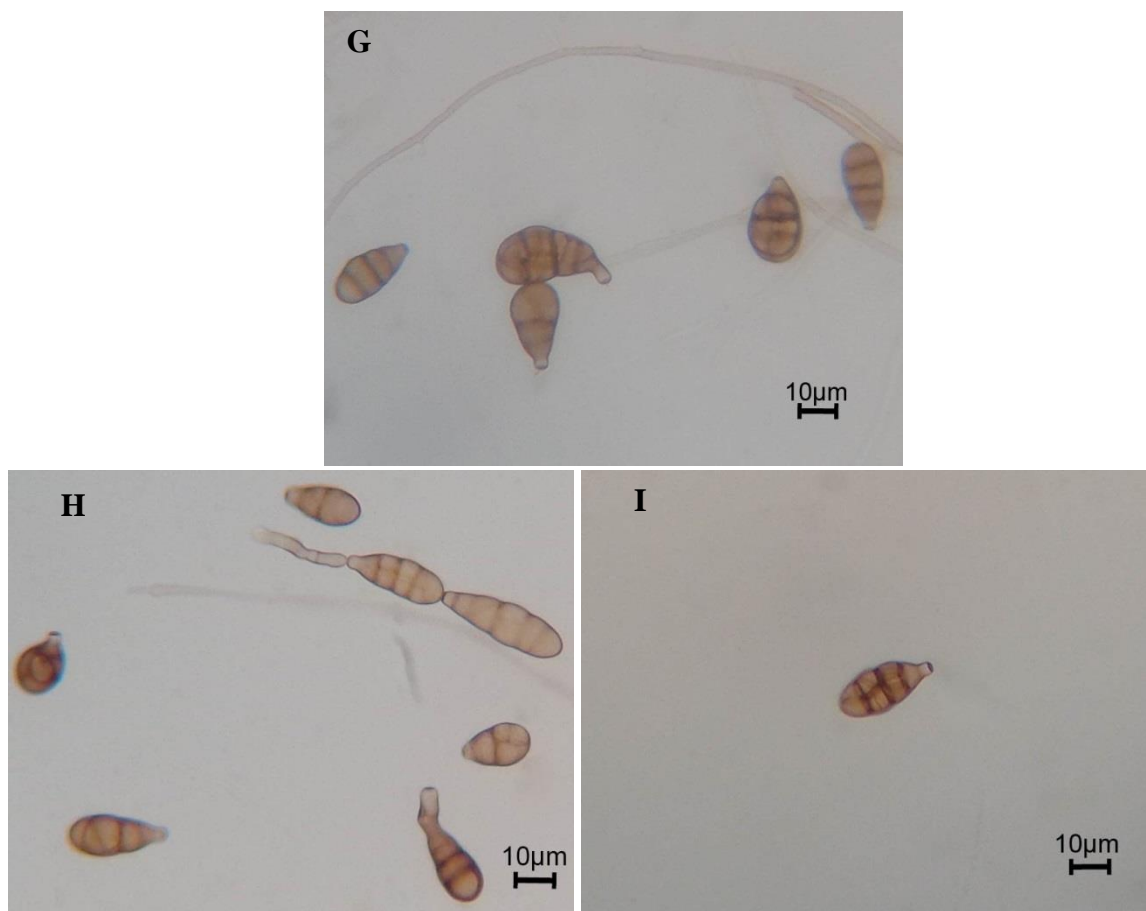


Figura 7. Fotos dos isolados ZM6 (G), D1 (H) e ZM7 (I).

4 CONCLUSÕES

- a) Não há relação de patogenicidade entre os isolados de *Alternaria resedae* e do grupo de espécies *A. alternata* com a cultivar Niágara Rosada.

- b) Hidróxido de cobre pode induzir injúrias nas folhas de videira com algumas características que se assemelham a requeima das folhas.

- c) A videira Niágara Rosada apresenta colonização endofítica de folhas por *Alternaria resedae* e grupo de espécies *A. alternata*.

5 REFERÊNCIAS

- ABBAS, H. K., G. H. Egle, B. J. Johnson: Influence of unrefined corn oil and surface active agents on germination and infectivity of *Alternaria helianthi*. – **Weed Science**, Abstr. 36, 50, 1996.
- AMSELLEM, Z.; SHARON, A.; GRESSEL, J. and QUIMBY, P. C., Jr. Complete abolition of high inoculum threshold of two mycoherbicides, *Alternaria cassia* and *Alternaria crassa*, when applied in invert emulsion. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, p. 925-929, 1990.
- AULD, B. A.: Vegetable oil suspension emulsions reduce dew dependence of a mycoherbicide. – **Crop Protection**, Amsterdam, v. 12, p. 477-479, 1993.
- AZEVEDO, J. L. Melhoria genética e preservação de fungos utilizados no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (coord). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, p237-251, 1991.
- BASHI, E.; ROTEM, J. Sporulation of *Stemphylium botryosum* f. sp. *Lycopersici* in tomatoes and of *Alternaria porri* f.sp. *solani* in potatoes under alternating wet-dry regimes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, p. 532-535, 1975.
- BERBEE, M.L.; PIRSEYEDI, M.; HUBBARD, S. Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **Mycologia**, New York, n. 91, p.964–977, 1999.
- BIGGS, A. R. Detection of latent infections in apple fruit with paraquat. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, p. 1062-1067, 1995.
- BONDE, R. Variation of strains of *Alternaria solani* isolated from lesions on potato tubers. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 17, p. 56, 1927.
- BONDE, R. Physiological strains of *Alternaria solani*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 19, p. 533-548, 1929.
- BÓVEDA, R.R.M. Morfologia, patogenicidade, esporulação e sensibilidade a fungicidas *in vitro* de *Alternaria solani* (Ell. e Mart.) Jones e Grout e *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler de solanáceas. 106 p. Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1986.
- BOYETTE, C. D., P. C. Quimby, Jr., W. J. Connick, Jr., D. J. Daigle and F. E. Fulgham. Progress in the production, formulation, and application of mycoherbicides. In D. O. TeBeest, ed. **Microbial Control of Weeds**. London: Chapman and Hall. Pp. 209-225, 1992.
- BRUM, M. C. P. **Fungos endofíticos de *Vitis labrusca* L. var. Niagara Rosada e o seu potencial biotecnológico**. Mogi das Cruzes: UMC, 208. 103 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação Integrada: Doutorado em Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2008.

BRUM, M. C. P. **Microrganismos endofíticos da videira Niágara Rosada (*Vitis labrusca* L.) e o controle biológico de *Fusarium***. Mogi das Cruzes: UMC, 206. 79 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós- Graduação Integrada: Doutorado em Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2006.

CERKAUSKAS, R. F. Latent colonization by *Colletotrichum* spp: Epidemiological considerations and implications for mycoherbicides. *Can. J. Plant Pathology*, Oxford, v. 10, p. 297-310, 1988.

CHIA, L. S.; THOMPSON, J. E., and DUMBROFF, E. B. Simulation of the effects of leaf senescence on membranes by treatment with paraquat. *Plant Physiology*, Lancaster, v. 67, p. 415-420, 1981.

COOK, R. T. Strawberry black spot caused by *Colletotrichum acutatum*. Pages 301-304 in: British Crop Protection Council Monograph No. 54: **Plant Health and the European Single Market**. D. Ebbels, ed. Hampshire UK, 1993.

COSTA, S.M.A.L; GOMES, M.R.L.; TARSITANO, M.A.A. A comercialização de uvas finas na região de Jales – SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.1, p.127-132, 2008.

GINDRAT, D., and PEZET, R. Paraquat: a tool for the quick development of latent fungal infection and endophytic fungi (In French with English abstract). *J. Phytopathology*, Saint Paul, v. 141, p. 86-98, 1994.

GONZÁLES, V.; TELLO, M. L. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. **Fungal Diversity**, v. 47, p. 29–42, 2011.

HONG, S.G., CRAMER, R.A., LAWRENCE, C.B., PRYOR, B.M. *Alt a1* homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, (2005) p. 119-129. 2004.

LAWRENCE, D.P.; GANNIBAL, P.B.; PEEVER, T.L. and PRYOR, B.M. The Sections of *Alternaria*: Formalizing species-group concepts. **Mycologia**, New York, v. 105, p. 530-546, 2013.

LOGRIECO, A., MORETTI, A., SOLFRIZZO, M.. *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. **World Mycotoxin Journal**, Bithoven, v. 2, p. 129–140, 2009.

MEDINA, A.; MATEO, R.; LÓPEZ-OCAÑA, L.; VALLE-ALGARRA, F. M.; JIMÉNEZ, M. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and others members of *Aspergillus* section *Nigri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, p. 496 - 4702, 2005.

MOSTERT, L.; CROUS, P. W.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis vitcola* complex. **Sydowia**, v.52, p. 46 - 48, 2000.

MUSETTI, R.; VECCHIONE, A.; STRINGHER, L.; BORSELLI, S.; ZULINI, L.; MARZANI, C.; D'AMBROSIO, M.; SANITÀ DI TOPI, L.; PERTOT, I. Inhibitor of sporulation and ultrastructural alterations of grapevine downy mildew by the endophytic fungus *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 689-698, 2006.

NEEGARD, P. Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Oxford University Press, London, 1945.

PEVEER, T.L., SU, G., CARPENTER-BOGGS, L., TIMMER, L.W. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. **Mycologia**, New York, v. 96, p. 119–134, 2004.

R Development Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 22 abr. 2014

ROTEM, J. Variability in *Alternaria porri* f. sp. *solani*. **Israel Journal of Botany**, Jerusalem, v. 15, p. 48-57, 1966.

ROTEM, J. **The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity**. Saint Paul, MN, USA: APS press, 1994.

SAS Institute, SAS (Statistical Analysis System). User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. 129p., 2003.

SIMMONS, E. G. ***Alternaria*: an identification manual**. Utrecht: CBS. CBS Biodiversity Series, 6. P.775. 2007.

SIMMONS, E. G. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint and challenge. In: Chelkowski J, Visconti A (eds) ***Alternaria, Biology, Plant Diseases and Metabolites***. Elsevier Science Publishers, Amsterdam-London-New York-Tokyo. 1-36, 1992.

SINCLAIR, J. B. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, p. 220-224, 1991.

SUTTON, J. C., and PENG, C. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 615-621, 1993.

TARSINATO, M.A.A.; COSTA, T.V.; NAVES, R.de.L.; SOUZA, R.T. **Aspectos Fitossanitários da Viticultura na Região Noroeste de São Paulo**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013 (Embrapa Uva e Vinho: Comunicado Técnico, 136).

VARGAS, L.; SILVA, A.A. da; BORÉM, A.; REZENDE, S.T.; FERREIRA, F.A., SEDIYAMA, T. **Resistência de plantas daninhas à herbicidas**, Viçosa: Jard, 1999. 131p.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Ed.). ***PCR protocols: a guide to methods and applications***. San Diego: Academic Press, p. 315-32, 1990.

YANG, S. M.; JOHNSON, D. R.; DOWLER, W. M., CONNICK, W. J. JR. Infection of leafy spurge by *Alternaria alternata* and *A. angustiovoidea* in the absence of dew. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 953-958, 1993.

ANEXOS

Alinhamento de nucleotídeos de sequência do gene Alt a1 de isolados de *Alternaria* spp. da videira e de sequências buscadas no *GenBank*¹

| | | |
|------------------------|--|-----|
| ZM2 | CGCCGCTGC AC CTCTCGAGTCTCGCCAGGACACCGCATCCTGCCCTGTCA | 50 |
| ZM4 | CGCCGCTGC AC CTCTCGAGTCTCGCCAGGACACCGCATCCTGCCCTGTCA | 50 |
| NR1 | CGCCGCTGC AC CTCTCGAGTCTCGCCAGGACACCGCATCCTGCCCTGTCA | 50 |
| ZM1 | CGCCGCTGC AC CTCTCGAGTCTCGCCAGGACACCGCATCCTGCCCTGTCA | 50 |
| NR2 | CGCCGCTGC AC CTCTCGAGTCTCGCCAGGACACCGCATCCTGCCCTGTCA | 50 |
| ZM5 | CGCCGCTGC AC CTCTCGAGTCTCGCCAGGACACCGCATCCTGCCCTGTCA | 50 |
| ZM6 | CGCCGCTGC AC CTCTCGAGTCTCGCCAGGACACCGCATCCTGCCCTGTCA | 50 |
| A_resedae_JQ646408_1 | CGCCGCTGC AC CTCTCGAGTCTCGCCAGGACACCGCATCCTGCCCTGTCA | 50 |
| D1 | CGCTGCTGCT CT CTCTCGAGTCTCGCCAGGACACCGCATCCTGCCCTGTCA | 50 |
| ZM7 | CGCTGCTGCT CT CTCTCGAGTCTCGCCAGGACACCGCATCCTGCCCTGTCA | 50 |
| A_alternata_AY563301_1 | CGCTGCTGCT CT CTCTCGAGTCTCGCCAGGACACCGCATCCTGCCCTGTCA | 50 |
| | *** ***** | |
| ZM2 | CCACCGAGGGT G ACTACGTCT GGA AGATT TCCGAG TTCTACGGACGCAAG | 100 |
| ZM4 | CCACCGAGGGT G ACTACGTCT GGA AGATT TCCGAG TTCTACGGACGCAAG | 100 |
| NR1 | CCACCGAGGGT G ACTACGTCT GGA AGATT TCCGAG TTCTACGGACGCAAG | 100 |
| ZM1 | CCACCG-gggt G ACTACGTCT G -AAGATT TCCGAG TTCTACGGACGCAAG | 98 |
| NR2 | CCACCGAGGGT G ACTACGTCT GGA AGATT TCCGAG TTCTACGGACGCAAG | 100 |
| ZM5 | CCACCGAGGGT G ACTACGTCT GGA AGATT TCCGAG TTCTACGGACGCAAG | 100 |
| ZM6 | CCACCGAGGGT G ACTACGTCT GGA AGATT TCCGAG TTCTACGGACGCAAG | 100 |
| A_resedae_JQ646408_1 | CCACCGAGGGT G ACTACGTCT GGA AGATT TCCGAG TTCTACGGACGCAAG | 100 |
| D1 | CCACT G AGGGT G ACTACGTCT GGA AGAT CTCCGA ATTCTACGGACGCAAG | 100 |
| ZM7 | CCACT G AGGGT G ACTACGTCT GGA AGAT CTCCGA ATTCTACGGACGCAAG | 100 |
| A_alternata_AY563301_1 | CCACT G AGGGT G ACTACGTCT GGA AGAT CTCCGA ATTCTACGGACGCAAG | 100 |
| | **** * ***** | |
| ZM2 | CCGGAGGGAACCTACTACAACAGCCTCGGCTTCAACATCAAGGC T ACCAA | 150 |
| ZM4 | CCGGAGGGAACCTACTACAACAGCCTCGGCTTCAACATCAAGGC T ACCAA | 150 |
| NR1 | CCGGAGGGAACCTACTACAACAGCCTCGGCTTCAACATCAAGGC T ACCAA | 150 |
| ZM1 | CCGGAGGGAACCTACTACAACAGCCTCGGCTTCAACATCAAGGC T ACCAA | 148 |
| NR2 | CCGGAGGGAACCTACTACAACAGCCTCGGCTTCAACATCAAGGC T ACCAA | 150 |
| ZM5 | CCGGAGGGAACCTACTACAACAGCCTCGGCTTCAACATCAAGGC T ACCAA | 150 |
| ZM6 | CCGGAGGGAACCTACTACAACAGCCTCGGCTTCAACATCAAGGC T ACCAA | 150 |
| A_resedae_JQ646408_1 | CCGGAGGGAACCTACTACAACAGCCTCGGCTTCAACATCAAGGC T ACCAA | 150 |
| D1 | CCGGA A GGAACCTACTACAACAGCCTCGGCTTCAACATCAAGGC CA CCAA | 150 |
| ZM7 | CCGGA A GGAACCTACTACAACAGCCTCGGCTTCAACATCAAGGC CA CCAA | 150 |
| A_alternata_AY563301_1 | CCGGA A GGAACCTACTACAACAGCCTCGGCTTCAACATCAAGGC CA CCAA | 150 |
| | ***** ***** | |
| ZM2 | CGGAGGAAC ACT CGACTTCACCTGCTCT CACT CAG-CCG ACA AGCTTGAG | 199 |
| ZM4 | CGGAGGAAC ACT CGACTTCACCTGCTCT CACT CAG-CCG ACA AGCTTGAG | 199 |
| NR1 | CGGAGGAAC ACT CGACTTCACCTGCTCT CACT CAG-CCG ACA AGCTTGAG | 199 |
| ZM1 | CGGAGGAAC ACT CGACTTCACCTGCTCT CACT CAG-CCG ACA AGCTTGAG | 197 |
| NR2 | CGGAGGAAC ACT CGACTTCACCTGCTCT CACT CAG-CCG ACA AGCTTGAG | 199 |
| ZM5 | CGGAGGAAC ACT CGACTTCACCTGCTCT CACT CAG-CCG ACA AGCTTGAG | 199 |
| ZM6 | CGGAGGAAC ACT CGACTTCACCTGCTCT CACT CAG-CCG ACA AGCTTGAG | 199 |
| A_resedae_JQ646408_1 | CGGAGGAAC ACT CGACTTCACCTGCTCT CACT CAG-CCG ACA AGCTTGAG | 199 |
| D1 | CGGAGGAAC CC TCGACTTCACCTGCTCT -GCTCAGGCCGATA AGCTTGAG | 199 |
| ZM7 | CGGAGGAAC CC TCGACTTCACCTGCTCT -GCTCAGGCCGATA AGCTTGAG | 199 |
| A_alternata_AY563301_1 | CGGAGGAAC CC TCGACTTCACCTGCTCT -GCTCAGGCCGATA AGCTTGAG | 199 |
| | ***** ***** | |
| ZM2 | GACCAC ACT TGGTACTCT TTGCGGCG GAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTT | 249 |
| ZM4 | GACCAC ACT TGGTACTCT TTGCGGCG GAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTT | 249 |
| NR1 | GACCAC ACT TGGTACTCT TTGCGGCG GAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTT | 249 |
| ZM1 | GACCAC ACT TGGTACTCT TTGCGGCG GAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTT | 247 |
| NR2 | GACCAC ACT TGGTACTCT TTGCGGCG GAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTT | 249 |
| ZM5 | GACCAC ACT TGGTACTCT TTGCGGCG GAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTT | 249 |
| ZM6 | GACCAC ACT TGGTACTCT TTGCGGCG GAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTT | 249 |
| A_resedae_JQ646408_1 | GACCAC ACT TGGTACTCT TTGCGGCG GAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTT | 249 |
| D1 | GACCACA AG TGGTACTCT CTGTGGCG GAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTT | 249 |
| ZM7 | GACCACA AG TGGTACTCT CTGTGGCG GAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTT | 249 |
| A_alternata_AY563301_1 | GACCACA AG TGGTACTCT CTGTGGCG GAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTT | 249 |
| | ***** ***** | |

continuação

| | | |
|------------------------|---|-----|
| ZM2 | CGACAGCGACCGCA AC GGTCTGCTCCTGAAGCAGAAGGTTAGCGACGAGT | 299 |
| ZM4 | CGACAGCGACCGCA AC GGTCTGCTCCTGAAGCAGAAGGTTAGCGACGAGT | 299 |
| NR1 | CGACAGCGACCGCA AC GGTCTGCTCCTGAAGCAGAAGGTTAGCGACGAGT | 299 |
| ZM1 | CGACAGCGACCGCA AC GGTCTGCTCCTGAAGCAGAAGGTTAGCGACGAGT | 297 |
| NR2 | CGACAGCGACCGCA AC GGTCTGCTCCTGAAGCAGAAGGTTAGCGACGAGT | 299 |
| ZM5 | CGACAGCGACCGCA AC GGTCTGCTCCTGAAGCAGAAGGTTAGCGACGAGT | 299 |
| ZM6 | CGACAGCGACCGCA AC GGTCTGCTCCTGAAGCAGAAGGTTAGCGACGAGT | 299 |
| A_resedae_JQ646408_1 | CGACAGCGACCGCA AC GGTCTGCTCCTGAAGCAGAAGGTTAGCGACGAGT | 299 |
| D1 | CGACAGCGACCGCA AG GGTCTGCTCCTGAAGCAGAAGGTTAGCGACGAGT | 299 |
| ZM7 | CGACAGCGACCGCA AG GGTCTGCTCCTGAAGCAGAAGGTTAGCGACGAGT | 299 |
| A_alternata_AY563301_1 | CGACAGCGACCGCA AG GGTCTGCTCCTGAAGCAGAAGGTTAGCGACGAGT | 299 |
| | ***** | |
| ZM2 | AAGTTACCCCTTGACCTTCGATTACTTCGCAGATTCAGATATACTAACAT | 349 |
| ZM4 | AAGTTACCCCTTGACCTTCGATTACTTCGCAGATTCAGATATACTAACAT | 349 |
| NR1 | AAGTTACCCCTTGACCTTCGATTACTTCGCAGATTCAGATATACTAACAT | 349 |
| ZM1 | AAGTTACCCCTTGACCTTCGATTACTTCGCAGATTCAGATATACTAACAT | 347 |
| NR2 | AAGTTACCCCTTGACCTTCGATTACTTCGCAGATTCAGATATACTAACAT | 349 |
| ZM5 | AAGTTACCCCTTGACCTTCGATTACTTCGCAGATTCAGATATACTAACAT | 349 |
| ZM6 | AAGTTACCCCTTGACCTTCGATTACTTCGCAGATTCAGATATACTAACAT | 349 |
| A_resedae_JQ646408_1 | AAGTTACCCCTTGACCTTCGATTACTTCGCAGATTCAGATATACTAACAT | 349 |
| D1 | AAGTTACCCCTTGACCTTCGATTACTTCGCAGATTCAGATATACTAACAT | 349 |
| ZM7 | AAGTTACCCCTTGACCTTCGATTACTTCGCAGATTCAGATATACTAACAT | 349 |
| A_alternata_AY563301_1 | AAGTTACCCCTTGACCTTCGATTACTTCGCAGATTCAGATATACTAACAT | 349 |
| | ***** | |
| ZM2 | GTTTT CAGCATCACCTATGTCGCTACCGCCACTCTTCCCAACTACTGCCG | 399 |
| ZM4 | GTTTT CAGCATCACCTATGTCGCTACCGCCACTCTTCCCAACTACTGCCG | 399 |
| NR1 | GTTTC CAGCATCACCTATGTCGCTACCGCCACTCTTCCCAACTACTGCCG | 399 |
| ZM1 | GTTTC CAGCATCACCTATGTCGCTACCGCCACTCTTCCCAACTACTGCCG | 397 |
| NR2 | GTTTC CAGCATCACCTATGTCGCTACCGCCACTCTTCCCAACTACTGCCG | 399 |
| ZM5 | GTTTC CAGCATCACCTATGTCGCTACCGCCACTCTTCCCAACTACTGCCG | 399 |
| ZM6 | GTTTC CAGCATCACCTATGTCGCTACCGCCACTCTTCCCAACTACTGCCG | 399 |
| A_resedae_JQ646408_1 | GTTTC CAGCATCACCTATGTCGCTACCGCCACTCTTCCCAACTACTGCCG | 399 |
| D1 | ATCCC CAGCATCACCTATGTCGCTACCGCCACTCTTCCCAACTACTGCCG | 399 |
| ZM7 | ATCCC CAGCATCACCTATGTCGCTACCGCCACTCTTCCCAACTACTGCCG | 399 |
| A_alternata_AY563301_1 | ATCCC CAGCATCACCTATGTCGCTACCGCCACTCTTCCCAACTACTGCCG | 399 |
| | * ***** | |
| ZM2 | CGCTGGCGGTAACGGCCCTAAGG | 422 |
| ZM4 | CGCTGGCGGTAACGGCCCTAAGG | 422 |
| NR1 | CGCTGGCGGTAACGGCCCTAAGG | 422 |
| ZM1 | CGCTGGCGGTAACGGCCCTAAGG | 420 |
| NR2 | CGCTGGCGGTAACGGCCCTAAGG | 422 |
| ZM5 | CGCTGGCGGTAACGGCCCTAAGG | 422 |
| ZM6 | CGCTGGCGGTAACGGCCCTAAGG | 422 |
| A_resedae_JQ646408_1 | CGCTGGCGGTAACGGCCCTAAGG | 422 |
| D1 | CGCTGGCGGTAACGGCCCTAAGG | 422 |
| ZM7 | CGCTGGCGGTAACGGCCCTAAGG | 422 |
| A_alternata_AY563301_1 | CGCTGGCGGTAACGGCCCTAAGG | 422 |
| | ***** | |

¹As sequências ZM2, ZM4, NR1, ZM1, NR2, ZM5, ZM6, D1 e ZM7 são originadas deste estudo, enquanto as demais foram obtidas do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

CAPÍTULO 2

Severidade de míldio na cultivar BRS Vitória no sistema de produção de uva de mesa do
Norte do Paraná

Severidade de míldio na cultivar BRS Vitória no sistema de produção de uva de mesa do
Norte do Paraná

RESUMO

O míldio da videira causado pelo oomyceto *Plasmopara viticola* é a principal doença da videira no Paraná e em outras regiões vitícolas do país. A nova cultivar BRS Vitória destaca-se pela tolerância a esta doença e constitui uma alternativa viável para a produção de uva de mesa com menor emprego de agrotóxicos. Este trabalho teve como objetivo avaliar o progresso temporal e o dano de míldio na cultivar BRS Vitória no sistema de produção de uvas de mesa do norte do Paraná, assim como analisar a influência de fatores climáticos na ocorrência da doença. O experimento foi conduzido na safra normal de 2013 e safra temporã de 2014, em parreirais comerciais de uva de mesa das cultivares BRS Vitória e Benitaka (grupo Itália *Vitis vinifera*) no município de Marialva, PR. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e 10 repetições. Os tratamentos foram os seguintes: 1, convencional; 2, pulverização a cada 7 dias; 3, pulverização a cada 14 dias; 4, sintoma de mancha óleo; 5, sintoma de mofo. Para fins descritivos, utilizou-se como controle negativo a 'Benitaka'. Pulverizações realizadas no aparecimento da mancha óleo e do mofo apresentam mesma eficiência do que os programas calendarizados que se iniciaram no início da brotação.

Palavras-chave: BRS Vitória. Míldio da videira. Viticultura.

Downy mildew severity on the cultivar BRS Vitória in the Northern Paraná State

ABSTRACT

The downy mildew caused by the oomycete *Plasmopara viticola* oomyceto is a major disease of grapes in Paraná State, Brazil and other wine-growing regions. The cultivars that are grown in this region are highly susceptible to mildew. The new BRS Vitória stands out for resistance/tolerance to this disease and is a viable alternative to table grape production with lower use of fungicides. This work aimed to evaluate the temporal progress and downy mildew damage on BRS Vitória in the northern Paraná table grapes production system, as well as to analyze the influence of climatic factors on the occurrence of the disease. The experiment was conducted in the normal crop of 2013 and early 2014 harvest in grape vineyards commercial table of BRS Vitória and Benitaka (group Italy *Vitis vinifera*) in Marialva, PR-Brazil. The experimental design completely randomized, with six treatments and ten repetitions. The treatments were as follows: 1, conventional; 2, spray every 7 days; 3 spray every 14 days; 4, spot oil symptom; 5, mold symptoms. For descriptive purposes, it was used as a negative control the 'Benitaka'. Sprays made in the appearance of the spot oil and mold have the same efficiency than the scheduled programs that began in the early sprouting.

Keywords: BRS Vitória. Downy mildew. Viticulture.

1 INTRODUÇÃO

A região norte do Paraná é um importante polo de viticultura tropical e responde por, aproximadamente, 20% do total da área cultivada por uvas para mesa no Brasil (SHIMANO; SENTELHAS, 2012; KISHINO et al., 2007). Nessa região, a produção de uva de mesa caracteriza-se pela obtenção de dupla safra em um ano, uma regular e outra fora de época (KISHINO et al., 2007). Na safra normal, a primeira poda ou poda de inverno é realizada no fim do repouso hibernar, nos meses de julho e início de agosto, com realização da colheita em dezembro e janeiro. Na safra temporã, a segunda poda ou poda de verão ocorre após a colheita originada da poda de inverno, obtendo-se uma produção fora de época entre maio e junho (ANZANELLO et al., 2010; NAVES et al., 2005). A produção da região é voltada principalmente ao mercado interno, com destaque os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Paraná.

Todavia, na safra temporã, a maior parte do ciclo produtivo da videira ocorre no período chuvoso, nos meses de janeiro a março, quando a temperatura e a umidade relativa são elevadas. O clima quente e úmido nas fases de desenvolvimento de ramos e folhas, de florescimento e do início da frutificação favorece a ocorrência de doenças fúngicas, das quais a mais importante é o míldio (*Plasmopara viticola*). Essa doença é altamente destrutiva e afeta todos os tecidos verdes da planta, o que inclui folhas, ramos jovens, inflorescência e cachos em formação, podendo causar perdas de até 100% da produção. Além de prejudicar a produção na safra, a doença também prejudica o desenvolvimento dos ramos da videira, os quais são necessários para as safras seguintes, comprometendo assim a longevidade das plantas (NAVES et al., 2005; KISHINO et al., 2007; TESSMANN et al., 2007, MADDEN et al., 2000).

Devido ao fato de que as cultivares de uva de mesa que são cultivadas tradicionalmente no norte do Paraná, assim como nas demais regiões do país sejam altamente susceptíveis ao míldio, o controle da doença depende muito do controle químico com fungicidas, tornando-se comum os produtores fazerem mais de 40 pulverizações de fungicidas apenas para o controle de míldio. Muitas dessas aplicações são preventivas e visam mitigar o risco de danos da doença, que é elevado, e tal situação implica no aumento do custo de produção e causa impactos negativos na saúde dos produtores e consumidores de uva e no meio ambiente (NAVES et al., 2005; KISHINO et al., 2007; TESSMANN et al., 2007).

Assim, o desenvolvimento de cultivares de uvas de mesa sendo mais resistentes ao míldio e que com isso demandem menor utilização de agrotóxicos é muito importante para a sustentabilidade social, econômica e ambiental da viticultura no Brasil. Outro fato importante é a busca por cultivares de uvas apirênicas, sem sementes, cuja preferência pelo mercado é crescente. Nesse sentido, a cultivar de mesa sem sementes BRS Vitória, resultante do cruzamento de CNPUV 681-29 x 'BRS Linda', realizado em 2004, na Embrapa Uva e Vinho, Estação Experimental de Viticultura Tropical (EVT), em Jales, SP, é uma novidade que apresenta diversas características que atendem às novas exigências do mercado consumidor, como ser apirênica, e também ser mais resistente ao míldio. Essa nova cultivar significa um importante avanço em relação às cultivares de uvas sem sementes disponíveis no mercado e na possibilidade de reduções no número de aplicações de fungicidas para o controle da doença (MAIA et al., 2012).

Este estudo teve como objetivo avaliar o progresso temporal e o dano de míldio na cultivar BRS Vitória no sistema de produção de uvas de mesa do norte do Paraná, assim como analisar a influência de fatores climáticos na ocorrência da doença.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização do Local e da Área Experimental

O ensaio experimental foi conduzido na safra normal de 2013 e safra temporã de 2014, em parreirais comerciais de uva de mesa das cultivares BRS Vitória e Benitaka (grupo Itália *Vitis vinifera*). A cultivar BRS Vitória foi enxertada sobre porta-enxerto 'IAC 766 Campinas', e o parreiral, conduzido em sistema latada, com espaçamento de 5,0 m entre plantas e 2,5 m entre linhas, encontrava-se no segundo ano de produção. A cultivar Benitaka foi enxertada também sobre porta-enxerto, mesmo sistema de condução e espaçamento da cultivar BRS Vitória. A área experimental está localizada no município de Marialva, na região noroeste do Estado do Paraná, com altitude de 602 metros acima do nível do mar e com as seguintes coordenadas de localização: 23°29'06"S e 51°47'30"O.

Segundo a classificação de Köppen, o município de Marialva está inserido nos domínios do Clima Subtropical Mesotérmico (Cfa). Esse clima caracteriza-se por verões quentes, com temperaturas médias superior a 22°C, geadas pouco frequentes e tendência de concentração das chuvas nesta estação, todavia sem estação seca definida. No mês mais frio a temperatura média é inferior a 18°C (mesotérmico) (CAVIGLIONE et al., 2000). O solo da área onde foi instalado o parreiral é classificado como Terra Roxa Estruturada Eutrófica fase floresta tropical subperenifólia.

O tamanho das parcelas experimentais foi de 50 m², nas quais foram marcadas 10 subparcelas de duas plantas onde foram previamente marcados 10 ramos aleatoriamente contendo até 20 folhas, para avaliação da doença.

2.2 Progresso temporal e dano do míldio

Os seguintes programas de pulverizações de fungicidas foram comparados na cultivar BRS Vitória:

- Programa de fungicidas considerado padrão pelos produtores da região, no qual as pulverizações são realizadas de forma calendarizada, com quatro a cinco pulverizações por semana dos fungicidas de acordo com a sequência mostrada na Tabela 1 (padrão do produtor);

- Programa calendarizado, com aplicações a cada sete dias, na sequência mostrada na Tabela 1, no período entre o início da brotação dos ramos e a maturação dos frutos (aplicação a cada sete dias);
- Programa calendarizado, com aplicações a cada 14 dias, na sequência mostrada na Tabela 1, no período entre o início da brotação dos ramos e a maturação dos frutos (aplicação a cada 14 dias).
- Programa de pulverizações com início a partir da ocorrência de sintomas de mancha óleo nas folhas, e a partir de então as aplicações espaçadas a cada 7 dias até a maturação dos frutos (sintoma de mancha óleo);
- Programa de pulverizações com início a partir da ocorrência de sintomas de mofo (esporulação) nas folhas, a partir de então espaçadas a cada 7 dias até a maturação dos frutos (sintoma de mofo).

Adjacente à área da cultivar BRS Vitória, em parreiral de uva da cultivar Benitaka foram demarcadas mais duas parcelas, em que numa delas foi realizado o mesmo programa padrão de pulverizações de fungicidas mencionado anteriormente (Tabela 1).

As pulverizações de fungicidas foram realizadas com equipamento de pulverização tratorizado, com o volume de calda de 800 litros por hectare. As informações a respeito de fungicidas utilizados nos tratamentos constam na Tabela 1.

Tabela 1. Fungicidas e doses utilizadas nos tratamentos

| Tratamentos | Ingrediente ativo | Dose (g 100 L ⁻¹) |
|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Convencional | Cimoxanil + Mancozeb | 20+160 |
| | Propineb | 210 |
| | Benalaxil + Mancozeb | 146 |
| | Fenamidona + Propineb | 15+210 |
| | Difenoconazol | 2-3 |
| | Metiram + Piraclostrobina | 10+110 |
| | Oxicloreto de cobre | 180-210 |
| | Tiofanato metílico | 49 |
| Aplicação a cada 7 dias | Tiofanato metílico + Propineb | 50-63+210 |
| | Cimoxanil + Mancozeb | 20+160 |
| | Metiram + Piraclostrobina | 10+110 |
| | Benalaxil + Mancozeb | 146 |
| | Dimetomorfe | 450 a 675 |
| Aplicação a cada 14 dias | Benalaxil + Mancozeb | 146 |
| | Cimoxanil + Mancozeb | 20+160 |
| | Dimetomorfe | 450 a 675 |
| Sintomas de mancha óleo | Benalaxil + Mancozeb | 146 |
| | Cimoxanil + Mancozeb | 20+160 |
| | Dimetomorfe | 450 a 675 |
| Sintomas de mofo | Benalaxil + Mancozeb | 146 |
| | Cimoxanil + Mancozeb | 20+160 |
| | Dimetomorfe | 450 a 675 |

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Os tratamentos foram comparados em parcelas únicas, e que dentro de cada parcela, foram tomadas de 10 amostras de ramos ao acaso e nestes ramos foram avaliados até 20 folhas (sub-amostras).

Em observações realizadas por MAIA et al. (2012), a cultivar de uva de mesa ‘BRS Vitória’ apresenta-se suscetível a podridão da uva madura (*Glomerella cingulata* (Ston.) Sapulda e Schrenk), assim considerando que na área do ensaio tem histórico de ocorrência da doença foram feitas quatro aplicações preventivas de fungicidas para o controle da podridão da uva madura na área total do ensaio, sendo duas de tiofanato metílico e duas de tebuconazole.

Na safra normal, os ramos foram podados em 05/08/2013, e a colheita dos frutos em 05/12/2013. Na safra temporã, os ramos foram podados em 22/01/2014, e os frutos colhidos em 14/05/2014. Na safra temporã a poda foi realizada nos ramos formados no período anterior, deixando-se varas com 12 a 14 gemas, em que foi estimulada a brotação de apenas as duas ou três gemas da ponta destas varas, aplicando-

se o Dormex® a 4%. A poda da safra normal foi feita no mesmo ramo, eliminando as gemas da ponta que já brotaram e todo o ramo que produziu na safra temporã. Este ramo foi podado deixando-se seis a nove gemas, de acordo com o ramo. O Dormex® é neste caso utilizado na dosagem de 5%.

Em todos os ciclos, após a brotação das gemas, o primeiro trato cultural realizado foi a seleção de brotos, sendo selecionados 1 a 2 brotos por ramo podado, e desses brotos foram eliminados as gavinhas e os netos. O desponte dos ramos foi feito com 16 a 20 folhas. Os ramos foram amarrados duas vezes para melhorar a sua distribuição no parreiral. A colheita foi realizada quando os cachos mais verdes apresentaram teor de sólidos solúveis superior a 18° Brix.

O progresso temporal do míldio da videira foi analisado na cultivar BRS Vitória nos períodos de agosto a dezembro de 2013 e janeiro a junho de 2014. A avaliação da severidade da doença foi realizada semanalmente, em três períodos fenológicos (floração ao pegamento do fruto; pegamento do fruto ao início da maturação; início da maturação a colheita). A severidade foi estimada pela porcentagem de área foliar doente utilizando-se a escala de Buffara (2014) (Figura 1). As avaliações consistiam em observar as folhas dos ramos marcados no interior de cada parcela e atribuir nota baseado na porcentagem visual de intensidade da doença. Considerou-se como sintomas a mancha óleo juntamente com a área necrosada pelo míldio. Para cálculo da severidade utilizou-se o índice de McKinney (1923), pela expressão: $SEV = [\Sigma(\text{grau da escala} \times \text{frequência}) / (\text{número total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})] \times 100$.

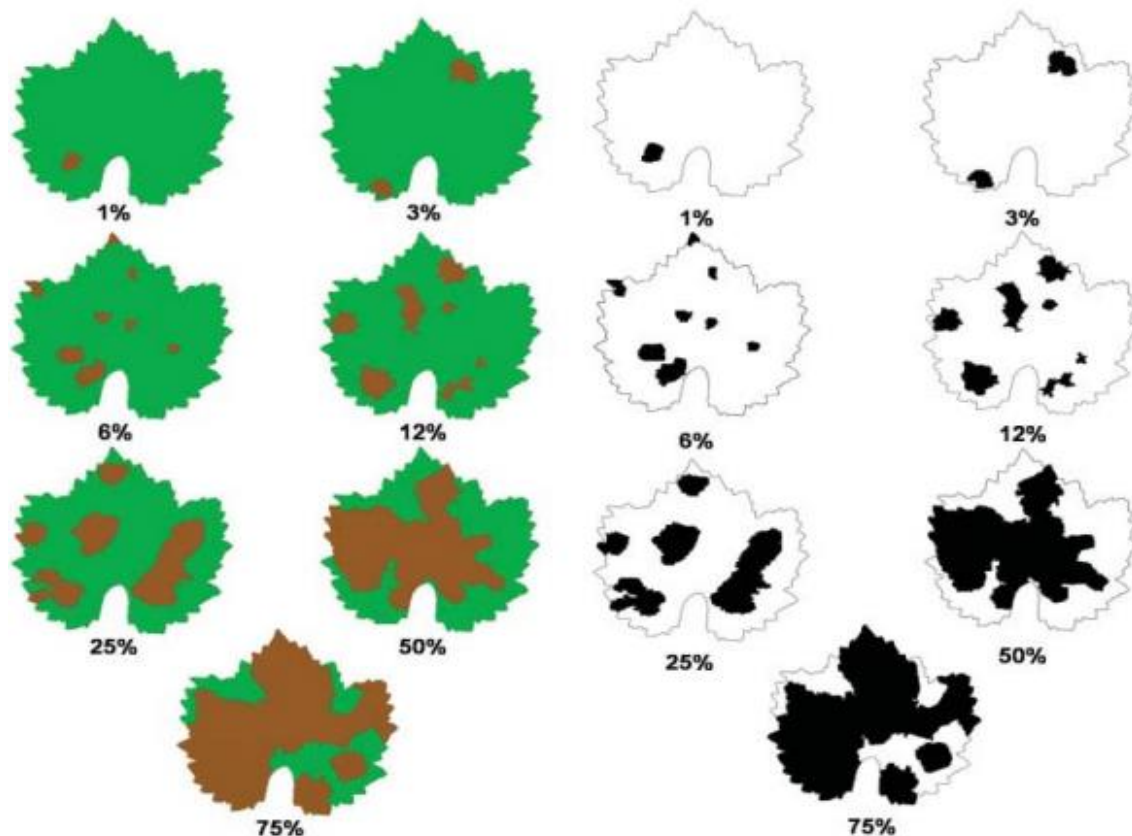


Figura 1. Escala diagramática colorida e em preto-e-branco para avaliação da severidade do míldio da videira.

Para fins de análise descritiva, procedeu-se apenas uma avaliação da severidade máxima da doença e danos nos cachos nas cultivares BRS Vitória e Benitaka, imediatamente antes da colheita dos frutos. Avaliaram-se 60 cachos, tomados aleatoriamente no centro de cada parcela, considerando-se aptos para comercialização, os cachos que não apresentaram sintomas de míldio.

2.3 Análise da favorabilidade climática ao míldio

As medições diárias de temperatura máxima (°C) e mínima (°C), umidade relativa (%), radiação solar (watt/m^2), horas com luz (minutos com luz no período de 1 hora), molhamento foliar (minutos com molhamento foliar no período de 1 hora), velocidade do vento (km/hora) foram realizadas com a Estação Meteorológica da marca μ METOS, modelo MCR200 (*Pessl Instruments*, Áustria) instalada no interior do

parreiral. As mensurações foram feitas a cada hora pela estação meteorológica instalada no interior do parreiral e às 09h, 15h e 21h pela Estação Climatológica Principal de Maringá (ECPM). Com intuito de não dividir o período noturno, os dias foram considerados como tendo início às 12 h e terminando às 12 h do dia seguinte.

As seguintes variáveis climáticas foram mensuradas pela estação meteorológica:

- Temperatura do ar ($^{\circ}\text{C}$): temperatura do ar na altura do dossel vegetativo, a partir da qual foi extraída a temperatura média (TMéd), mínima (TMin) e máxima diária (TMáx);
- Precipitação (mm): quantidade de chuvas ocorridas em determinado período, as quais calculou-se a precipitação acumulada entre duas avaliações (PP);
- Umidade relativa do ar (%): umidade relativa do ar na altura do dossel vegetativo da qual foi obtida a umidade relativa média (URméd) diária. A partir desse dado, calculou-se o número de horas com UR maior que 95% (HUR>95%) e número de horas com UR maior que 95% no escuro (HUR>95E);
- Radiação solar (watt/m^2): quantidade de radiação solar (RS) que atingiu o dossel vegetativo durante o dia;
- Horas com luz (HL): minutos com luminosidade no período de 1 hora;
- Molhamento foliar (MF): minutos com água na forma líquida na superfície foliar no período de 1 hora. Este dado foi utilizado para calcular o número de horas diário com molhamento foliar (HMF) e número de horas de molhamento foliar no escuro (HMFE).

Os dados de severidade da doença da safra temporã foram plotados na forma de gráficos, assim como de alguns parâmetros climáticos. A variável resposta não apresentou distribuição normal, desta forma utilizou-se o modelo linear generalizado misto (MLGM) admitindo-se distribuição beta com função de ligação 'logit' para componente sistemática. Para fins de modelagem, a variável resposta, severidade foi dividida por 100 e somada a uma constante de 0,0001, visto que a distribuição de probabilidade beta representa proporções maiores que zero. A incorporação do efeito da parcela como aleatório representa uma forma adequada de levar em consideração a falta de independência entre as observações de uma mesma parcela, visto que são realizadas observações repetidamente no tempo. Os dados da severidade durante nove dias foram ajustados pelo modelo:

$$\eta_{ijk} = \log\left(\frac{\pi_{ijk}}{1 - \pi_{ijk}}\right) = \beta_0 + C_i + T_j + (CT)_{ij} + R_{k(i)}$$

$i = 1, \dots, 5$ tratamentos; $j = 1, \dots, 3$ períodos fenológicos; $k = 1, \dots, 10$ repetições.

Em que π_{ijk} é a probabilidade de uma planta estar doente por causa do míldio na repetição k do tratamento i e no período fenológico j , β_0 é a média geral, C_i é o efeito do i -ésimo tratamento (efeito fixo), T_j é o efeito do j -ésimo período fenológico (efeito fixo), CT_{ij} é o efeito da interação entre o i -ésimo tratamento x j -ésimo período fenológico e $R_{k(i)}$ é o efeito aleatório, devido a k -ésima repetição (ramo) do i -ésimo tratamento. A estrutura de co-variância é a simétrica composta.

Adotou-se como critério para avaliar a qualidade do ajuste do modelo, a estatística qui-quadrado generalizado dividido pelos graus de liberdade que devem ser próximas de um quando o modelo é bem ajustado. A comparação entre médias foi realizada por meio da análise de contrastes ortogonais, utilizando o teste F ($p \leq 0,05$). Os dados foram analisados utilizando PROC GLIMMIX no programa “Statistical Analysis System”, versão 9.4 (SAS Institute, 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Progresso temporal e danos de míldio

Nas safras normais, de agosto a dezembro, não foi detectada a ocorrência de míldio no período crítico de suscetibilidade da doença que ocorre no início da brotação dos ramos até a fase em que as bagas atingem o estágio “ervilha”, correspondente ao ensaio cuja poda dos ramos foi realizada em 05 de agosto.

Na safra temporã, os primeiros sintomas de míldio foram observados em 25 de fevereiro, ou seja, 33 dias após a poda. Na escala de Eichhorn e Lorenz, descrita por Pratt (1988), as plantas encontravam-se no estágio 19 que corresponde ao início do florescimento. A última avaliação da área experimental foi realizada em 30 de abril, no início da compactação do cacho (estádio 33). Nessa safra, verificou-se que o míldio alcançou severidade máxima de 20,6%, com baixa perda de produção.

Na cultivar BRS Vitória, todos os tratamentos mostraram-se eficientes no controle de míldio, com índices máximos de 17,3%, de severidade, porém esses níveis de doença nas folhas não refletiram em danos nos cachos (Tabela 2).

Em relação ao número de pulverizações, o tratamento padrão do produtor para a cultivar BRS Vitória apresentou um número menor de aplicações de fungicidas. Esta redução não implicou em danos no cacho devido ao míldio, todavia o mesmo não pode ser dito da cultivar Benitaka que além de um número maior de pulverizações resultou em 5% de danos decorrentes da doença. As aplicações realizadas no aparecimento da mancha óleo e do mofo permitiram a redução do número de pulverizações, sem que houvesse danos devido ao míldio nos cachos, apesar de terem apresentado maiores quantidades máximas de doença (Tabela 2).

Tabela 2. Quantificação de míldio, expresso pela quantidade máxima de doença (QMD) nas cultivares BRS Vitória e Benitaka, conduzidas sob diferentes programas de fungicidas na safra temporã de 2014

| Cultivar/ Tratamentos ¹ | Nº de Pulverizações ² | QMD ³ | |
|------------------------------------|----------------------------------|------------------|------------------------|
| | | Severidade | Danos (%) ⁴ |
| BR CONV | 28 | 0±0 | 0 |
| BR P+7 | 9 | 1,3±2,8 | 0 |
| Vitória P+14 | 6 | 2,6±4,2 | 0 |
| Vitória M_O | 4 | 11,2±5,5 | 0 |
| Vitória M_MO | 4 | 17,3±16,4 | 0 |
| Benitaka CONV | 40 | 20,6±2,30 | 5 |

¹ CONV=convencional, P+7= pulverização a cada 7 dias, P+14= pulverização a cada 14 dias, M_O= pulverização no aparecimento de mancha óleo, M_MO= pulverização no aparecimento da mancha mofo.

² Número de pulverizações de fungicidas químicos para controle de míldio, de acordo com os programas descritos na Tabela 1.

³ QMD= quantidade máxima de doença expressa severidade (% área foliar doente).

⁴ Redução da quantidade de cachos aptos para comercialização devido a danos por míldio no momento da colheita.

⁵ Médias e desvio padrão.

A análise estatística dos dados mostrou que o modelo matemático utilizado para o progresso da doença em função do tempo foi o linear generalizado misto com função de ligação ‘logit’. Na estatística de ajuste, o qui-quadrado generalizado resultou em 527 e a divisão do mesmo pelos graus de liberdade apresentou valor igual a um, desta forma nota-se um bom ajustamento. O bom ajustamento do modelo é fundamental, devido ao fato de que os dados devem estar próximos da curva de progresso, pois é na mesma que é realizado os testes para saber se os tratamentos apresentam diferenças, ou seja, é importante para descrever exatamente o que está ocorrendo, para que as tomadas de decisões sejam realizadas de forma confiável.

Para o teste de hipótese dos efeitos fixos (Tabela 3), a interação tratamentos e dias não foi significativa, sendo a mesma não representada, pelo fato de não ter sentido ajustar uma interação, nas quais as curvas de progresso da doença que não se cruzam (Figura 2). Atrelado a este fato, pode-se inferir que ocorreria a perda dos graus de liberdade, e conseqüentemente não seria possível estimar com precisão. Os períodos fenológicos foram não significativos, ao contrário dos tratamentos que foram significativos.

Tabela 3. Teste de hipótese para os efeitos fixos

| Causas de variação | Severidade – 2014 | |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------|
| | Valor F | Pr>F |
| Tratamento | 28,49 | <0,0001* |
| Períodos fenológicos | 0,00 | 0,9972 ^{NS} |
| Tratamento x Períodos fenológicos | 0,08 | 0,9997 ^{NS} |

*, significativo, a nível de 5% de probabilidade; NS, não significativo, a nível de 5% de probabilidade.

Na safra temporã, a severidade no tratamento convencional não diferiu dos tratamentos nos quais foram efetuados aplicações a cada 7 e 14 dias. Os efeitos destes tratamentos não diferiram entre si e proporcionaram severidades intermediárias em comparação com as aplicações realizadas no aparecimento dos sintomas de mancha óleo e mofo (Tabela 4).

A severidade do míldio em comparações realizadas entre as aplicações realizadas no aparecimento dos sintomas de mancha óleo e do mofo apresentaram diferenças significativas. Apesar dos efeitos dos tratamentos terem diferido ao longo das avaliações o que resultou em diferentes níveis de severidade, os dados mostraram a eficiência no controle da doença em aplicações tardias pela utilização da nova cultivar.

Tabela 4. Contrastes ortogonais dos tratamentos na safra temporã de 2014

| Contrastes ¹ | Safra temporã 2014 | |
|-----------------------------|--------------------|----------------------|
| | Valor F | Pr>F |
| CONV vs. (P+7, P+14) | 0,42 | 0,5233 ^{NS} |
| (P+7, P+14) vs. (M_O, M_MO) | 94,53 | <0,0001* |
| P+7 vs. P+14 | 3,31 | 0,0772 ^{NS} |
| M_O vs. 6_M_MO | 10,53 | <0,0025* |

¹CONV=convencional, P+7= pulverização a cada 7 dias, P+14= pulverização a cada 14 dias, M_O= pulverização no aparecimento de mancha óleo, M_MO= pulverização no aparecimento de mancha mofo.

*, significativo, a nível de 5% de probabilidade; NS, não significativo, a nível de 5% de probabilidade.

A representação da epidemia, através das curvas de progresso do míldio, encontra-se na Figura 2 para cada tratamento. Neste estudo, as curvas de progresso da doença foram obtidas pela plotagem dos valores da severidade em função do tempo para estudar o desenvolvimento ou evolução do míldio nos diferentes tratamentos.

Os tratamentos correspondentes à pulverização no aparecimento de mancha óleo e de mofo (Figura 2) apresentaram maiores progressos da doença até o dia 25 de março e após este período a severidade estabilizou-se, não conferindo aumento na porcentagem de folhas doentes.

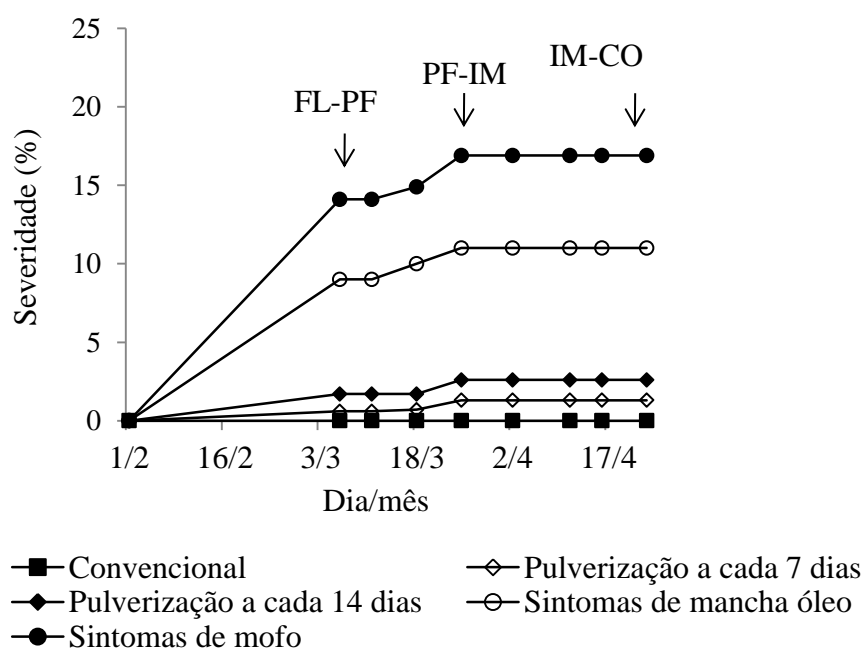


Figura 2. Curvas de progresso do míldio (*Plasmopara viticola*) em videira da cultivar BRS Vitória, expresso pela severidade em função do tempo na safra temporã.

Verificou-se que a sintomatologia do míldio nas folhas da cultivar BRS Vitória difere do padrão sintomatológico da doença nas cultivares mais susceptíveis, como as videiras do grupo Itália (*V. vinifera*) (Figura 4). Na cultivar BRS Vitória a expansão da lesão no tecido é mais lenta do que nas videiras originadas de *V. vinifera* e a esporulação é menos intensa, com necrosamento mais rápido do tecido colonizado, contendo assim a expansão da lesão (Figura 3).

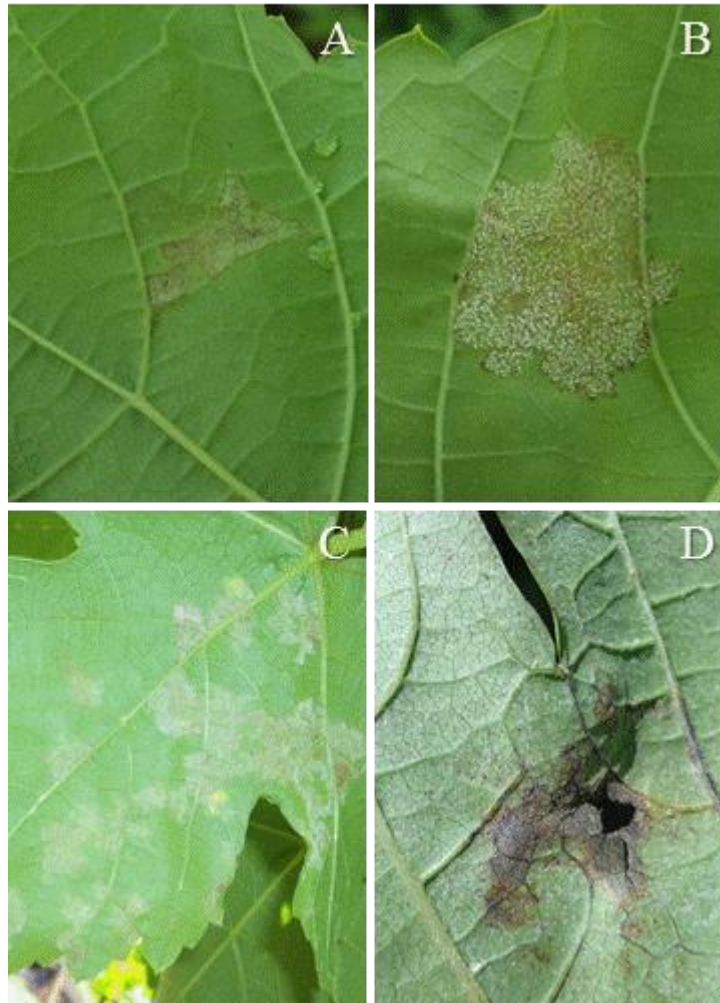


Figura 3. Sintomas e sinais de míldio em folhas de videira cv. BRS Vitória. A e B, sintomas e sinais iniciais; C, esporulação cobrindo parte do limbo foliar; e D, sintomas necróticos após a aplicação de fungicidas.

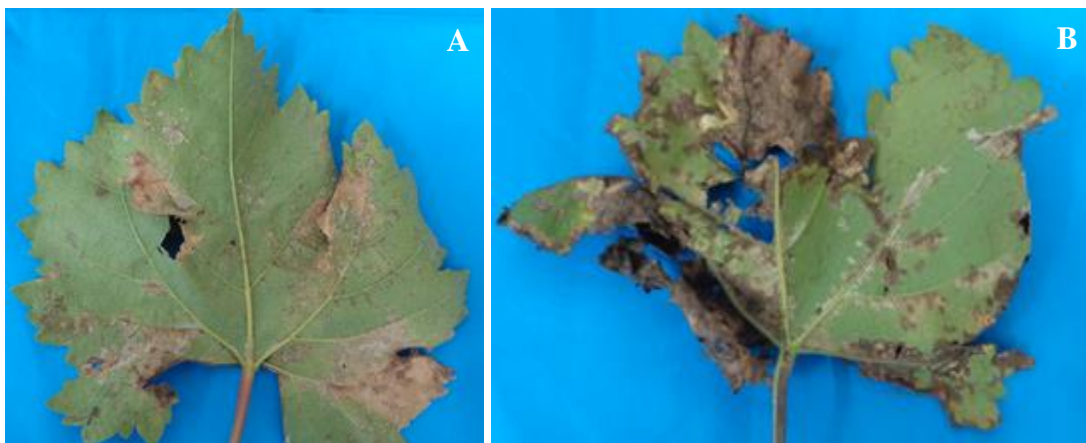


Figura 4. Sintomas e sinais de míldio em folhas de videira cv. Benitaka. A e B, esporulação e sintomas necróticos cobrindo parte do limbo foliar.

Outro aspecto de destaque da ‘BRS Vitória’ refere-se à boa tolerância à rachadura de bagas, na ocorrência de precipitação excessiva durante a fase de maturação da uva (MAIA et al., 2012). A safra temporã apresentou nos meses de março e abril que antecederam a colheita, precipitações acima do normal quando comparados com a série histórica da região, o que refletiu na rachadura de bagas e maior concentração ácida nos frutos da região, com exceção da cultivar ‘BRS Vitória’. Segundo GARRIDO e ANGELOTTI (2011), na fase final da maturação, um período seco do fruto é desejável para se produzir uvas com maior concentração de açúcar, com polpa mais firme, sem rachaduras, sem podridão e com “vida de prateleira” mais longa.

3.2 Análise da favorabilidade climática ao mórdio

A partir de uma série de dados de 30 anos (1983-2013) referentes à Marialva, observa-se que a temperatura mínima anual é de 17,7°C, a temperatura máxima anual é de 27,9°C e a precipitação total anual é de 1632,9 mm. O comportamento da chuva e da temperatura, bem como a identificação das épocas mais chuvosas, secas, quentes e frias da região são apresentados na Figura 5.

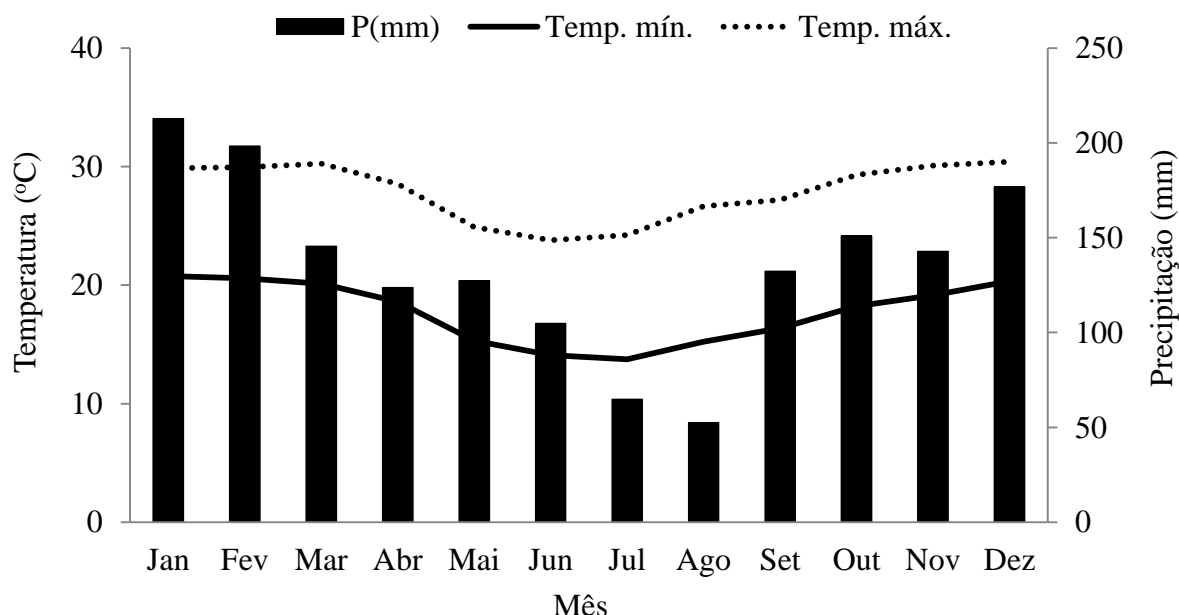


Figura 5. Valores normais mensais (período 1983-2013) de temperatura máxima (Tmáx), mínima (Tmín) e chuva para Marialva/PR.

3.2.1 Condições meteorológicas durante o período experimental

A caracterização das condições meteorológicas baseada na temperatura e chuva durante o período de agosto de 2013 a maio de 2014 é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5. Valores médios mensais de temperatura máxima e mínima, chuva e número de dias de chuva, em Marialva, no período de agosto de 2013 a maio de 2014

| Mês/Ano | T máx (°C) | T min (°C) | Chuva (mm) | NDC |
|----------|------------|------------|------------|-----|
| ago/2013 | 26,8 | 13,7 | 2,8 | 2 |
| set/2013 | 28,8 | 17,0 | 76,9 | 7 |
| out/2013 | 29,0 | 18,1 | 228,8 | 9 |
| nov/2013 | 30,5 | 17,7 | 76,6 | 9 |
| dez/2013 | 31,6 | 21,1 | 78,3 | 15 |
| jan/2014 | 31,7 | 21,1 | 188,3 | 18 |
| fev/2014 | 32,3 | 21,3 | 194,3 | 13 |
| mar/2014 | 30,1 | 19,9 | 340 | 11 |
| abr/2014 | 28,2 | 18,9 | 162,3 | 10 |
| mai/2014 | 24,9 | 16,0 | 123,9 | 8 |

T máx: Temperatura máxima; T min: Temperatura mínima e NDC: número de dias com chuva.

Os valores de temperatura máxima foram maiores quando comparados com a Figura 5, com exceção dos meses de outubro de 2013, março e abril de 2014 que apresentaram temperaturas inferiores ao da série histórica. As temperaturas mínimas foram superiores que as normais para o local, com exceção de agosto, outubro, novembro de 2013 e março de 2014.

Os dados de precipitação pluviométrica para os meses de agosto, setembro, novembro e dezembro de 2013 apresentaram chuvas abaixo do normal no quesito quantidade e número de dias com chuvas, por conseguinte desfavoreceu a ocorrência de míldio nas plantas na safra normal. Por sua vez, constatou-se na safra temporã uma redução não pronunciada das precipitações nos meses de janeiro e fevereiro. Por outro lado, em março a ocorrência de chuvas foi bem acima do normal, tal fato está diretamente relacionado ao aparecimento da doença na área experimental. Os meses de abril e maio apresentaram comportamento diferenciado ao apresentado no local com aumento e redução das precipitações respectivamente.

Conforme mencionado anteriormente, a doença foi constatada apenas no ensaio da safra temporã, que corresponde ao período de janeiro a maio. Este fato já conhecido por pesquisadores, técnicos e produtores, devido à influência dos fatores climáticos serem favoráveis ao aparecimento da doença, destacando-se maior frequência de chuvas e períodos de molhamento dos tecidos verdes das plantas associados com umidade relativa do ar elevada na safra de início de ano.

Comparando-se as condições climáticas nos períodos dos ensaios, a safra temporã apresentou maior frequência de dias chuvosos e de quantidade de chuva associados com umidade relativa do ar maior do que 95% (Figura 6). Durante os dois ensaios, a umidade relativa do ar foi superior na safra temporã, assim como a variável temperatura mínima que foi de aproximadamente 20°C, enquanto que na safra normal foi de 16,7°C.

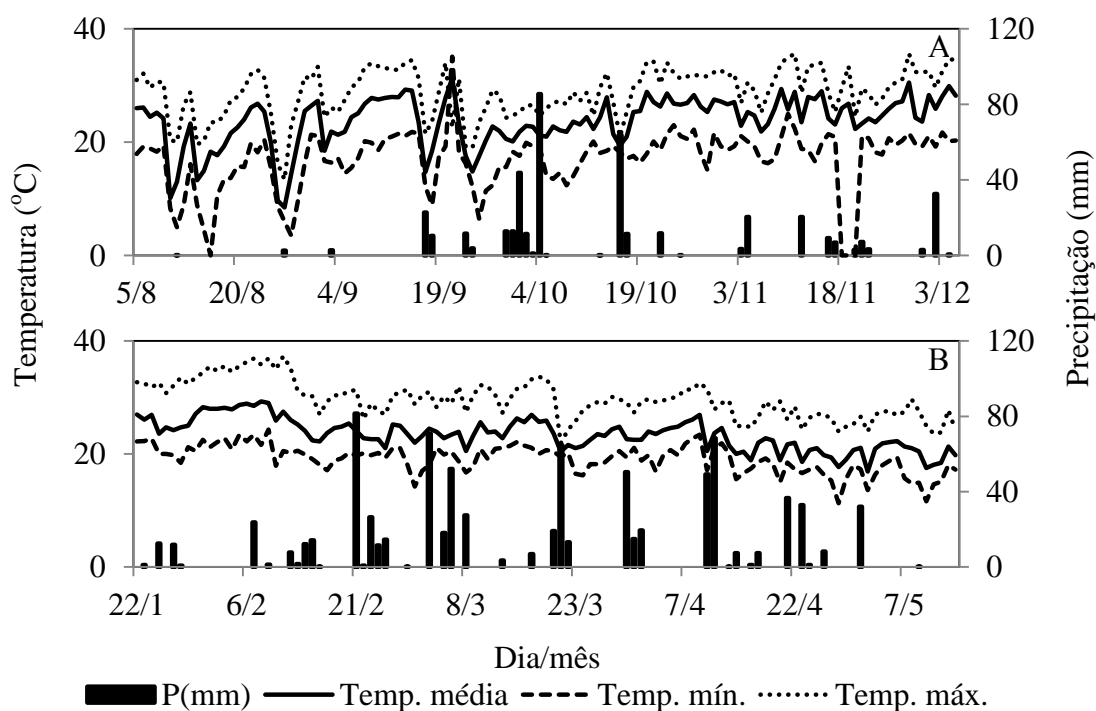


Figura 6. Temperaturas mínima, média, máxima (°C) e precipitação (mm) na safra normal de 2013 (A) e na safra temporã de 2014 (B).

Na safra normal, a ausência da intensidade do míldio mesmo com a ocorrência de umidade relativa do ar acima de 95%, molhamento foliar e chuvas favoráveis, deve-se a ocorrência em menor frequência destes fatores climáticos, com destaque para valores reduzidos de chuva acumulada, menor frequência de chuvas, ocorrência de dias com temperaturas mínimas diárias inferiores a 10°C; e menores médias de umidade

relativa do ar, o que implica na insuficiência de condições para desencadear epidemias da doença (Tabela 6).

As condições climáticas foram mais favoráveis ao início da infecção pelo míldio nas folhas na poda do dia 22/01, ou seja, no início do florescimento. A ocorrência de quatro dias consecutivos de chuvas, períodos prolongados de molhamento foliar e umidade relativa média do período precedente a infecção equivalente a 85% foram apropriadas à esporulação e à infecção pelo patógeno.

Durante a estação de produção, as epidemias da doença ocorrem em períodos com frequência de chuvas, umidade relativa elevada e prolongado molhamento de folhas e inflorescências. A intensidade do míldio depende da interação de um conjunto de fatores relacionados ao patógeno, fenologia da planta, umidade, temperatura, luminosidade e ocorrência de molhamento foliar (KENNELLY et al., 2007). A esporulação do patógeno não depende da presença de luz, sendo favorecida pela umidade relativa do ar elevada que, constantemente, ocorre durante a noite (LALANCETTE et al., 1988; YARWOOD, 1937). A chuva é considerada como o principal fator epidemiológico que afeta o ciclo de vida do patógeno. O desenvolvimento do fungo ocorre sob condições de temperatura de 18° a 25° C, exercendo o papel de acelerar ou retardar o desenvolvimento da doença (TAVARES et al., 2000; SÔNEGO et al., 2005). As flutuações na severidade do míldio da videira são determinadas ao longo dos anos pelas variáveis climáticas (ANGELOTTI et al., 2008).

No período do ensaio as condições meteorológicas foram favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, todavia este se manteve em níveis de intensidade baixos, em decorrência da tolerância apresentada pela cultivar.

Tabela 6. Variáveis climáticas nos períodos de maior suscetibilidade da cultura da videira a infecção e desenvolvimento do míldio (*Plasmopara viticola*)

| Descrição | Unidade | Período | | |
|---|---------|-------------------|---------------|------------------|
| | | 01 a 22 fevereiro | 23 a 01 março | 02 a 23 de abril |
| Temperatura Média ¹ | °C | 26,15 | 23,13 | 22,78 |
| Temperatura Mínima ¹ | °C | 20,60 | 19,09 | 18,91 |
| Temperatura Máxima ¹ | °C | 33,04 | 29,29 | 28,76 |
| Umidade Relativa ¹ | % | 60,45 | 83,03 | 77,61 |
| Umidade Relativa maior que 95% ² | h | 71,00 | 79,00 | 480,00 |
| Umidade Relativa maior que 95% no escuro ² | h | 52,00 | 53,00 | 342,00 |
| Molhamento foliar ² | h | 56,80 | 34,00 | 279,40 |
| Molhamento foliar no escuro ² | h | 38,00 | 24,00 | 195,00 |
| Precipitação ² | mm | 155,20 | 39,10 | 502,30 |

¹ Médias diárias

² Acumulada no período

Apesar de serem escassos os trabalhos referentes à influência de fatores climáticos sobre o progresso de míldio da videira no Brasil; Genta et al. (2010), estudou a eficiência da cobertura de plástico e da tela antigranizo, relacionadas ou não a programas de aplicação de fungicidas, no controle de míldio na cultivar de uva de mesa BRS Clara, sob condições de produção das safras normal e temporã do norte do Paraná, e analisou a influência de variáveis meteorológicas no progresso da doença. Foi constatado que independentemente do sistema de cobertura utilizado, o míldio ocasiona mais danos na safra temporã do que na safra normal. A cobertura plástica promoveu a

redução da severidade e do número de pulverizações de fungicidas em até 75% quando comparado à tela antigranizo no controle do míldio.

Apesar de conferir efeito protetivo às plantas em relação à ocorrência de doenças fúngicas, a plasticultura apresenta alto custo de implantação. Outra desvantagem relatada por Pedro Júnior et al. (2010), diz respeito aos elevados índices de fungicidas nas bagas, depreciando a qualidade do cacho.

Desta forma, a utilização de variedades resistentes, imunes ou tolerantes constitui o método ideal para controlar doenças de plantas, pelo fato de não onerar diretamente o custo de produção e não apresentar riscos (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996). E neste contexto, o presente estudo contribui para a viabilização do cultivo da cultivar BRS-Vitória no Paraná, a qual por ser menos dependente do uso de fungicidas químicos permite o estabelecimento de um sistema de produção de uva de mesa mais sustentável do ponto de vista social, econômico e ambiental.

4 CONCLUSÃO

- a) Nas condições de produção de uva de mesa do Norte do Paraná, a cultivar BRS Vitória apresenta menor severidade de míldio em relação a cultivar Benitaka.
- b) Na cultivar BRS Vitória, o controle do míldio pode ser iniciado nos primeiros sintomas de mancha óleo ou mofo.

5 REFERÊNCIAS

ANZANELLO, R. et al. Uso da poda seca e da poda verde para obtenção de duas safras por ciclo vegetativo em três cultivares de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 196-203, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010029452010000100022&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 5 maio, 2010. doi: 10.1590/S0100-29452010005000027.

BERGAMIN FILHO, A. & AMORIM, L. **Doenças tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo. Ceres. 1996.

BUFFARA, C.R.S ; ANGELOTTI, F. ; VIEIRA, R.A ; BOGO, A. ; TESSMANN, D.J.; BEM, B.P.D. Elaboration and validation of a diagrammatic scale to assess downy mildew severity in grapevine. **Ciência Rural** (UFSC. Impresso), Santa Maria, v. 44, p. 1384-1391, 2014.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, Ponta Grossa, v. 1, n. 2, p. 18-24, 2001.

CAVIGLIONE, J.H., KIIHL, L.R.M., CARAMORI, P.H. et al. Cartas climáticas do Paraná – edição 2000, versão 1.0. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 2000.

GARRIDO, L.R.; ANGELOTTI, F. **Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças da videira no Brasil**. In: GHINI, R. et al. (Ed.). Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.331-356, 2011.

GENTA, W.; TESSMANN, D.J.; ROBERTO, S.R.; VIDA, J.B.; COLOMBO, L.A. SCAPIN, C.R.; RICE, W.S.; CLOVIS, L.R. Manejo de míldio no cultivo protegido de videira de mesa 'BRS Clara'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.1388-1395, 2010.

KENNELLY, M. M.; GADOURY, D. M.; WILCOX, W. F.; MAGAREY, P. A.; SEEM, R. C. Primary infection, lesion productivity, and survival of sporangia in the grapevine downy mildew pathogen, *Plasmopara viticola*. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 97, n. 4, p. 512-522, 2007.

KISHINO, A.Y.; CARVALHO, S.L.C.; ROBERTO, S.R. **Viticultura tropical: o sistema de produção do Paraná**. Londrina: IAPAR, 2007. 366p.

LALANCETTE, N.; ELLIS, M.A.; MADDEN, L.V. Development of an infection efficiency model for *Plasmopara viticola* on american grape based on temperature and duration of leaf wetness. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, p. 794-800, 1988.

MADDEN, L.V.; ELLIS, M.A.; LALANCETTE, N.; HUGHES, G.; WILSON, L.L. Evaluation of a disease warning system for downy mildew of grapes. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, p.549-554, 2000.

MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P. S.; CAMARGO, U. A.; SOUZA, R. T. de; FAJARDO, T. V. M.; NAVES, R. de L.; GIRARDI, C. L. **‘BRS Vitória’: nova cultivar de uva de mesa sem sementes com sabor especial e tolerante ao míldio**. Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 126. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2012.

NAVES, R.L.; TESSMANN, D.J.; GARRIDO, L.R.; SÔNEGO, O.R. **Doenças e seu controle**. Embrapa Uva e Vinho. Sistemas de produção, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/MesaNorteParana/doencas.htm/>>. Acesso em: 22 abr. 2014

PEDRO JÚNIOR, M.J.; HERNANDES, J.L.; ROLIM, G.S. Sistema de condução em Y com e sem cobertura plástica: microclima, produção, qualidade do cacho e ocorrência de doenças fúngicas na videira 'Niagara Rosada'. **Bragantia**, Campinas, v.70, n.1, p. 228-233, 2011.

SAS Institute, SAS (Statistical Analysis System). User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. 129p. 2003.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. (Circular Técnico, 56). 2005.

SHIMANO, I. S. H. ; SENTELHAS, P.C. . Risco climático para ocorrência de doenças fúngicas da videira no Sul e Sudeste do Brasil. **Revista Ciência Agronômica** (UFC. Online), Fortaleza, v. 44, p. 527-537, 2013.

TAVARES, S. C. C. H.; LIMA, M. F.; MELO, N. F. Principais doenças da videira e alternativas de controle. In: LEÃO, P. C. de S.; SOARES, J. M. (Ed.). *A Viticultura no Semi-Árido Brasileiro*. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. p. 246-296.

TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B.; GENTA, W.; KISHINO, A. Y. Doenças e seu manejo. In: Antonio Y. Kishino; Sérgio, L. C. Carvalho; Sérgio R. Roberto. (Org). **Viticultura Tropical – O sistema de Produção do Paraná**. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), p. 25-293, 2007.