

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DE CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CONTROLE BIOLÓGICO DE “*Cylindrocarpon*” sp. E
Fusarium sp. EM PORTA-ENXERTOS DE VIDEIRA
UTILIZANDO *Bacillus* sp.**

ALESSANDRA RUSSI

CAXIAS DO SUL
2018

ALESSANDRA RUSSI

**CONTROLE BIOLÓGICO DE “*Cylindrocarpon*” sp.
E *Fusarium* sp. EM PORTA-ENXERTOS DE VIDEIRA
UTILIZANDO *Bacillus* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós –
graduação em Biotecnologia da Universidade
de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau
de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Joséli Schwambach

Co-orientador: Prof. Dr. Marcus André Kurtz Almança

CAXIAS DO SUL
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

R969c Russi, Alessandra
Controle biológico de "*Cylindrocarpon*" sp. e *Fusarium* sp. em porta-
enxertos de videira utilizando *Bacillus* sp. / Alessandra Russi. – 2018.
99 f. : il. ; 30 cm
Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2018.
Orientação: Joséli Schwambach.
Coorientação: Marcus André Kurtz Almança.
1. Uvas - Cultivo. 2. Fitopatologia. 3. Fungos - Controle biológico. 4.
Bactérias. I. Schwambach, Joséli, orient. II. Almança, Marcus André
Kurtz, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 634.8

ALESSANDRA RUSSI

**CONTROLE BIOLÓGICO DE “*Cylindrocarpon*” sp.
E *Fusarium* sp. EM PORTA-ENXERTOS DE VIDEIRA
UTILIZANDO *Bacillus* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós –
graduação em Biotecnologia da Universidade
de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau
de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Joséli Schwambach

Co-orientador: Prof. Dr. Marcus André Kurtz Almança

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 31 DE JULHO DE 2018.

Orientadora: Profa. Dra. Joséli Schwambach

Co-orientador: Prof. Dr. Marcus André Kurtz Almança

Profa. Dra. Camille Eichelberger Granada

Profa. Dra. Marlove Fátima Brião Muniz

Profa. Dra. Neiva Monteiro de Barros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 VIDEIRA E PORTA-ENXERTOS	13
2.1.1 Porta-enxerto Paulsen 1103	16
2.1.2 Porta-enxerto SO4	17
2.2 DECLÍNIO E MORTE DA VIDEIRA	18
2.2.1 Pé-preto.....	19
2.2.2 Fusariose.....	24
2.3 CONTROLE DE DOENÇAS FÚNGICAS.....	27
2.3.1 Gênero <i>Bacillus</i> no controle biológico	28
2.3.1 Ação na promoção do crescimento e da produtividade	30
2.3.3 Ação na resistência sistêmica induzida.....	30
2.3.4 Ação antimicrobiana	32
2.4 OBTENÇÃO DE MATERIAL VEGETATIVO SADIO	33
2.4.1 Termoterapia com água quente.....	34
2.4.2 Micropropagação	34
3. OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4. CAPÍTULO 1	37
4.1 INTRODUÇÃO.....	37
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.2.1 Agente de controle biológico e isolados fúngicos	39

4.2.2 Ensaio de antagonismo <i>in vitro</i> : crescimento micelial	40
4.2.3 Ensaio de antagonismo <i>in vitro</i> : germinação de conídios	40
4.2.4 Ensaio <i>in vivo</i> em estacas	41
4.2.5 Ensaio <i>in vivo</i> em mudas micropropagadas.....	42
4.2.6 Análise estatística	42
4.3 RESULTADOS	43
4.3.1 Ensaio do antagonismo <i>in vitro</i>	43
4.3.2 Ensaio <i>in vivo</i> em estacas	45
4.3.3 Ensaio <i>in vivo</i> em mudas micropropagadas.....	48
4.4 DISCUSSÃO	50
4.5 REFERÊNCIAS	54
4.6 MATERIAL SUPLEMENTAR (MS1).....	58
4.7 MATERIAL SUPLEMENTAR (MS2).....	59
5. CAPÍTULO 2	60
5.1 INTRODUÇÃO.....	60
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	62
5.2.1 Agente de controle biológico e isolados fúngicos	62
5.2.2 Ensaio de antagonismo <i>in vitro</i> : crescimento micelial	62
5.2.3 Ensaio de antagonismo <i>in vitro</i> : germinação de conídios	63
5.2.4 Ensaio <i>in vivo</i> em estacas	63
5.2.5 Ensaio <i>in vivo</i> em mudas micropropagadas.....	64
5.2.6 Análise estatística	65
5.3 RESULTADOS	65
5.3.1 Ensaio de antagonismo <i>in vitro</i>	65
5.3.2 Ensaio <i>in vivo</i> em estacas	68
5.3.3 Ensaio <i>in vivo</i> em mudas micropropagadas.....	68

5.4 DISCUSSÃO	70
5.5 REFERÊNCIAS	74
5.6 MATERIAL SUPLEMENTAR (MS1).....	79
5.7 MATERIAL SUPLEMENTAR (MS2).....	80
6. DISCUSSÃO GERAL	81
7. CONCLUSÕES.....	86
8. PERSPECTIVAS	87
REFERÊNCIAS	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características das espécies pertencentes ao gênero *Vitis* mais usadas para o desenvolvimento de porta-enxertos.....15

Tabela 2. Resumo dos aspectos morfológicos distintivos dos gêneros *Cylindrocarpon/Ilyonectria*, *Campylocarpon* e *Cylindrocladiella* associados com o pé-preto na videira.....21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Áreas vitivinícolas no Brasil.	14
Figura 2. Características morfológicas das folhas e ramos jovens do porta-enxerto Paulsen 1103.	16
Figura 3. Características morfológicas das folhas e ramos jovens do porta-enxerto SO4.	17
Figura 4. Colônias de fungos causadores do pé-preto em meio de cultura BDA (batata-dextrose- ágar).	20
Figura 5. Conídios e clamidósporos fúngicos.	22
Figura 6. Sintomas do pé-preto na videira.	23
Figura 7. Aspectos morfológicos de <i>Fusarium</i> sp. A) Macro e microconídios. B) Colônia fúngica em meio BDA.	25
Figura 8. Sintoma da fusariose com escurecimento do xilema em corte transversal no tronco da videira.	25
Figura 9. Fatores influenciando a dinâmica e densidade de bactérias endofíticas e mecanismos de ação contra fitopatógenos.	29
Figura 10. Ilustração do mecanismo de resistência sistêmica induzida promovido por <i>B. subtilis</i>	31

RESUMO

A viticultura brasileira vem se expandindo para diferentes regiões e destacando-se no cenário econômico nacional. Apesar dos significativos avanços ocorridos nos últimos anos, a cultura tem sofrido sérios problemas com a redução da produtividade, declínio e morte precoce de videiras. Muitos são os fatores envolvidos no declínio da videira incluindo o manejo do solo e da cultura, estresses abióticos, ocorrência de pragas, doenças virais e fúngicas. Nesse contexto, os fungos fitopatogênicos são considerados os principais responsáveis pelos danos ocasionados à cultura e pela necessidade de reconversão de vinhedos. Sendo assim, torna-se essencial a utilização de mudas com qualidade agrônômica, fisiológica e fitossanitária. Contudo, mudas sadias podem ser reinfetadas quando submetidas a condições ambientais adversas, tais como solos contaminados com fitopatógenos. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de *Bacillus* sp. linhagem F62 no biocontrole *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium* sp. e "*Cylindrocarpon*" sp., visto que ambos são causadores de sérias doenças na videira e têm sido objeto de estudos em diferentes regiões vitivinícolas no mundo, com destaque para "*Cylindrocarpon*" sp., causador do pé-preto na videira. Os ensaios *in vitro* consistiram na avaliação do antagonismo por compostos voláteis e compostos difusíveis (cultivo pareado), bem como, na avaliação da inibição da germinação de conídios. Os ensaios *in vivo* foram realizados em estacas e em mudas micropropagadas dos porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e SO4, em casa de vegetação. No ensaio de cultivo pareado, a bactéria inibiu o crescimento micelial de cinco isolados de "*Cylindrocarpon*" sp., variando de 61,09% a 69,98% e de quatro isolados de *Fusarium* sp. variando de 35,35% a 63,62%. No ensaio de antagonismo por compostos voláteis não houve diferença significativa em relação ao controle para ambos os fitopatógenos. Em relação à germinação de conídios, verificou-se que tanto a suspensão bacteriana quanto o filtrado da cultura foram eficazes na inibição da germinação de esporos fúngicos. No experimento *in vivo* em estacas de Paulsen 1103, diferentemente das estacas de SO4, não foi verificada diferença estatisticamente significativa na promoção do crescimento em relação ao controle. No entanto, *Bacillus* sp. F62 reduziu o percentual de reisolamento de "*Cylindrocarpon*" sp. para 27,9% em SO4 e 10,3% em Paulsen 1103, em relação ao controle. O tratamento preventivo com *Bacillus* sp. F62 reduziu, ainda, o reisolamento de *Fusarium* sp. para 17,6% em SO4. Em mudas micropropagadas de ambos os porta-enxertos tratadas com suspensão de *Bacillus* sp. F62 foi verificado maior vigor e melhor desenvolvimento vegetativo em relação ao controle. A rizobactéria reduziu o percentual de reisolamento de *Fusarium* sp. em 52,4% em mudas micropropagadas de SO4. Além disso, *Bacillus* sp. F62 reduziu o percentual de reisolamento de "*Cylindrocarpon*" sp. em 36,0%, em mudas micropropagadas de SO4 e Paulsen 1103. Conclui-se que *Bacillus* sp. F62 foi eficaz no biocontrole *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium* sp. e "*Cylindrocarpon*" sp., além de estimular o crescimento e o desenvolvimento de mudas micropropagadas de ambos os porta-enxertos de videira avaliados neste estudo.

Palavras-chave: *Fusarium* sp., *Bacillus* sp., "*Cylindrocarpon*" sp., biocontrole, promoção de crescimento de plantas

ABSTRACT

The Brazilian viticulture has been expanding to different regions and standing out in the national economy. Despite significant advances in recent years, the culture has suffered serious problems with reduced productivity, decline and young death of vines. Many factors are involved in the grapevine decline including soil and crop management, abiotic stresses, pests, viral and fungal diseases. In this context, phytopathogenic fungi are considered the main responsible for damage to the crop and for the need to replant vineyards. Therefore, the use of propagative material with agronomic, physiological and phytosanitary quality is essential. However, healthy plant material may be reinfected when subjected to adverse environmental conditions, such as soils contaminated with phytopathogens. The present study aimed to evaluate the potential of *Bacillus* sp. strain F62 in the *in vitro* and *in vivo* biocontrol of *Fusarium* sp. and "*Cylindrocarpon*" sp. These phytopathogens cause serious diseases on grapevine and have been the subject of studies in many wine regions in the world, especially "*Cylindrocarpon*" sp., which causes black-foot on grapevine. *In vitro* experiments consisted of the evaluation of the antagonism by volatile and diffusible compounds (paired culture), as well as, the evaluation of the inhibition of conidial germination. *In vivo* experiments were performed on cuttings and on micropropagated grapevine rootstocks 1103P and SO4, under greenhouse conditions. In the paired culture assay, the bacterium inhibited the mycelial growth of five isolates of "*Cylindrocarpon*" sp., ranging from 61.09% a 69.98% and four isolates of *Fusarium* sp., ranging from 35.35% to 63.62%. In antagonism assay by volatile compounds there was no significant difference in relation to the control for both phytopathogens. Regarding the germination of conidia, it was verified that the bacterial suspension and the filtrate metabolites were effective in inhibiting the germination of fungal spores. In the *in vivo* experiment in cuttings of 1103P, unlike the cuttings of SO4, no statistically significant difference in growth promotion was verified in relation to the control. However, *Bacillus* sp. F62 reduced the percentage of re-isolation of "*Cylindrocarpon*" sp. to 27.9% in SO4 and 10.3% in 1103P, in relation to the control. Preventive treatment with *Bacillus* sp. F62 also reduced the percentage of re-isolation of *Fusarium* sp. to 17.6% in SO4. Micropropagated rootstocks treated with *Bacillus* sp. F62 was found to have greater vigor and better vegetative development compared to control. The rhizobacteria reduced the incidence of *Fusarium* sp. in 52.4% in micropropagated rootstock SO4. In addition, *Bacillus* sp. reduced the incidence of "*Cylindrocarpon*" sp. in 36.0% on micropropagated plants of SO4 and Paulsen 1103. In summary, *Bacillus* sp. F62 was effective in the *in vitro* and *in vivo* biocontrol of *Fusarium* sp. and "*Cylindrocarpon*" sp. and also stimulated the growth and development of micropropagated plants of both grapevine rootstocks evaluated in this study.

Keywords: *Fusarium* sp., *Bacillus* sp., "*Cylindrocarpon*" sp., biocontrol, plant growth promotion

1. INTRODUÇÃO

A vitivinicultura brasileira vem crescendo em importância econômica e comercial e devido a isso tem se expandindo para diferentes regiões do país. Desde regiões vitivinícolas tradicionais como os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, até em regiões de clima tropical como Submédio do Vale do Rio São Francisco, Norte do Paraná, Noroeste de São Paulo, Norte de Minas Gerais e região Centro Oeste. Além disso, a produção de uvas no Brasil vem crescendo devido à diversificação das variedades cultivadas, sendo o Rio Grande do Sul principal estado produtor de uvas.

Nesse cenário, a Serra Gaúcha, localizada no estado do Rio Grande do Sul, é a principal região produtora de uvas e vinhos do Brasil. No entanto, o clima dessa região é caracterizado pelo alto índice pluviométrico e pela elevada umidade relativa do ar; condições essas, que favorecem o desenvolvimento de fitopatógenos.

As pragas e as doenças constituem os maiores obstáculos à expansão vitícola, afetando tanto a quantidade como a qualidade do produto final, sendo consideradas limitantes ao desenvolvimento da atividade. Somado a isso, a cultura vem sofrendo com a baixa qualidade do material vegetal destinado à implantação de vinhedos. Assim, a produção de mudas de qualidade é considerada uma prática estratégica, visto que a implantação de novos vinhedos ou a reconversão da matriz produtiva somente é plena são utilizadas mudas agregadas com inovações tecnológicas. A obtenção de mudas isentas dos principais fitopatógenos com características agronômicas e morfológicas adequadas é condição essencial para a viabilidade econômica e para a competitividade frente aos concorrentes externos, garantindo a expansão e o fortalecimento da cultura.

No entanto, o emprego de mudas de qualidade e isentas das principais doenças de importância comercial não é suficiente para garantir o estabelecimento de um vinhedo, visto que muitas vezes o solo abriga fitopatógenos causadores de doenças de raízes e tronco, sendo esses os principais agentes causadores do declínio e da morte precoce de plantas. Devido à complexidade desses agroecossistemas, deve-se priorizar o controle integrado de pragas e doenças, ou seja, medidas baseadas no uso racional de defensivos químicos entre outras estratégias. O manejo integrado de pragas e doenças possibilita a obtenção de produtos seguros, com alta qualidade, rastreabilidade e com o menor impacto ambiental possível.

Além disso, muitas das doenças causadas por fitopatógenos são ocasionadas pela redução na biodiversidade de organismos benéficos existentes no ambiente. Isso ocorre devido às práticas empregadas na agricultura convencional, como a aplicação inadequada ou uso de

defensivos químicos não seletivos. Por outro lado, muitos fungos que afetam as raízes e o tronco da videira não possuem controle químico efetivo. Assim, o emprego de mudas sadias associadas à inoculação de agentes de controle biológico, de forma preventiva, representa uma alternativa de controle de fitopatógenos. O controle biológico é uma importante ferramenta para o manejo de doenças fúngicas. Esse tipo de controle pode ser obtido pela manipulação do ambiente, de forma a favorecer a população dos micro-organismos benéficos presentes, ou pela introdução massal de antagonistas previamente selecionados.

Considerando o exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica da rizobactéria *Bacillus* sp. linhagem F62 sobre o crescimento micelial e a germinação de conídios fúngicos e no biocontrole e prevenção *in vivo* de "*Cylindrocarpon*" sp. e *Fusarium* sp. em porta-enxertos de videira.

A presente dissertação está subdividida em cinco partes. Inicialmente é apresentada uma revisão bibliográfica sobre a videira e seus principais porta-enxertos, um panorama geral sobre o declínio de vinhedos, doenças fúngicas envolvidas, bem como estratégias para obtenção de material vegetativo sadio e de qualidade. Em seguida, são descritos os objetivos gerais e específicos que motivaram o presente estudo. Posteriormente, são apresentados dois capítulos que representam dois artigos científicos a serem submetidos à publicação. No Capítulo 1, intitulado "Biocontrole de "*Cylindrocarpon*" sp. em porta-enxertos de videira empregando *Bacillus* sp. F62" é abordada a ação bacteriana no biocontrole *in vitro* e *in vivo* de "*Cylindrocarpon*" sp., em estacas e mudas micropropagadas de dois porta-enxertos da videira: Paulsen 1103 e SO4. No Capítulo 2, intitulado "*Bacillus* sp. F62 no biocontrole de *Fusarium* sp. e na promoção do crescimento do porta-enxerto de videira SO4" é avaliado o potencial da bactéria *Bacillus* sp. F62 no controle biológico de *Fusarium* sp. apenas no porta-enxerto de videira sensível SO4. Finalmente, é realizada uma discussão geral dos resultados sobre o biocontrole da fusariose e do pé-preto e na promoção do crescimento de estacas e mudas micropropagadas em dois porta-enxertos da videira que conduziram às conclusões e perspectivas futuras referentes ao tema.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 VIDEIRA E PORTA-ENXERTOS

O gênero *Vitis* é o mais importante da família Vitaceae, sendo constituído por 40 a 60 espécies na Ásia, aproximadamente 25 espécies na América do Norte (dentre as quais, destaca-se *Vitis labrusca*) e uma única espécie na Europa (*Vitis vinifera*). Essa última é a principal espécie de videira cultivada no mundo; enquanto as demais espécies são usadas em cruzamentos para obtenção de porta-enxertos e como fonte de resistência. Estima-se a existência de aproximadamente 6.000 cultivares de *V. vinifera* (Alleweldt & Dettweiler, 1994), das quais menos de 400 possuem importância comercial (Galet, 2000).

No Brasil, as videiras americanas foram base para o desenvolvimento da viticultura, com destaque para as cultivares Isabel e Bordô destinadas à elaboração de vinhos de mesa e Niágara destinada ao consumo *in natura*. O cultivo de videiras europeias visando à elaboração de vinhos finos e espumantes é menos expressivo e baseia-se na utilização de cultivares como Chardonnay, Moscato, Merlot, Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc (Mello, 2016).

A vitivinicultura é uma atividade com significativa importância socioeconômica, abrangendo regiões de clima temperado e subtropical como Serra Gaúcha e Campanha, no Rio Grande do Sul; região do Vale do Rio do Peixe, em Santa Catarina e norte do Paraná. Atualmente, a videira encontra-se adaptada às mais diversas condições edafoclimáticas existentes no país e, a viticultura tem se expandido para regiões de clima tropical como o Sudeste de São Paulo, o Sul de Minas Gerais e o Vale do Submédio do São Francisco, na região Nordeste (Protas, 2009) (Figura 1).

No ano de 2015 foram produzidas 1.499.353 toneladas de uvas no Brasil, com destaque para o Estado do Rio Grande do Sul que foi responsável por 57% desse total (Mello, 2016). A Serra Gaúcha é a principal região produtora de uvas desse estado e caracteriza-se pelo cultivo em pequenas propriedades, com média de 15 ha de área total, reduzido uso de mecanização devido à topografia acidentada e predomínio da mão de obra familiar (Lazzarotto *et al.*, 2016).



Figura 1. Áreas vitivinícolas no Brasil.

Fonte: Embrapa/Ibravin.

Atualmente, a videira é cultivada mediante o uso de porta-enxertos. Essa prática foi adotada como forma de defesa contra a filoxera, praga limitante ao desenvolvimento de cultivares de *V. vinifera*. A filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch, 1854) pode atacar a parte aérea ou as raízes da videira, contudo, os maiores prejuízos são observados quando o inseto se desenvolve em raízes da espécie *V. vinifera* cultivadas em pé-franco (Ollat *et al.*, 2016). Além disso, o local de ataque serve como porta de entrada para fungos de solo causadores de podridões de raízes, podendo culminar com a morte da planta (Botton *et al.*, 2004).

O uso de porta-enxertos possibilita melhor adaptação ao solo, resistência a fungos, nematoides, pragas e estresses abióticos; bem como, a obtenção de vigor adequado à cultura (Camargo, 2006; Tandonnet *et al.*, 2010). A resistência dos porta-enxertos a doenças e pragas é atribuída à rápida lignificação e à grande quantidade de tanino em tecidos corticais e vasos medulares (Ollat *et al.*, 2016). No mundo, existem aproximadamente oitenta porta-enxertos que podem ser empregados no cultivo da videira. A maior parte deles foi obtido das espécies *V. riparia*, *V. rupestris* e *V. berlandieri*, na segunda metade do século XIX, durante o auge na infestação por filoxera na Europa (Ollat *et al.*, 2016). Desse total, apenas dois não são híbridos: Riparia Gloire de Montpellier (*V. riparia*) e Rupestris du Lot ou St. Georges (*V. rupestris*).

A seguir, na Tabela 1, podem ser visualizadas as principais espécies de videira empregadas em cruzamentos para obtenção de porta-enxertos e suas respectivas características.

Tabela 1. Principais características das espécies pertencentes ao gênero *Vitis* mais usadas para o desenvolvimento de porta-enxertos.

Características	<i>Vitis rupestris</i>	<i>Vitis riparia</i>	<i>Vitis berlandieri</i>
Precocidade	Média a tardia	Muito precoce	Tardia
Vigor	Alto a muito alto	Baixo a médio	Alto
Resistência à seca	Média	Baixa	Alta
Resistência à salinidade	Média	Muito baixa	Média
Resistência à filoxera	Alta	Alta	Muito alta
Resistência a nematoides	Variável	Variável	Sensível
Enxertia	Muito boa	Muito boa	Ruim

Fonte: adaptado de Ollat *et al.* (2016).

Apesar da grande variedade de porta-enxertos existente, apenas alguns são amplamente empregados a nível mundial: os membros da família *Berlandieri-Riparia* (SO4, 5BB) e da família *Berlandieri-Rupestris* (110R, Paulsen 1103 e 140Ru) (Ollat *et al.*, 2016). Dentre esses, a família *Riparia-Rupestris* caracteriza-se pela alta resistência à filoxera, bom enraizamento, vigor variando de baixo a médio. Além disso, esses porta-enxertos são adequados para solos férteis, possibilitando a obtenção de frutos de alta qualidade. A família *Riparia-Berlandieri* é altamente resistente à filoxera, apresenta média tolerância à seca, vigor de médio a alto e variável capacidade de enraizamento e pegamento de enxertia. Finalmente, a família *Rupestris-Berlandieri* destaca-se pela alta tolerância à seca, baixo enraizamento e pelo grande vigor conferido à copa (Ollat *et al.*, 2016).

Atualmente, um grande número de porta-enxertos encontra-se disponível aos produtores, porém cada um deles apresenta vantagens e desvantagens. Os dois principais porta-enxertos empregados no Rio Grande do Sul serão descritos a seguir.

2.1.1 Porta-enxerto Paulsen 1103

Paulsen 1103 é resultante do cruzamento *V. berlandieri* x *V. rupestris*, conhecido popularmente como piopa ou piopeta. Esse porta-enxerto é bastante vigoroso, enraíza facilmente, apresenta boa pega de enxertia e afinidade com diversas cultivares de copa. Paulsen 1103 é um dos porta-enxertos mais empregados em regiões vitícolas do Sul do Brasil (Camargo *et al.*, 2011).

Suas principais características ampelográficas são ramos vermelhos, com extremidades bronzeadas, assim como suas folhas jovens; as folhas são inteiras, mais largas que compridas, reniformes, com limbo verde-claro, liso, pubescente na face inferior, com seio peciolar em “V” bem aberto (Camargo & Dias, 1986) (Figura 2).

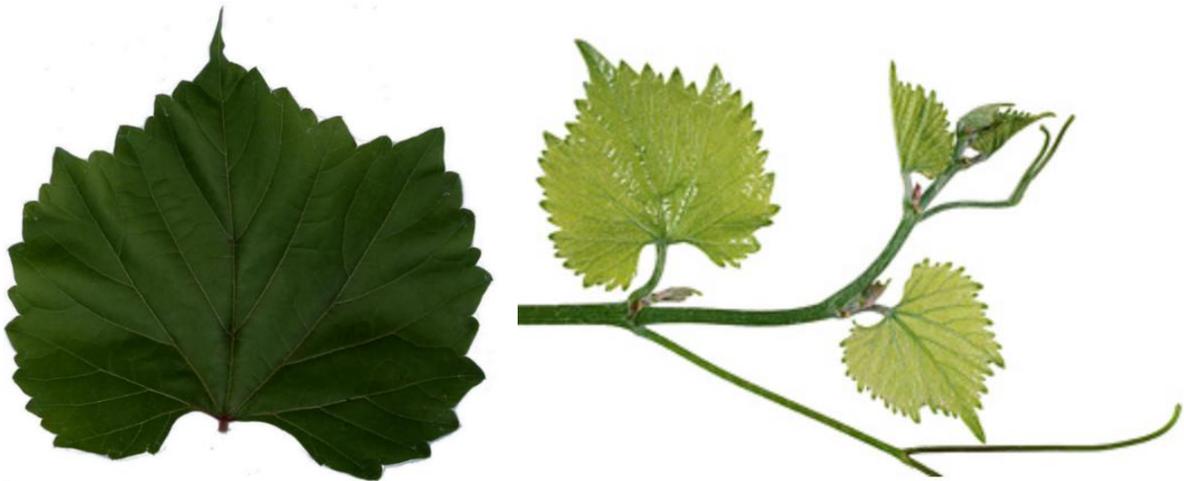


Figura 2. Características morfológicas das folhas e ramos jovens do porta-enxerto Paulsen 1103.

Fonte: Banco de imagens da Embrapa Uva e Vinho (Lucas Sinigaglia).

Paulsen 1103 caracteriza-se, ainda, pela baixa resistência à antracnose e nematoides; alta resistência ao míldio, fusariose e filoxera na forma radícula (Camargo & Dias, 1986). Ele apresenta raiz pivotante e tem boa adaptação a solos argilosos e compactos, com fertilidade de baixa à média. Esse porta-enxerto é utilizado principalmente em associação com cultivares americanas e híbridas (Camargo, 2006).

2.1.2 Porta-enxerto SO4

Porta-enxerto resultante do cruzamento *V. berlandieri* x *V. riparia* e introduzido no Brasil na década de 70. Caracteriza-se pelo médio vigor, pela resistência à seca e aos solos com alto teor de alumínio, bom pegamento e rápido desenvolvimento (Silva, 2008).

As principais características ampelográficas desse porta-enxerto são ramos vermelhos, pubescentes sobre os nós, com extremidades lanosas e esbranquiçadas e com bordos rosados; folhas inteiras, com limbo plano, pubescente na face inferior, seio peciolar em “U”; inflorescências grandes (Camargo & Dias, 1986) (Figura 3).

Apresenta sensibilidade à fusariose e ao dessecamento da ráquis, em virtude do desequilíbrio nutricional ocasionado pelo balanço inadequado entre potássio, cálcio e magnésio (Camargo, 2006; Riaz *et al.*, 2007; Camargo *et al.*, 2011). Esse porta-enxerto é muito utilizado na Campanha Gaúcha, sendo recomendado para produção de uvas finas destinadas à vinificação (Mello, 2016).



Figura 3. Características morfológicas das folhas e ramos jovens do porta-enxerto SO4.

Fonte: Lucas Sinigaglia.

2.2 DECLÍNIO E MORTE DA VIDEIRA

O declínio e morte precoce de videiras vêm crescendo com a expansão da viticultura mundial, causando perdas econômicas e comprometendo a produção vitícola (Gramaje & Armengol, 2011). O declínio da videira é uma síndrome, sem etiologia definida que ocasiona o definhamento e a baixa performance dos vinhedos. No Brasil, esse problema também tem sido relatado causando debilitação progressiva e morte de plantas (Garrido *et al.*, 2004a; Sônego & Garrido, 2007; Almança *et al.*, 2013). Dentre os fatores envolvidos nessa síndrome destacam-se estresses abióticos ocasionados durante o manejo e a implantação dos vinhedos, desequilíbrio nutricional, fitotoxicidade por cobre e defensivos, danos ocasionados por condições ambientais adversas entre outros (Menezes-Netto *et al.*, 2016).

Em face disso, os fungos de solo causadores de doenças de raízes e tronco são considerados os principais responsáveis pelo declínio da videira (Waite *et al.*, 2015; Armengol & Gramaje, 2016). Esses fitopatógenos proliferam-se intensamente em solos ácidos, com alta umidade e situações em que as videiras se encontram debilitadas. Além disso, nematoides e insetos, como a filoxera e a pérola-da-terra, facilitam o processo infeccioso de fitopatógenos por atacarem o sistema radicular, gerando lesões teciduais (Menezes-Netto *et al.*, 2016).

Em um estudo realizado na Serra Gaúcha, no estado do Rio Grande do Sul, Garrido *et al.* (2004a) verificaram alta incidência dos fungos *Cylindrocarpon* sp., *Phaeoacremonium* sp., *Verticillium* sp., *Botryosphaeria* sp., *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*, *Graphium* sp. e *Cylindrocladium* sp. em cultivares americanas de videira. Além disso, os autores detectaram altos percentuais de diversos fungos em porta-enxertos de videira: em Paulsen 1103, o percentual de reisolamento de *Cylindrocarpon* sp. foi de 33,3 % e de 50,0% de *Verticillium* sp.; em 101-14, foi reisolado *Cylindrocarpon* sp. em 100% dos porta-enxertos avaliados, assim como, em SO4 no qual foi verificada a incidência de *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis* na totalidade dos porta-enxertos testados.

A presença de fitopatógenos no material vegetativo representa a principal causa da baixa produtividade e da morte de plantas em vinhedos jovens. O emprego de material vegetativo infectado propicia a disseminação de doenças, assim, caso as videiras consigam se estabelecer, elas apresentarão sintomas de declínio antes de atingirem a maturidade (Waite, 2010). Em virtude disso, muitos vinhedos precisam ser substituídos entre cinco a dez anos após sua implantação (Smart *et al.*, 2012). Dessa forma, é fundamental garantir que os matrizeiros, fonte de material propagativo, estejam livres de agentes fitopatogênicos, visto que plantas assintomáticas podem estar contaminadas com fitopatógenos em latência, os quais podem se

manifestar caso a videira seja submetida a condições de estresse, como déficit hídrico ou deficiências nutricionais (Aroca *et al.*, 2010).

Além do material propagativo infectado, o solo também atua como fonte de patógenos, visto que diferentes espécies de fungos são habitantes naturais ou podem permanecer associadas às raízes de plantas. A produção de estruturas de resistência, como clamidósporos, possibilita que fungos fitopatogênicos sobrevivam por longos períodos no solo (Halleen *et al.*, 2007; Gramaje & Armengol, 2011). Dessa forma, mesmo que o material propagativo não apresente problemas fitossanitários, os patógenos presentes no solo podem infectar as mudas através de lesões geradas em estacas ou raízes (Oliveira *et al.*, 2004; Halleen *et al.*, 2007).

A seguir serão abordados aspectos relevantes sobre a fusariose e o pé-preto na videira.

2.2.1 Pé-preto

O pé-preto é uma doença fúngica que afeta principalmente viveiros e vinhedos jovens, em diversas regiões produtoras no mundo (Halleen *et al.*, 2006), tendo sido detectada na Califórnia (Scheck *et al.*, 1998), Itália (Sidoti *et al.*, 2000), Portugal (Rego *et al.*, 2001), França (Larignon, 1998), Argentina (Gatica *et al.*, 2001), Austrália (Edwards *et al.*, 2001), Grécia (Rumbos & Rumbou, 2001), África do Sul (Halleen *et al.*, 2003) e Espanha (Alaniz *et al.*, 2007). No Brasil, essa doença foi detectada pela primeira vez na Serra Gaúcha, em 1999, em vinhedos de *Vitis labrusca* (Garrido & Sônego, 2003) e o agente causal foi identificado *Cylindrocarpon destructans* (Zinns.) Scholten.

Essa doença tem sido historicamente atribuída a um único agente causal, cujo nome genérico *Cylindrocarpon* Wollenweber foi introduzido em 1913, para anamorfos pertencentes à seção *Nectria* Willkommiiotes Wollenw. Em 1917, esse conceito foi expandido para incluir espécies formadoras de clamidósporos em cultura, sendo *C. destructans* o mais importante membro desse grupo (Agustí-Brisach & Armengol, 2013). Posteriormente, estudos conduzidos por Halleen *et al.* (2004) descreveram um novo gênero *Campylocarpon* Halleen, Schroers & Crous, o qual é morfologicamente semelhante ao gênero *Cylindrocarpon*.

Nas últimas décadas, estudos moleculares têm auxiliado na caracterização e classificação de diferentes agentes causadores do pé-preto na videira. A espécie *Cylindrocarpon obtusisporum* (Cooke & Harkn.) Wollenw. isolada na Itália (Grasso & Magnano Di San Lio, 1975; Scheck *et al.*, 1998) foi reclassificada como *C. macrodidymum* Schroers, Halleen & Crous (Halleen *et al.*, 2004). Posteriormente, Halleen *et al.* (2006) verificaram que isolados de diferentes países previamente identificados como *C. destructans* apresentavam identidade

morfológica e molecular com *C. liriodendri* J. D. MacDon & E. E. Butler (Petit & Gluber, 2007; Alaniz *et al.*, 2007; Whitelaw-Weckert *et al.*, 2007).

Os principais agentes causadores do pé-preto são *Cylindrocarpon destructans*, *C. macrodidymum*, *C. obtusisporum*, *C. pauciseptatum*, “*Cylindrocarpon*” sp., *Neonectria* sp., *Dactylonectria* sp., *Campylocarpon fasciculare* e *Campylocarpon pseudofasciculare* (Cabral *et al.*, 2012; Lombard *et al.*, 2012; Agustí-Brisach & Armengol, 2013). Recentemente, o gênero *Cylindrocladiella* Boesew., que é morfologicamente similar ao *Cylindrocarpon*, foi associado ao pé-preto na videira (Jones *et al.*, 2012; Agustí-Brisach & Armengol, 2013).

A seguir, na Figura 4 e na Tabela 2, são apresentados alguns aspectos morfológicos das colônias e conídios das principais espécies causadoras do pé-preto na videira.

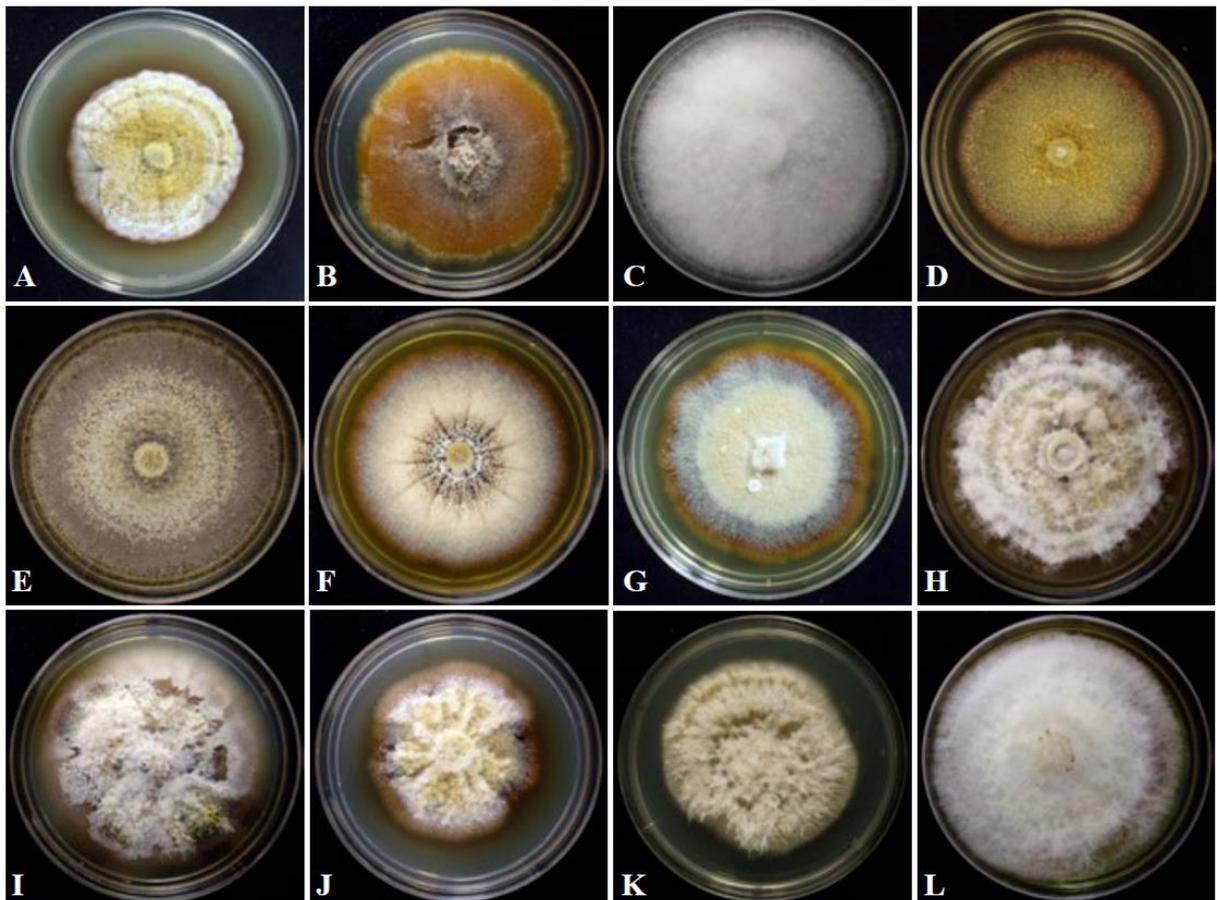


Figura 4. Colônias de fungos causadores do pé-preto em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). A) *Cylindrocarpon destructans*; B) *C. pauciseptatum*; C) *C. obtusisporum*; D) “*Cylindrocarpon*” *alcacerensis*; E) *I. liriodendri*; F) *I. novozelandica*; G) *I. macrodidyma*; H) *I. torresensis*; I) *Campylocarpon fasciculare*; J) *Campyl. pseudofasciculare*; K) *Cylindrocladiella parva*; L) *Cyl. peruviana*.

Fonte: Agustí-Brisach & Armengol (2013).

Tabela 2. Resumo dos aspectos morfológicos distintivos dos principais gêneros associados com o pé-preto na videira.

Características	<i>Cylindrocarpon/Ilyonectria</i>	<i>Campylocarpon</i>	<i>Cylindrocladiella</i>
Conidióforos	Comprimento de 40-160 µm, geralmente simples, não ramificados ou esparsamente ramificados, irregular ou verticiladamente ramificados, com fiálides cilíndricas	Parecem se formar lateralmente de hifas únicas ou fasciculadas, individualmente ou em agregados	Hialinos, únicos, subverticilado, com ramificações primárias e secundárias
Microconídios	Abundantes, elipsoidais a ovoides, hialinos, 0-1 septo, com hilo lateral ou basal	Ausentes	Cilíndricos, extremidades arredondadas, retos, hialinos, 0-1 septo, uma das extremidades pode se tornar inchada com o decorrer do tempo
Macroconídios	Retos ou curvados, hialinos, 1-3 septos, geralmente com cicatriz ou hilo proeminente na abscisão lateral ou basal	Frequentemente curvados, hialinos, com até 6 septos, célula basal ou apical obtusa ou com hilo discreto	Ausente
Clamidósporos	Abundantes, geralmente intercalares, globosos, individuais ou em cadeias	Raros ou ausentes	Abundantes, moderados, frequentemente arranjados em cadeias
Cor da colônia em meio BDA	Branco a amarelo ou marrom escuro	Branco ou levemente marrom	Marrom claro a escuro

Fonte: adaptado de Agustí-Brisach & Armengol (2013).

Os anamorfos de *Cylindrocarpon/Ilyonectria* produzem microconídios e clamidósporos abundantes. Os conidióforos longos e halinos com comprimento de 40-160 µm (Figura 5A); geralmente simples, não ramificados ou esparsamente ramificados, irregulares ou verticilados, com fiálides cilíndricas (Rego *et al.*, 2001; Blanco, 2012). Os macroconídios são retos ou curvados, hialinos, com um a três septos. Os microconídios são de elipsoides a ovoides,

hialinos, com zero a um septo (Figura 5B-C). Os clamidósporos são intercalares, globosos, simples ou em cadeia (Chaverri *et al.*, 2011).

Campylocarpon produz macroconídios curvados, os microconídios são ausentes e os clamidósporos podem estar presentes ou não. Os macroconídios são similares aos de “*Cylindrocarpon*”, mas tipicamente curvados, com no máximo seis septos (Halleen *et al.*, 2004; Chaverri *et al.*, 2011) (Figura 5D-E).

Cylindrocladiella spp. produz conidióforos hialinos, subverticilados, com ramificações primárias ou secundárias. As fiáldes são terminais, em espirais de duas a quatro. Os conídios são cilíndricos, arredondados nas extremidades, retos, hialinos, com zero a um septo. Os clamidósporos são abundantes, frequentemente arranjados em cadeias (Figura 5G-I). O micélio apresenta coloração variando de marrom claro a escuro (Lombard *et al.*, 2012).

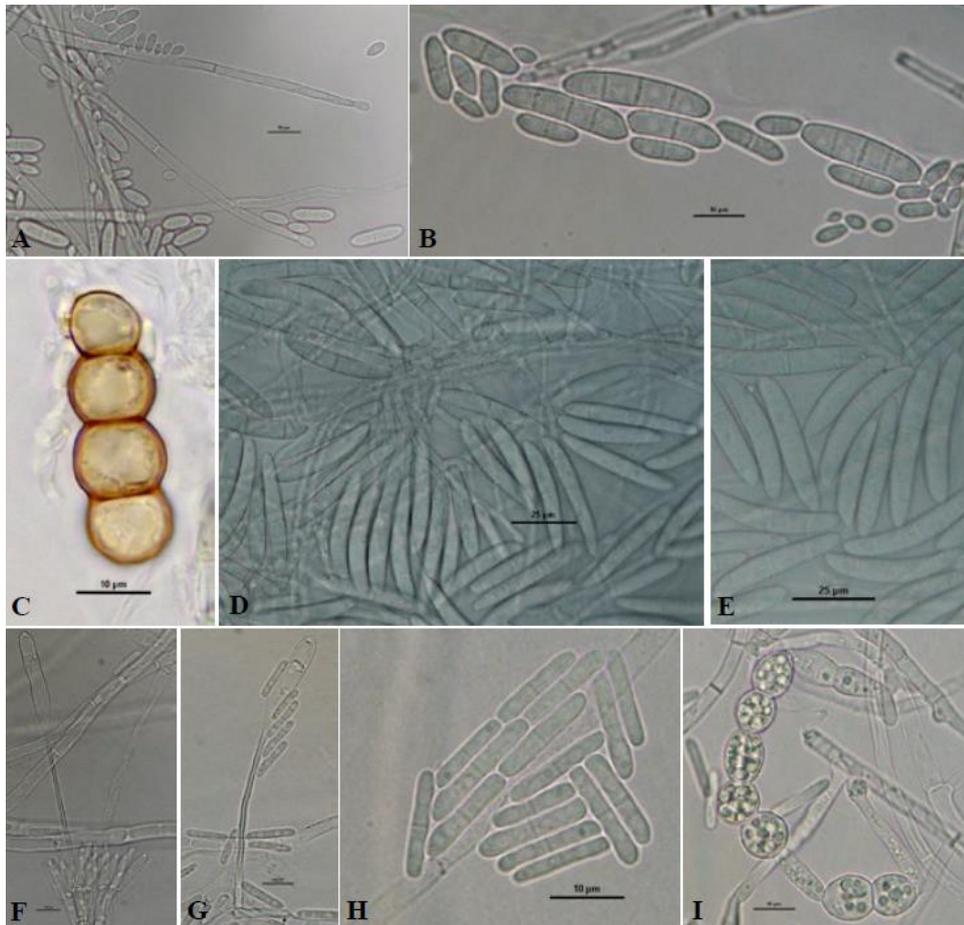


Figura 5. Conídios e clamidósporos fúngicos. A) Conidióforos de “*Cylindrocarpon*” *liriodendri*; B) Macro e microconídios de *I. liriodendri*; C) Clamidósporos em cadeia de *C. pauciseptatum*; D) Conidióforos de *Campyl. fasciculare*; E) Macroconídios de *Campyl. fasciculare*; F) Conidióforos de *Cyl. parva*; G) Vesículas terminais de *Cyl. parva*; H) Conídios de *Cyl. parva*; I) Clamidósporos em cadeia de *Cyl. parva*.

Barra de escala: a–c, f–i = 10 μ m; d–e = 25 μ m.

Fonte: Agustí-Brisach & Armengol (2013).

Os sintomas do pé-preto aparecem principalmente no início do ciclo vegetativo, caracterizando-se por brotações pouco vigorosas, baixo número de folhas, com clorose internervurais e necrose, encurtamento dos entrenós e calos de enxertia mal soldados (Garrido *et al.*, 2004b; Abreo *et al.*, 2010). O fungo ataca estacas e raízes através de ferimentos abertos. A remoção da casca revela descoloração negra e a necrose do tecido lenhoso, desenvolvida a partir da base da estaca e não sendo restrita apenas ao xilema (Figura 6A-C). Em cortes transversais aparecem necroses com forma de um círculo e pontuações castanhas com exsudação de goma. Analisando-se, longitudinalmente, observa-se escurecimento do xilema com formação de estrias (Alaniz *et al.*, 2011; Correia *et al.*, 2013).



Figura 6. Sintomas do pé-preto na videira. A) Escurecimento da base da planta; B) Lesões necróticas no sistema radicular; C) Necrose da base do porta-enxerto.

Fonte: Renata Gava (2014).

O controle da doença é realizado através da utilização de mudas saudáveis, da desinfestação das ferramentas de poda e do plantio em áreas bem drenadas. Em caso de confirmação da doença, recomenda-se o arranquio e destruição das plantas doentes (Garrido *et al.*, 2004b; Gramaje & Armengol, 2011).

2.2.2 Fusariose

O gênero *Fusarium* é formado por fungos de distribuição cosmopolita, que inclui espécies causadoras de doenças tanto em plantas como em animais (Leslie & Summerel, 2006). *Fusarium* spp. são fungos necrotróficos que promovem a lise e a morte da célula hospedeira, visando acesso aos nutrientes necessários à sobrevivência (Agrios, 2005). Além de possuírem um amplo espectro de hospedeiros vegetais, as espécies patogênicas de *Fusarium* podem afetar diferentes órgãos e tecidos, ocasionando podridões de raízes e de frutos, cancrios, doenças foliares e murchas vasculares (Leslie & Summerel, 2006; Dean *et al.*, 2012).

Diferentes formas teleomorfas têm sido descritas para algumas espécies de *Fusarium*. Todas as formas sexuais desse fungo estão incluídas no grupo Ascomycota ordem Hypocreales. Dentro desse gênero, *F. oxysporum* Schlechtend é a espécie de maior destaque, compreendendo mais de 150 *formae speciales*, subdivisão taxonômica utilizada para as variantes patogênicas, de acordo com a espécie hospedeira infectada (Leslie & Summerel, 2006). Assim, não há distinção morfológica clara de isolados de *F. oxysporum*, existe apenas uma divisão em raças fisiológicas conforme interação diferenciada entre uma ou mais estirpes do patógeno e genótipos do hospedeiro vegetal (Agrios, 2005; Lecomte *et al.*, 2016).

A fusariose da videira é uma doença vascular causada pelo fungo *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis* Tochetto. Essa doença foi detectada pela primeira vez no Rio Grande do Sul, na variedade Herbemont (*Vitis labrusca*), em 1954 (Garrido & Gava, 2014).

F. oxysporum produz macroconídios, microconídios e clamidósporos como esporos assexuais (Di Pietro *et al.*, 2003; Agrios, 2005). Os microconídios possuem de zero a dois septos, sendo o esporo mais frequentemente produzido em plantas infectadas; os macroconídios têm de três a cinco septos, gradualmente pontudos e curvados nas extremidades, esses esporos são geralmente observados em plantas mortas pelo patógeno (Figura 7). Os clamidósporos possuem paredes espessas e são produzidos em micélios velhos ou macroconídios (Sônego *et al.*, 2005; Leslie & Summerel, 2006), podendo estar presentes ou não (Teunissen *et al.*, 2002).



Figura 7. Aspectos morfológicos de *Fusarium* sp. A) Macro e microconídios. B) Colônia fúngica em meio BDA. Fonte: Lucas da Ressurreição Garrido (2014).

F. oxysporum infecta as videiras através das raízes, penetrando no sistema vascular e provocando o bloqueio do xilema. Ao microscópio, pode-se observar a formação de tiloses e gomas, reação da planta frente ao avanço do patógeno (Grigoletti Jr., 1993; Garrido *et al.*, 2004b).

Os sintomas podem ser observados durante todo o ciclo vegetativo da videira. Externamente, verifica-se o murchamento da planta e, internamente, percebe-se o escurecimento longitudinal desde a extremidade da raiz até a base dos ramos do ano (Figura 8). Esse escurecimento pode progredir; ocasionando rachaduras no tronco, que servem como porta de entrada para outras doenças (Garrido & Sônego, 2003). Na primavera, os sintomas incluem retardamento da brotação, redução no crescimento de ramos e folhas com necroses nas bordas. A fusariose pode se manifestar de forma aguda no verão, com o amarelecimento de folhas, murchamento e desprendimento, podendo ocorrer morte súbita da planta (Sônego *et al.*, 2005).



Figura 8. Sintoma da fusariose com escurecimento do xilema em corte transversal no tronco da videira. Fonte: Renata Gava (2014).

A infecção dos tecidos radiculares é facilitada pela presença de ferimentos causados por implementos agrícolas ou por pragas do solo. Omer *et al.* (1999) relacionaram a incidência de *Fusarium* sp. com a população de filoxera presente no solo, uma vez que este inseto pode causar ferimentos nas raízes, os quais possibilitam a entrada do fungo. A pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis* Hempel) é outra praga detectada em raízes associada à ocorrência de *Fusarium* sp. e de outras doenças como o pé-preto (Zart, 2012).

O controle da fusariose é bastante difícil e o emprego de defensivos químicos em videiras infectadas demonstrou baixa eficácia (Schuck *et al.*, 2007). É recomendado o emprego de cultivares e porta-enxertos resistentes à doença como Paulsen 1103 e R99 (*V. berlandieri* x *V. rupestris*), VR043-43 e VR039-19 (*V. vinifera* x *Muscadinia rotundifolia*). Já, os porta-enxertos do grupo *V. berlandieri* x *V. riparia* (SO4, Kober 5BB, Solferino) são altamente suscetíveis ao ataque desse fungo (Schuck *et al.*, 2007).

Além disso, recomenda-se o uso de material propagativo de qualidade, sanitização adequada de utensílios e da maquinaria empregado no manejo do vinhedo, desinfecção de substratos, solo e água (Sônego *et al.*, 2005; Raudales *et al.*, 2014).

2.3 CONTROLE DE DOENÇAS FÚNGICAS

O uso intensivo de defensivos químicos no controle de fitopatógenos além de causar danos à saúde humana e ao meio ambiente, promove a seleção de patógenos resistentes e gera fitotoxicidade à cultura, na forma de resíduos químicos (Bettiol & Ghini, 2003; Boubakri *et al.*, 2015). Nesse contexto, o manejo integrado de pragas e doenças consiste na utilização de defensivos químicos de forma eficiente e racional, visando reduzir o volume e o número de aplicações desses produtos; minimizando assim, os impactos negativos provocados aos diferentes ecossistemas (Ribas, 2010; Pertot *et al.*, 2016; Silveira *et al.*, 2017).

A fim de minimizar esses efeitos nocivos, métodos alternativos de controle de doenças têm sido estudados. Esses métodos baseiam-se na atividade biológica de metabólitos secundários produzidos pelas plantas ou na ação de micro-organismos antagonistas aos fitopatógenos (Howel, 2007). Os óleos essenciais têm demonstrado eficiência no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungicida direta quanto pela indução de mecanismos de resistência na planta (Balbi-Peña *et al.*, 2006; Combrinck *et al.*, 2011). Ademais, micro-organismos antagonistas como *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. têm demonstrado ação inibitória *in vitro* e *in vivo* sobre diversos fungos fitopatogênicos (Pomella & Ribeiro, 2009).

O principal objetivo do controle biológico é a manutenção da densidade populacional de fitopatógenos e pragas em níveis econômicos e ecológicos aceitáveis (Lima *et al.*, 2000). Essa estratégia deve levar em consideração que cada micro-organismo apresenta um determinado potencial para controlar naturalmente os patógenos (Morandi & Bettiol, 2009). Para isso, diversos estudos vêm sendo realizados visando elucidar as interações antagonista-patógeno-hospedeiro (Halfeld-Vieira *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2008; Lana-Filho *et al.*, 2010).

Os agentes de controle biológico apresentam diferentes mecanismos de ação, que podem ocorrer de forma isolada ou conjunta, como produção de compostos tóxicos (biossurfactantes e antibióticos), síntese de enzimas hidrolíticas, competição por espaço e nutrientes, ativação de mecanismo de defesa em plantas e a promoção do crescimento de plantas (Bettiol & Morandi, 2009; Santoyo *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016).

2.3.1 Gênero *Bacillus* no controle biológico

O gênero *Bacillus*, pertencente à família Bacillaceae, é constituído por bactérias gram-positivas, aeróbias estritas ou anaeróbias facultativas, geralmente móveis, formadoras de endósporos (Logan & De Vos, 2009). Espécies desse gênero possuem forma de bastão, sendo encontradas isoladas, em duplas ou em forma de cadeias, como filamentos celulares de *B. cereus*. Usualmente possuem extremidades arredondadas, todavia algumas espécies como *B. thuringiensis* apresentam polos retos. Além disso, o crescimento em condições subótimas pode ocasionar pleomorfismos celulares (Logan *et al.*, 2000).

As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* spp. se destacam por apresentar uma multiplicidade de mecanismos antagônicos e pela sobrevivência em nichos ecológicos específicos (Ghini & Bettioli, 2009; Castillo *et al.*, 2013). Em situações ambientais desfavoráveis, *Bacillus* spp. desenvolve endósporos, os quais são estruturas de resistência, com reduzido conteúdo de água e sem atividade metabólica, sendo esses fatores essenciais para a sobrevivência dessas bactérias (Henriques & Moran Junior, 2000). No entanto, os esporos inertes podem retomar o crescimento sempre que as condições ambientais forem favoráveis. Na presença de nutrientes, o processo de germinação é iniciado e, dentro de poucos minutos, os esporos retornam ao estado vegetativo.

Dentre as espécies de *Bacillus* destacam-se *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis*, conhecidas por inibir o crescimento de diversos fungos fitopatogênicos como *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., *Sclerotium* spp., *Gaeummanomyces* spp., *Nectria* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. e *Verticillium* spp. (Zhang *et al.*, 2009; Halleen *et al.*, 2011; Basurto-Cadena *et al.*, 2012).

Bacillus spp. são bactérias encontradas naturalmente em solos e que se estabelecem na rizosfera de plantas, onde se multiplicam e se protegem da ação antagonística de outros microorganismos autóctones (Campos Silva *et al.*, 2008). Essas bactérias podem residir endofiticamente no interior de vegetais sem produzir efeitos negativos ao hospedeiro (Bacon & White, 2000) e conferindo-lhes resistência aos estresses bióticos e abióticos (Rosenblueth & Martinez-Romero, 2006).

O mecanismo de ação de *Bacillus* spp. ocorre através da promoção do crescimento e da produtividade de culturas (Yao *et al.*, 2006; Ahemad & Kibret, 2014) ou, ainda, pelo antagonismo a fitopatógenos (Hammami *et al.*, 2009). O antagonismo direto envolve competição por espaço e nutrientes, parasitismo, antibiose e interferência de sinal. Por outro

lado, o mecanismo indireto baseia-se na indução da resistência no hospedeiro (Lanna Filho *et al.*, 2010; Tokpah *et al.*, 2016; Eljounaidi *et al.*, 2016), conforme ilustrado na Figura 9.

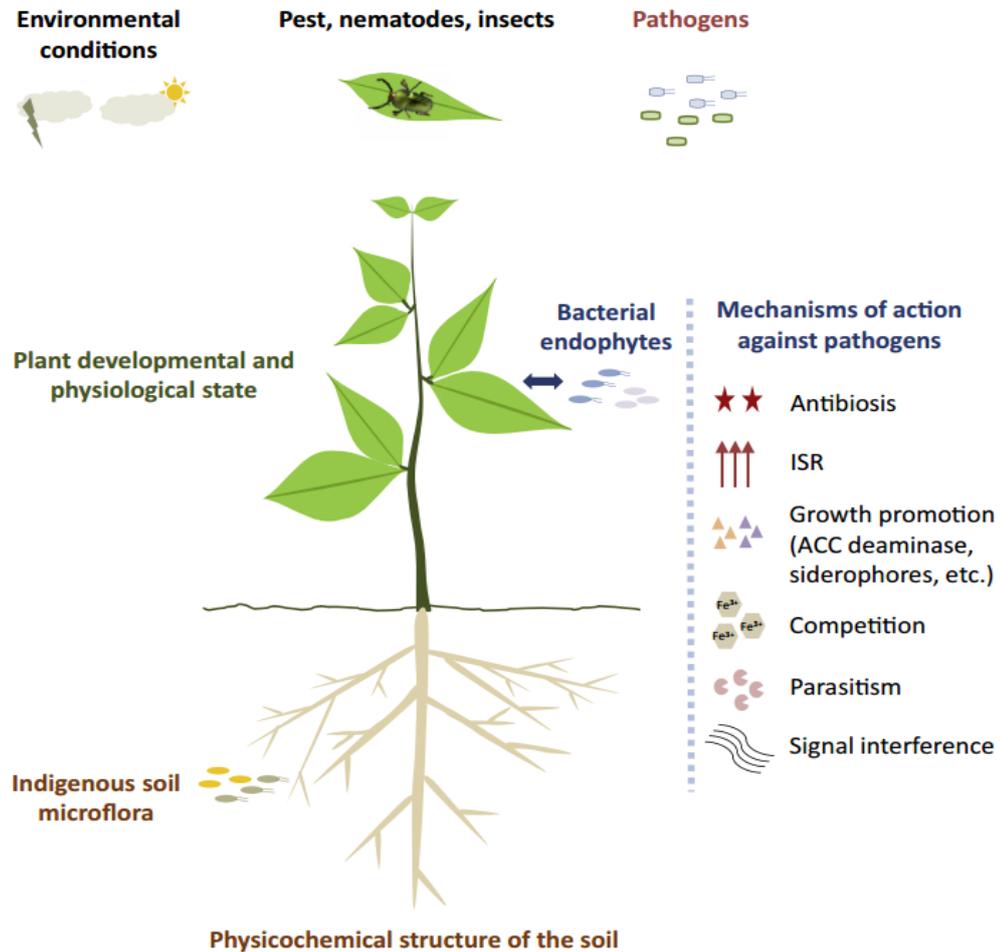


Figura 9. Fatores influenciando a dinâmica e densidade de bactérias endofíticas e mecanismos de ação contra fitopatógenos.

Fonte: Eljounaidi *et al.* (2016).

2.3.1 Ação na promoção do crescimento e da produtividade

A ação das rizobactérias promotoras de crescimento de plantas pode ocorrer de forma direta ou indireta. A ação direta ocorre através da mobilização de nutrientes, da solubilização do ferro presente no solo (Ferraz *et al.*, 2010; Compant *et al.*, 2013) e da produção de fitormônios estimuladores do crescimento como auxinas (Asghar *et al.*, 2002), citocininas (Arkhipova *et al.*, 2005) e giberelinas (Joo *et al.*, 2004). Dentre os mecanismos indiretos de promoção do crescimento destacam-se redução de micro-organismos prejudiciais às plantas mediante a produção de sideróforos, produção de antibióticos e eliminação de metabólitos tóxicos presente na região radicular (Bettiol & Morandi, 2009; Ahemad & Kibret, 2014).

Estudos revelaram que *B. subtilis* influenciou positivamente a germinação e o desenvolvimento de plantas. Ademais, essa rizobactéria apresenta um efeito benéfico sobre a nodulação de leguminosas e promovendo o aumento da produtividade das culturas (Araújo *et al.*, 2010). De acordo com Sabir *et al.* (2012), a extensão dos efeitos positivos promovidos pelas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas é dependente da espécie ou da variedade da planta hospedeira. Esses mesmos autores verificaram que o porta-enxerto de videira Paulsen 1103 inoculado com *B. subtilis* produziu brotos com maior massa em comparação ao controle. Além disso, outros efeitos positivos foram detectados na absorção de nutrientes pela videira e na concentração de clorofila foliar.

2.3.3 Ação na resistência sistêmica induzida

A interação entre a planta e o patógeno promove a expressão de mecanismos bioquímicos de defesa em vegetais. Assim, as plantas superiores sintetizam sinalizadores químicos como o ácido salicílico, o ácido 2,6 dicloro-isonicotínico, ésteres do ácido S-metilbenzo que promovem a resistência sistêmica adquirida (Cavalcanti *et al.*, 2014). Essa forma de resistência é caracterizada pela síntese endógena de ácido salicílico e pela ativação da produção de proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas), que são proteínas cuja expressão é induzida durante a infecção por fitopatógenos ou estresses abióticos diversos (Chinnasri *et al.*, 2017). As PR proteínas caracterizam-se pelo baixo peso molecular, resistência a temperatura elevadas, pH baixos e ação de enzimas proteolíticas. Além disso, as proteínas relacionadas à patogênese apresentam diversos mecanismos de ação como atividade hidrolítica na parede celular, toxicidade direta, permeabilização da membrana plasmática, sinalização no processo de defesa entre outros (Stangarlin *et al.*, 2011).

Um outro mecanismo de resistência em vegetais promovido pela colonização de micro-organismos não patogênicos é a resistência sistêmica induzida - ISR (Glazebrook, 2005; Ongena & Thonart, 2006), a qual é fenotipicamente similar à resistência sistêmica adquirida - SAR, ativada após a primeira infecção por um patógeno (Durrant & Dong, 2004). A ISR é um mecanismo de defesa não restrito ao sítio de colonização, apresentando caráter sistêmico e de longo prazo. A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos. Esses agentes indutores de resistência são chamados de elicitores, podendo apresentar natureza química variada, como oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos ou ácidos (Stangarlin *et al.*, 2011; Eljounaidi *et al.*, 2016).

As bactérias gram-negativas pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Serratia* se destacam como micro-organismos promotores da resistência sistêmica induzida. No entanto, diversas bactérias gram-positivas pertencentes ao gênero *Bacillus* têm demonstrado um importante papel na indução desse mecanismo de defesa em plantas (Ongena *et al.*, 2007) (Figura 10). Dessa forma, algumas bactérias podem ser benéficas não apenas através do antagonismo a fitopatógenos, mas também, através da proteção indireta de plantas, mediante o estímulo de mecanismos de defesa. Segundo Gond *et al.* (2015), bactérias endofíticas do gênero *Bacillus*, isoladas do trigo, foram responsáveis pela ativação de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese PR-1 e PR-4, induzindo respostas de defesa contra fitopatógenos.

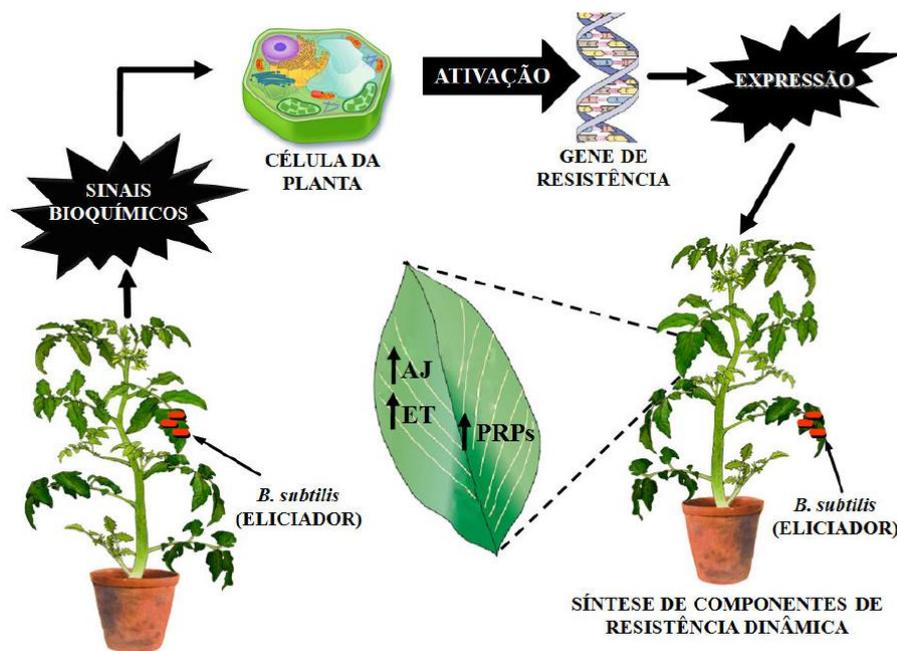


Figura 10. Ilustração do mecanismo de resistência sistêmica induzida promovido por *B. subtilis*.

Fonte: Lanna Filho *et al.* (2010).

2.3.4 Ação antimicrobiana

Bactérias antagonicas, como *Bacillus* spp., agem frequentemente por antibiose e, ocasionalmente, por parasitismo e competição. Micro-organismos que agem por antibiose, geralmente têm amplo espectro de ação, visto que a produção de substâncias tóxicas é mais efetiva do que outros mecanismos de inibição de fitopatógenos (Kupper *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2015). *Bacillus* spp. possui ação antagonística contra uma grande variedade de patógenos tais como *Phytophthora cactorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria carthami*, *Phytophthora capsici* e *F. solani*, tanto em experimentos desenvolvidos *in vitro* quanto em casas de vegetação ou a campo (Hernández *et al.*, 2011).

Dessa forma, *Bacillus* sp. sintetiza substâncias antibióticas, os quais são polipeptídios de baixo peso molecular como micosubtilinas (Leclère *et al.*, 2005), bacilomicinas (Moyne *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2013), fungistatinas (Hassi *et al.*, 2012) e subsporinas (Schallmeyer *et al.*, 2004; Al-Ajlani *et al.*, 2007). Existem, ainda, antibióticos constituídos por oligopeptídeos ligados a uma cadeia de ácido graxo como a surfactina, a iturina e a fengicina. Essas substâncias exibem significativa atividade antibacteriana e antifúngica (Tamehiro *et al.*, 2002; Shafí *et al.*, 2017). A ação desses antibióticos ainda não foi totalmente elucidada; no entanto, a teoria mais aceita relata que eles impedem a germinação de esporos. Tamehiro *et al.* (2002) verificaram que *B. subtilis* isolado 168 é responsável pela síntese de três antibióticos ribossômicos (TasA, subtilisina e sublancina), e dois antibióticos não ribossômicos (surfactina e bacilisina).

Outro mecanismo de biocontrole exercido por *Bacillus* spp. é através da síntese de compostos voláteis. Essas substâncias são compostos orgânicos de baixo peso molecular, resultantes do metabolismo secundário, como terpenoides, fenilpropanoides, derivados de ácidos graxos, entre outros. Estudos demonstraram que essas substâncias atuam na sinalização e na comunicação intra e interorganismos (Piechulla & Pott, 2003; Kai *et al.*, 2007). Os compostos voláteis possuem alta pressão de vapor e volatizam facilmente, podendo agir a significativas distâncias, devido à difusão em soluções aquosas, disseminação através do ar e de poros presentes no solo (Gotor-Vila *et al.*, 2017).

2.4 OBTENÇÃO DE MATERIAL VEGETATIVO SADIO

Apesar da propagação vegetativa da videira ser uma prática tradicional, esse processo requer organização e habilidades consideráveis quando o objetivo é a obtenção de grandes quantidades mudas com qualidade fitossanitária e agrônômica, uma vez que a cada ano cresce o número de vinhedos sendo implantados e replantados (Waite *et al.*, 2015).

As perdas ocasionadas pelo declínio e morte precoce de videiras são um grande problema que afeta toda a cadeia vitivinícola (Whitelaw-Weckert *et al.*, 2013). Ademais, verifica-se uma crescente preocupação com o impacto ocasionado por doenças de raízes e de tronco em mudas e plantas jovens, visto que muitas vezes o material vegetativo é assintomático para essas doenças (Gramaje & Armengol, 2011; Smart *et al.*, 2012; Waite *et al.*, 2015). Assim, o material vegetativo pode atuar como fonte de inóculo durante o processo propagativo, resultando em contaminação cruzada.

Agustí-Brisach & Armengol (2013) isolaram *Cylindrocarpon macrodidymum* de 26 das 52 espécies de ervas daninhas em viveiros. Estudos demonstraram que o contato entre esporos presentes nessas ervas e as raízes ou calos existentes em estacas de videira resultaram em altas taxas de infecção por patógenos (Probst, 2011).

A aplicação de defensivos químicos em viveiros é difícil e pouco eficaz, pois as técnicas tradicionais empregadas no controle de patógenos de superfície, como aspersão ou imersão, apresentam dificuldades em atingir e controlar os micro-organismos existentes no interior do xilema e do floema (Caudwell *et al.*, 1997; Waite *et al.*, 2015; Halleen & Fourie, 2016). Além disso, o material propagativo pode ser infectado em diferentes etapas da produção de mudas em viveiros, em virtude de lesões provocadas que servem como porta de entrada para fitopatógenos (Halleen *et al.*, 2003; Aroca *et al.*, 2010).

A imersão do material vegetativo em benomil, carbendazim, cloreto de dodecildimetilamônio ou captana, antes do armazenamento em câmara fria ou da enxertia, reduziu significativamente os níveis de infecção por *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. (Gramaje *et al.*, 2010). Entretanto, esses tratamentos não foram eficazes no controle do pé-preto visto que esses patógenos se encontram no solo (Halleen *et al.*, 2007).

Resultados de um estudo conduzido em Portugal, em videiras, demonstraram que benomil, tebuconazole, carbendazim + flusilazole e ciprodinil + fludioxonil melhoraram o crescimento de plantas e reduziram a incidência de *Cylindrocarpon* spp. (Rego *et al.*, 2006). Os fungicidas captan, carbendazim, oxiclreto de cobre, cloreto de dodecildimetilamônio, sulfato de hidroxiquinolina e prochloraz reduziram a severidade das infecções causadas por *C.*

liriodendri e *C. macrodidymum*, durante a fase de enraizamento, no processo de propagação da videira; mas apenas captan, carbendazim e cloreto de dodecildimetilamônio reduziram a incidência do patógeno (Alaniz *et al.*, 2011).

Em virtude das dificuldades no controle de fitopatógenos, novas estratégias têm sido adotadas, como o tratamento ou terapia com água quente.

2.4.1 Termoterapia com água quente

A termoterapia é uma metodologia que emprega calor para remoção de agentes fitopatogênicos como bactérias, fungos, nematoides, vírus, fitoplasmas, ácaros e insetos. Ela baseia-se na sensibilidade diferencial à temperatura entre o patógeno e o hospedeiro (Gramaje, 2016). Existem diferentes tipos de tratamento por termoterapia, tais como tratamento por ar quente, vapor de água e água quente. A fim de evitar danos causados pelas altas temperaturas no hospedeiro, recomenda-se o uso da temperatura mínima letal ao fitopatógeno, em um intervalo de tempo prolongado (Gramaje, 2016).

Estudos demonstraram que o tratamento de porta-enxertos com água quente a 50 °C, durante 30 minutos pode ser suficiente para controlar patógenos presentes no material vegetativo (Halleen *et al.*, 2007; Waite & Morton, 2007; Lerin *et al.*, 2017). No entanto, é importante considerar que temperaturas elevadas provocam estresse nas plantas. Assim, deve-se realizar a hidratação prévia das estacas com água fria antes das gemas iniciarem a brotação (Waite *et al.*, 2015).

Em síntese, pode-se dizer que essa técnica é efetiva, benéfica, prática e relativamente econômica, contudo as plantas podem ser reinfectedas após introdução a campo.

2.4.2 Micropropagação

A micropropagação é uma técnica de cultura de tecidos que permite suprir uma elevada demanda de material vegetativo com características morfológicas homogêneas e qualidade fitossanitária. Assim, a partir de uma única planta matriz podem ser produzidas milhares de mudas no decorrer de um único ano; ao passo que, na propagação vegetativa convencional, apenas um número reduzido de plantas pode ser obtido num intervalo de tempo específico do ano (Ribeiro, 2012).

A disponibilização de material vegetativo com sanidade é fundamental para ao sucesso da implantação e do manejo do vinhedo. Dessa forma, é necessário adotar metodologias

robustas para eliminar micro-organismos e empregar protocolos eficientes para obtenção de plantas livres de fitopatógenos de importância comercial (Pathirana *et al.*, 2013; Bettoni *et al.*, 2016).

A micropropagação permite a propagação assexuada de genótipos, consistindo na propagação *in vitro* de vegetais utilizando pequenas partes da planta mãe como meristemas, ápices meristemáticos e segmentos nodais de forma asséptica. Essa técnica deve ser executada em ambientes limpos, com infraestrutura adequada para o crescimento das plântulas, em condições de luz e temperatura controladas (Ribeiro, 2012; Sugiyama, 2015).

A micropropagação pode ser dividida em três fases: etapa de estabelecimento *in vitro*, etapa de multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas e etapa de enraizamento. Consideram-se, ainda, outras duas fases no processo, correspondentes a uma etapa anterior ao isolamento, que compreende a seleção da planta-matriz fornecedora de explantes e outra etapa posterior ao enraizamento, que compreende a transferência da planta para o ambiente externo (Cid & Teixeira, 2014).

O emprego do cultivo *in vitro* permite a diferenciação de células e tecidos vegetais em embriões, brotos, raízes, folhas, entre outras partes da planta. O desenvolvimento de uma nova organização celular nos tecidos e de novos órgãos é denominado morfogênese ou organogênese (Lemos, 2014). Nesse contexto, a organogênese pode ser direta, quando ocorre a partir de tecidos do explante ou de pequenas proliferações destes; ou indireta, quando o explante passa pela fase de calogênese para posterior obtenção de brotos (Rezende *et al.*, 2008; Othani, 2015).

O estabelecimento *in vitro* de plantas requer extrema assepsia, visto que micro-organismos saprófitas e epifíticos competem com os explantes pelos nutrientes (Lazo-Javalera *et al.*, 2016). Além disso, a remoção de muitos patógenos endofíticos e de vírus requer o emprego de técnicas como cultivo de ápices meristemáticos (Willis *et al.*, 2016).

A capacidade de crescimento *in vitro* depende não apenas do genótipo da espécie, mas também de sua atividade fisiológica na planta-matriz, das características do explante, do manejo da cultura, do balanço hormonal, da regulação transcricional, das condições ambientais entre outros fatores (Lima *et al.*, 2012; Sluis & Hake, 2015). Dentre as principais vantagens da propagação *in vitro* destacam-se a rapidez na produção em grande escala de clones selecionados, a sanidade e a uniformidade das plantas produzidas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação de *Bacillus* sp. linhagem F62 no controle biológico dos fitopatógenos “*Cylindrocarpon*” sp. e *Fusarium* sp. na promoção do crescimento em porta-enxertos de videira.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vitro* o antagonismo por compostos difusíveis ou cultivo pareado de *Bacillus* sp. F62 sobre o crescimento micelial de “*Cylindrocarpon*” sp. e *Fusarium* sp.;
- Avaliar *in vitro* o antagonismo por compostos voláteis de *Bacillus* sp. F62 sobre o crescimento micelial de “*Cylindrocarpon*” sp. e *Fusarium* sp.;
- Avaliar *in vitro* o antagonismo de *Bacillus* sp. F62 e do filtrado da cultura sobre a germinação de conídios de “*Cylindrocarpon*” sp. e *Fusarium* sp.;
- Avaliar *in vivo* a ação de *Bacillus* sp. F62 sobre os fungos “*Cylindrocarpon*” sp. e *Fusarium* sp. em estacas dos porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e SO4;
- Avaliar *in vivo* a ação de *Bacillus* sp. F62 sobre os fungos “*Cylindrocarpon*” sp. e *Fusarium* sp. em mudas micropropagadas dos porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e SO4;
- Avaliar *in vivo* a ação de *Bacillus* sp. F62 na promoção do crescimento em estacas e em mudas micropropagadas dos porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e SO4.

4. CAPÍTULO 1

Biocontrole de “*Cylindrocarpon*” sp. em porta-enxertos de videira empregando *Bacillus* sp. linhagem F62

Alessandra Russi, Marcus André Kurtz Almança, Daniel Santos Grohs, Joséli Schwambach

Resumo

A viticultura mundial vem sofrendo significativas perdas econômicas ocasionadas pelo declínio e morte precoce de plantas. Nesse contexto, fungos causadores de doenças de tronco e raízes, como o pé-preto, são os principais responsáveis pelo baixo desempenho dos vinhedos. Devido à baixa eficácia de fungicidas, têm sido realizadas buscas alternativas de controle como o uso de bactérias antagonistas. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de *Bacillus* sp. linhagem F62 no controle *in vitro* e *in vivo* de cinco isolados de “*Cylindrocarpon*” sp. em porta-enxertos Paulsen 1103 (*Vitis berlandieri* x *V. rupestris*) e SO4 (*V. berlandieri* x *V. riparia*). No ensaio *in vitro*, foi avaliado o antagonismo de *Bacillus* sp. F62 no crescimento micelial através de compostos difusíveis e voláteis, além da inibição da germinação de conídios através da suspensão bacteriana ou do filtrado da cultura bacteriana. No ensaio *in vivo*, estacas e mudas micropropagadas foram submetidas a diferentes tratamentos: Controle, Bac, Bac + Cyl e Cyl. Verificou-se que o bioagente foi capaz de inibir o crescimento micelial dos isolados fúngicos através de compostos difusíveis e de inibir a germinação de conídios tanto através do contato com suspensão bacteriana quanto com o filtrado. No ensaio *in vivo*, estacas de SO4 tratadas com *Bacillus* sp. F62 apresentaram aumento da parte aérea e de raízes e redução no reisolamento de “*Cylindrocarpon*” sp. em 27,9%, enquanto estacas de Paulsen 1103 tiveram redução de 10,3% na incidência da doença. Em mudas micropropagadas, *Bacillus* sp. F62 além de promover o crescimento, reduziu o percentual de reisolamento fúngico para 36,9% em SO4 e 36,1% em Paulsen 1103. O presente estudo demonstra o potencial do uso de *Bacillus* sp. F62 na promoção do crescimento e no controle *in vivo* do pé-preto em estacas e mudas micropropagadas de Paulsen 1103 e SO4.

Palavras-chave: Pé-preto, Controle biológico, Promoção de crescimento, Paulsen 1103, SO4

4.1 INTRODUÇÃO

O declínio e a morte precoce de videiras vêm crescendo nos últimos anos, afetando a produção vitícola mundial e ocasionando sérios prejuízos pela redução significativa na produtividade de vinhedos adultos, ou ainda, pela eliminação de vinhedos jovens (Halleen *et al.*, 2003; Gramaje & Armengol, 2011). Nesse contexto, fungos causadores de doenças de tronco são os principais responsáveis pela morte e declínio de vinhedos. O emprego de material vegetativo infectado propicia a disseminação de doenças e, caso as videiras consigam se

estabelecer, elas podem apresentar sintomas de declínio antes de atingirem a maturidade (Waite *et al.*, 2015). Dessa forma, é fundamental garantir que o material propagativo esteja livre de agentes fitopatogênicos, visto que plantas assintomáticas podem estar contaminadas com fitopatógenos latentes (Gramaje & Armengol, 2011; Waite *et al.*, 2015). Esses fungos endofíticos podem se manifestar caso a videira seja submetida a condições de estresse (Aroca *et al.*, 2010).

O pé-preto é uma das doenças envolvidas no declínio e morte precoce da videira, cujos agentes causadores incluem os gêneros *Cylindrocarpon*, *Campylocarpon*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria*, *Neonectria* e *Cylindrocladiella* (Gramaje & Armengol, 2011; Agustí-Brisach & Armengol, 2013; Halleen & Fourie, 2016). No Brasil, os fungos *Ilyonectria liriodendri* (Russi *et al.*, 2010) e *I. macrodidyma* (Santos *et al.*, 2015) foram recentemente reportados em vinhedos. Os sintomas da doença aparecem no início do ciclo vegetativo, caracterizando-se por brotações pouco vigorosas, folhas com clorose internervurais e necrose, encurtamento dos entrenós e calos de enxertia mal soldados (Garrido *et al.*, 2004; Abreo *et al.*, 2010). O fungo ataca estacas e raízes através de ferimentos causando necrose do tecido lenhoso, exsudação de goma e escurecimento do xilema com formação de estrias (Correia *et al.*, 2013). Além disso, foram verificadas lesões necróticas e redução da biomassa de raízes (Gramaje & Armengol, 2011; Agustí-Brisach & Armengol, 2013).

O uso intensivo de defensivos químicos, além de causar danos à saúde humana e ao meio ambiente, promove a seleção de patógenos resistentes e gera fitotoxicidade à cultura (Boubakri *et al.*, 2015). Dessa maneira, o emprego de agentes de biocontrole proporciona um método atrativo, eficiente e ambientalmente menos agressivo que os defensivos químicos, o que torna o controle biológico uma alternativa mais sustentável nos âmbitos econômico e ambiental (Shafi *et al.*, 2017). Além disso, a aplicação de defensivos químicos em viveiros é difícil, pois as técnicas tradicionais como aspersão ou imersão empregados no controle de patógenos de superfície não conseguem atingir e controlar os micro-organismos existentes no interior do xilema e do floema (Waite *et al.*, 2015).

Bactérias antagonicas, como as do gênero *Bacillus*, agem frequentemente por antibiose e, ocasionalmente, por parasitismo e competição. Micro-organismos que agem por antibiose, geralmente apresentam amplo espectro de ação, uma vez que a produção de substâncias tóxicas é mais efetiva que outros mecanismos envolvidos na inibição de fungos fitopatogênicos (Santos *et al.*, 2015). Estudos comprovaram a eficácia de *Bacillus* sp. no controle de fungos fitopatogênicos na videira como *Eutypa lata* (Ferreira *et al.*, 1991; Kotze *et al.*, 2011), *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides* (Furuya *et al.*, 2011; Boubakri *et al.*, 2015),

Phaeomoniella chlamydospora, *Phomopsis viticola*, *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum australe* e *N. parvum* (Kotze *et al.*, 2011; Rezgui *et al.*, 2016; Wicaksono *et al.*, 2017), *Plasmopara viticola* (Furuya *et al.*, 2011; Boubakri *et al.*, 2015) e *Dactylonectria macrodidyma* (Santos *et al.*, 2016). Além disso, *Bacillus* spp. são consideradas bactérias promotoras do crescimento por estimularem o crescimento e o desenvolvimento de plantas, através da biodisponibilização de nutrientes e do estímulo à biossíntese hormonal, elevando o rendimento, reduzindo estresses biótico e abiótico (Compant *et al.*, 2010; Kejela *et al.*, 2017).

Frente ao exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica de *Bacillus* sp. linhagem F62 sobre o crescimento micelial e a germinação de conídios, bem como o controle *in vivo* de “*Cylindrocarpon*” sp. em dois porta-enxertos de videira de importância comercial.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Agente de controle biológico e isolados fúngicos

No ensaio *in vitro* foram utilizados cinco isolados de “*Cylindrocarpon*” sp. provenientes da micoteca do Laboratório de Fitopatologia, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Campus de Bento Gonçalves (Tabela 1). Os conídios foram obtidos de colônias cultivadas por 14 dias em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. As placas foram lavadas com água destilada e autoclavada e a concentração da suspensão foi ajustada em 10^5 conídios.mL⁻¹, com adição de Tween 20.

Tabela 1. Isolados de “*Cylindrocarpon*” sp. empregados no ensaio *in vitro*.

Isolado	Origem (cidade)	Porta-enxerto/Cultivar
Cyl88	Farroupilha	P1103/Chardonnay
Cyl84	Vacaria	P1103/Itália
Cyl18	Pinto Bandeira	SO4
Cyl220	Vacaria	P1103/Itália
Cyl65	Farroupilha	P1103

O agente de biocontrole *Bacillus* sp. linhagem F62, proveniente do Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Caxias do Sul, foi incubado em 100 mL de caldo BD (Batata-

Dextrose), a 27°C, durante 24 horas em um agitador orbital. Em seguida, as células foram centrifugadas a 12.000×g durante 10 minutos, sendo o precipitado celular reservado e o sobrenadante descartado.

4.2.2 Ensaio de antagonismo *in vitro*: crescimento micelial

O efeito de *Bacillus* sp. F62 sobre o crescimento micelial foi avaliado em dois ensaios distintos, empregando delineamento inteiramente casualizado. O ensaio de cultivo pareado consistiu na inoculação de um disco de 6 mm de diâmetro de micélio fúngico com 10 dias no centro de uma placa de Petri contendo meio BDA. Decorridas 24 horas, foram adicionados 25 µL de suspensão de *Bacillus* sp. F62 (10⁶ UFC.mL⁻¹) em quatro pontos equidistantes. O ensaio de inibição compostos voláteis consistiu no emprego de duas placas de Petri, contendo meio BDA, sobrepostas e seladas com parafilme. No centro da placa superior foi inoculado um disco de 6 mm de diâmetro de ágar coletado de cultura fúngica com 10 dias e na placa inferior foi espalhado 100 µL de suspensão de células de *Bacillus* sp. F62 (10⁶ UFC.mL⁻¹). As placas foram incubadas a 25°C, no escuro, durante 21 dias. Foram efetuadas medições ortogonais do diâmetro das colônias diariamente na primeira semana e posteriormente no 10°, 14° e 21° dia. Para avaliar o percentual de inibição do crescimento micelial utilizou-se como referência o tratamento controle contendo apenas o fungo, sem adição de suspensão bacteriana. Em ambos os testes, foram realizadas 10 replicatas para cada isolado fúngico e para o controle. Os dados obtidos foram utilizados no cálculo do Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), conforme fórmula de Maguire (1962), adaptada por Oliveira (1991) sendo, portanto, $IVCM = \sum(D - D_a)/N$, onde, D = diâmetro médio atual da colônia; D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior; N = número de dias após a inoculação.

4.2.3 Ensaio de antagonismo *in vitro*: germinação de conídios

Para investigar a ação de *Bacillus* sp. F62 sobre a germinação de conídios dos isolados fúngicos, a bactéria foi cultivada durante 48 h em caldo BD (200 g.L⁻¹ de caldo de batata e 20 g.L⁻¹ de dextrose) a 28°C, em agitador a 150 rpm. Posteriormente, a cultura foi centrifugada a 3500×g por 5 min a 23°C. O pellet bacteriano foi lavado três vezes com água estéril e ressuspenso em solução NaCl 0,85%. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada para 10⁵ UFC.mL⁻¹. O filtrado livre de células foi obtido do sobrenadante do cultivo bacteriano após filtração em membrana de 0,22 µm. A germinação de conídios foi realizada em frascos

contendo 50 mL de caldo BD, em agitador orbital a 130 rpm, a 28°C, durante 24 horas, em três diferentes tratamentos para cada isolado: Controle = 10^5 conídios.mL⁻¹; Fungo + Bac = 10^5 conídios.mL⁻¹ + 10^5 UFC.mL⁻¹ de suspensão bacteriana; Fungo + Filtrado = 10^5 conídios.mL⁻¹ + 10 mL de filtrado bacteriano. O experimento foi realizado em triplicata. Decorridas 24 horas do início do ensaio, a contagem de conídios foi realizada em hemocitômetro, empregando-se 10 µL da suspensão. Foram considerados germinados os conídios que apresentavam pelo menos o dobro do tamanho original e foi calculado o percentual de germinação em relação ao controle.

4.2.4 Ensaio *in vivo* em estacas

Material vegetativo dos porta-enxertos Paulsen 1103 e SO4 foi coletado na Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS e mantido em câmara fria durante 60 dias. Estacas com aproximadamente 30 cm de comprimento, 12 mm de diâmetro e três gemas foram selecionadas para o experimento. A gema basal e a apical foram mantidas; a intermediária foi removida. Após hidratação em água destilada e autoclavada durante 24 horas, as estacas foram submetidas a tratamento com água quente, conforme descrito por Gramaje (2016). Em seguida, as estacas foram dispostas em câmara de forçagem a 28°C e 70% de umidade relativa, durante 15 dias. Posteriormente, as estacas foram aclimatadas a temperatura ambiente, durante cinco dias e transferidas para tubetes contendo 250 mL substrato autoclavado (turfa sphagnum 90% e vermiculita 10%) e adição de 5 g.L⁻¹ de fertilizante de liberação controlada (5 a 6 meses).

Para o ensaio *in vivo* foi selecionado o isolado Cyl84, a partir do qual foi preparada suspensão com 5.10^5 conídios.g⁻¹ de substrato de acordo com Santos *et al.* (2016) e a suspensão de *Bacillus* sp. F62 foi inoculada na concentração 10^4 UFC.g⁻¹ de substrato. Após plantio em tubete, 30 estacas de cada porta-enxerto foram submetidas a quatro tratamentos em delineamento inteiramente casualizado, com aplicação de 10 mL de suspensão no substrato: Controle = água destilada e autoclavada; Bac = *Bacillus* sp. F62 (1° e 14° dias); Bac + Cyl = *Bacillus* sp. F62 (1° e 14° dias) + Cyl84 (7° dia) e Cyl = Cyl84 (7° dia).

O experimento foi mantido em casa de vegetação durante 160 dias conforme Gramaje *et al.* (2016). Em seguida foram avaliados comprimento do broto primário (CBP), número de nós do broto primário (NBP), número de brotos totais (BT), número de nós totais (NT), massa seca da parte aérea (MSA) e das raízes (MSR). A massa seca foi determinada após secagem do material vegetal em ventilação forçada a 60°C. O reisolamento dos patógenos foi realizado empregando-se oito fragmentos do colo das estacas distribuídos em duas placas de Petri. A desinfestação e incubação dos fragmentos foram realizadas conforme Santos *et al.* (2016).

4.2.5 Ensaio *in vivo* em mudas micropropagadas

Inicialmente, foram coletadas brotações de estacas de Paulsen 1103 e SO4 previamente submetidas a tratamento com água quente. Na desinfestação, os brotos foram imersos em álcool 70% (v/v) durante 1 minuto, em hipoclorito de sódio 1% (v/v), contendo 0,02% (v/v) de Tween 20, durante 20 minutos e lavados três vezes por imersão em água estéril. Os propágulos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 12 mL de meio MS/2 (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de ágar, 1 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e o pH foi ajustado para 5,8. Os explantes foram submetidos a dois subcultivos e as plântulas foram enraizadas em meio MS/2, suplementado com 15 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de ágar e 0,1 µg.L⁻¹ de ANA (ácido α -naftalenoacético). O crescimento foi realizado a 25°C \pm 2°C, 70% de umidade relativa, com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 72 µmol.m⁻²s⁻¹ proveniente de lâmpadas fluorescentes. Plântulas com aproximadamente quatro folhas e sistema radicular bem desenvolvido foram transferidas para copos plásticos contendo 180 mL substrato autoclavado (turfa sphagnum 90% e vermiculita 10%) e aclimatizadas durante 30 dias a 23-28°C, umidade relativa superior a 60% e intensidade luminosa de 400 µmol.m⁻²s⁻¹.

O ensaio *in vivo* com mudas micropropagadas de SO4 e Paulsen 1103 foi realizado em triplicata com 30 repetições por tratamento e delineamento inteiramente casualizado. As concentrações de *Bacillus* sp. F62 e "*Cylindrocarpon*" sp. foram iguais às empregadas no experimento com estacas. As plântulas imediatamente após transferência para aclimatização foram submetidas a quatro tratamentos, com aplicação de 4 mL de suspensão no substrato: Controle = água destilada e autoclavada; Bac = *Bacillus* sp. F62 (1° e 14° dias); Bac + Cyl = *Bacillus* sp. F62 (1° e 14° dias) + Cyl84 (7° dia) e Cyl = Cyl84 (7° dia).

As replicatas de cada ensaio foram avaliadas em três períodos distintos: início do ensaio; 30 dias depois: determinação da variação do número de folhas (Δ Fol1) e da variação comprimento da parte aérea (Δ Compr1); 160 dias depois: medição da variação do número de folhas (Δ Fol2), variação do comprimento da parte aérea (Δ Compr2), massa seca da parte aérea (MSA), massa seca de raízes (MSR) e percentual de reisolamento fúngico (RF).

4.2.6 Análise estatística

Os tratamentos dos ensaios *in vitro* (Controle x Bac + Cyl/antagonismo por voláteis; Controle x Bac +Cyl/antagonismo por difusíveis; Fungo + Bac x Fungo + Filtrado) foram comparados através do teste t com $p \leq 0,05$. Por outro lado, os isolados fúngicos foram

comparados entre si através de ANOVA, seguido de comparação de média por teste de Tukey com $p \leq 0,05$. Para os ensaios *in vivo*, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para avaliar a normalidade dos dados. Posteriormente, os dados normais foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey com $p \leq 0,05$ para os fatores tratamento e porta-enxerto ao passo que as interações foram analisadas pelo teste de Bonferroni empregando o programa SPSS® 22.0.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Ensaio do antagonismo *in vitro*

O bioagente promoveu a inibição da velocidade de crescimento micelial dos cinco isolados de “*Cylindrocarpon*” sp. no cultivo pareado em relação ao controle (Tabela 2 e MS1). Os isolados Cyl65, Cyl88 e Cyl18 apresentaram os menores índices de velocidade de crescimento (0,66, 0,85 e 0,89, respectivamente), tendo sofrido maior inibição por *Bacillus* sp. F62. O isolado Cyl84 apresentou comportamento intermediário (1,12) nesse screening, com taxa de inibição similar à média dos cinco isolados avaliados. Por outro lado, o isolado Cyl 220 apresentou a maior taxa de crescimento (2,22) dentre os isolados no cultivo pareado. A média da velocidade de crescimento do controle foi 3,57, sem haver diferença estatística entre os isolados de “*Cylindrocarpon*” sp.

No antagonismo por compostos voláteis, não houve diferença estatisticamente significativa entre os IVCMs dos cinco isolados e o controle. Enquanto, a média de IVCM do controle foi de 3,58, no tratamento com compostos voláteis foi de 3,57. Além disso, os cinco isolados não diferiram entre si em relação ao IVCM (Tabela 2 e MS2). Em relação ao percentual de inibição do crescimento micelial, avaliado ao final do experimento após 21 dias de incubação, verificou-se que a inibição ocorreu principalmente no cultivo pareado. A inibição variou de 35,36% (Cyl220) a 73,67% (Cyl65) em relação ao controle no cultivo pareado, com média de 61,76%. Por outro lado, o antagonismo por compostos voláteis, apesar de não ter causado diferença IVCM em relação ao controle, promoveu uma redução no diâmetro do micélio fúngico variando de 2,86% (Cyl84) a 17,75% (Cyl220), com média de 10,66% (Tabela 2).

Tabela 2. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e Percentual de inibição do crescimento micelial (PICM) de três isolados de “*Cylindrocarpon*” sp. no ensaio de antagonismo por compostos difusíveis e voláteis de *Bacillus* sp. F62.

Isolados	IVCM		PICM*
	Controle	Cyl + Bac	
Antagonismo por difusíveis			
Cyl 18	3,58 ± 0,08aA	0,89 ± 0,08bB	69,68%
Cyl 220	3,60 ± 0,06 aA	2,22 ± 0,22bD	35,36%
Cyl 84	3,54 ± 0,05aA	1,12 ± 0,17bC	61,09%
Cyl 88	3,56 ± 0,05aA	0,85 ± 0,11bAB	69,00%
Cyl 65	3,55 ± 0,05aA	0,66 ± 0,14bA	73,67%
Média	3,57 ± 0,06aA	1,15 ± 0,14bC	61,76%
Antagonismo por voláteis			
Cyl 18	3,60 ± 0,07aA	3,61 ± 0,59aA	14,23%
Cyl 220	3,62 ± 0,02aA	3,53 ± 0,59aA	17,75%
Cyl 84	3,56 ± 0,06aA	3,54 ± 0,92aA	2,86%
Cyl 88	3,55 ± 0,04aA	3,52 ± 0,25aA	6,71%
Cyl 65	3,56 ± 0,06aA	3,63 ± 0,36aA	11,73%
Média	3,58 ± 0,05aA	3,57 ± 0,54aA	10,66%

* Calculado a partir dos dados de crescimento micelial no 21º dia de cultivo.

Análise estatística foi realizada separadamente nos ensaios de antagonismo por compostos voláteis e difusíveis. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos Controle e Cyl + Bac através do teste t com $p \leq 0,05$. Letras maiúsculas iguais indicam que os isolados de “*Cylindrocarpon*” sp. não diferiram entre si através de ANOVA seguida de teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

No ensaio da germinação de conídios, o tratamento controle teve germinação média de 94,07% (dados não apresentados). No tratamento Fungo + Bac houve inibição do percentual de germinação de conídios em relação ao controle de 98,47 (Cyl65), 74,84% (Cyl84), 67,36% (Cyl18), 57,59% (Cyl88) e 39,12% (Cyl220) (Figura 1). No tratamento Fungo + Filtrado houve uma redução no percentual de germinação de conídios de 78,86% (Cyl65), 72,96% (Cyl88), 47,26% (Cyl 84), 46,42% (Cyl18) e 17,09% (Cyl 220) e em relação ao controle (Figura 1).

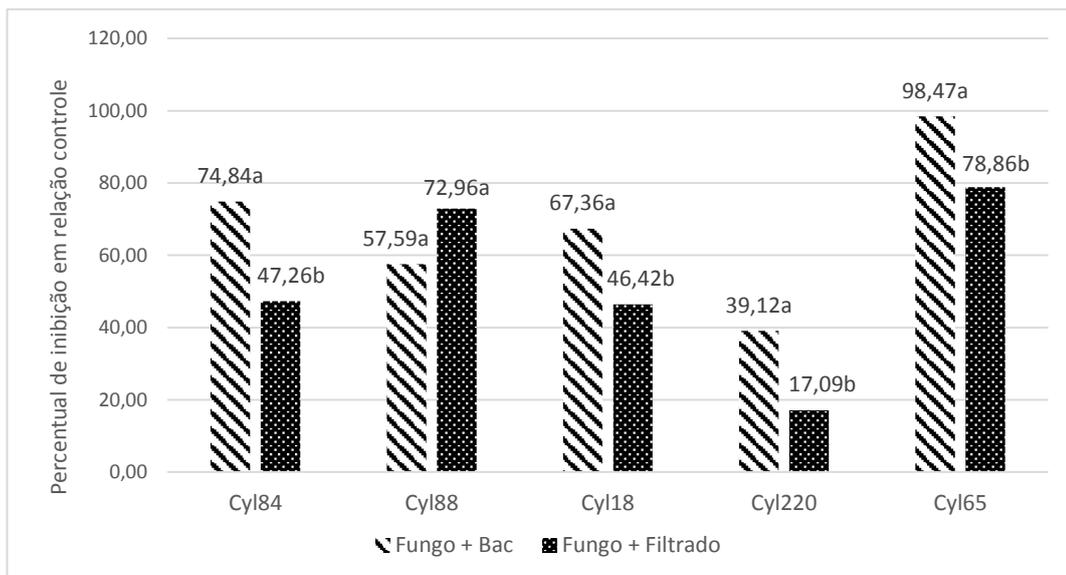


Figura 1. Percentual de Inibição na Germinação de Conídios (PIGC) de três isolados de “*Cylindrocarpon*” sp. em relação ao controle, em caldo BD, 24 horas após início do ensaio. Letras diferentes nos rótulos indicam que houve diferença estatisticamente significativa no teste de t, com 5% de significância.

Comparando os tratamentos Fungo + Bac e Fungo + Filtrado, observa-se que a suspensão de *Bacillus* sp. F62 inibiu expressivamente a germinação conidial de quatro isolados fúngicos (Cyl84, Cyl18, Cyl220 e Cyl65) em relação ao tratamento com filtrado de cultura bacteriana. O efeito dos tratamentos Fungo + Bac e Fungo + Filtrado foram estatisticamente similares apenas para o isolado Cyl88 (Figura 1).

4.3.2 Ensaio *in vivo* em estacas

A inoculação com *Bacillus* sp. F62 apresentou um efeito na promoção do crescimento de estacas de SO4, com incremento de NBP e NT em relação ao controle. Outras respostas avaliadas tanto na parte aérea quanto nas raízes não foram influenciadas pela presença da bactéria. Diferentemente, *Bacillus* sp. F62 não desempenhou um papel expressivo na promoção do crescimento em estacas de Paulsen 1103 (Tabela 3).

Para a realização do ensaio *in vivo*, foi selecionado o isolado Cyl84 que apresentou menor inibição no índice de crescimento micelial através de antagonismo de *Bacillus* sp. F62. As estacas de SO4 infectadas com o patógeno apresentaram respostas estatisticamente similares ao controle ao longo do período de avaliação do experimento (Tabela 3). Embora, o tratamento Bac + Cyl não tenha promovido incremento significativo das respostas mensuradas, a bactéria apresentou efeitos positivos na redução do reisolamento de “*Cylindrocarpon*” sp., de 91,3% no

tratamento Cyl para 65,8% no tratamento Bac + Cyl (diferença de 27,9%).

Em estacas de Paulsen 1103, tanto o tratamento Bac quanto o tratamento Bac + Cyl não promoveram incremento das respostas CBP, NBP, NT, BT, MSA e MSR em relação ao controle (Tabela 3). Todavia, similarmente, ao observado em estacas de SO4, *Bacillus* sp. F62 reduziu a incidência de "*Cylindrocarpon*" sp., de 89,2% no tratamento Cyl para 80,0% no tratamento Bac + Cyl (diferença de 10,3%).

Na comparação entre os porta-enxertos, verificou-se que as estacas de Paulsen 1103 apresentaram melhor desenvolvimento da parte aérea, com destaque para as respostas CBP, NBP, NT, BT e MSA, enquanto o sistema radicular apresentou maior massa em estacas de SO4 (MSR). Em relação ao percentual de reisolamento fúngico (RF), verificou-se que *Bacillus* sp. F62 promoveu redução no tratamento Bac + Cyl em relação ao tratamento Cyl, sendo de forma mais expressiva em estacas de SO4. Estacas de ambos os porta-enxertos demonstraram suscetibilidade estatisticamente iguais ao isolado de "*Cylindrocarpon*" sp., conforme Tabela 3.

Tabela 3. Respostas em estacas dos porta-enxertos de videira SO4 e Paulsen 1103: comprimento do broto primário (CBP), número de nós no broto primário (NBP), nós totais (NT), brotos totais (BT), massa seca da parte aérea (MSA), massa seca de raízes (MSR) e percentual de reisolamento fúngico (RF) em quatro tratamentos: Controle, *Bacillus* sp. F62 (Bac), *Bacillus* sp. F62 + “*Cylindrocarpon*” sp. (Bac + Cyl) e “*Cylindrocarpon*” sp. (Cyl).

Tratamentos	CBP (cm)	NBP (cm)	NT	BT	MSA (g)	MSR (g)	RF (%)
SO4							
Controle	222,0 ± 13,2aB	8,1 ± 0,3bB	8,8 ± 0,3bB	1,2 ± 0,0aB	2,2 ± 0,2aB	2,1 ± 0,1aA	0,0 ± 0,0cD
Bac	299,5 ± 7,7aB	10,5 ± 0,2aB	11,5 ± 0,3aB	1,2 ± 0,0aB	2,3 ± 0,1aB	2,4 ± 0,1aA	0,0 ± 0,0cD
Bac + Cyl	270,8 ± 14,5aB	8,8 ± 0,3abB	9,4 ± 0,4abB	1,1 ± 0,0aB	2,6 ± 0,2aB	2,3 ± 0,1aA	65,8 ± 2,1bC
Cyl	257,7 ± 15,7aB	8,2 ± 0,4bB	8,3 ± 0,4bB	1,0 ± 0,0aB	2,3 ± 0,1aB	2,0 ± 0,1aA	91,3 ± 1,1aA
Paulsen 1103							
Controle	342,3 ± 7,8abA	12,7 ± 0,3abA	13,9 ± 0,3abA	1,3 ± 0,0aA	1,6 ± 0,1aA	1,4 ± 0,1aB	0,0 ± 0,0cD
Bac	375,5 ± 8,1aA	13,5 ± 0,3aA	15,7 ± 0,3aA	1,4 ± 0,0aA	1,7 ± 0,1aA	1,7 ± 0,1aB	0,0 ± 0,0cD
Bac + Cyl	295,3 ± 10,8bcA	11,5 ± 0,4bA	13,2 ± 0,4bA	1,3 ± 0,0aA	1,9 ± 0,1aA	1,7 ± 0,1aB	80,0 ± 1,9bB
Cyl	266,3 ± 7,4cA	11,2 ± 0,3bA	12,8 ± 0,3bA	1,3 ± 0,0aA	1,7 ± 0,1aA	1,6 ± 0,1aB	89,2 ± 1,6aA

*Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey com 5% de significância entre os tratamentos. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os porta-enxertos no teste de Tukey e na interação entre os fatores (tratamentos x porta-enxertos) através do teste de Bonferroni com 5% de significância.

4.3.3 Ensaio *in vivo* em mudas micropropagadas

Em mudas micropropagadas de SO4, *Bacillus* sp. F62 apresentou efeito significativo sobre ΔFol1 , ΔCompr1 , ΔFol2 , ΔCompr2 e MSA, ou seja, promoveu um incremento da parte aérea das mudas tanto na aclimatização quanto no período posterior, em casa de vegetação. Além disso, a massa de raízes (MSR), também, teve valor significativo em relação ao controle (Tabela 4). No tratamento Bac + Cyl, observou-se aumento de ΔCompr1 , ΔFol2 , ΔCompr2 e MSR em relação ao tratamento Cyl, indicando que *Bacillus* sp. F62 minimizou os impactos negativos decorrentes da infecção de "*Cylindrocarpon*" sp. As respostas ΔFol2 , ΔCompr2 e MSR no tratamento Cyl foram inferiores ao Controle. Além disso, verificou-se redução do reisolamento fúngico de 66,7% no tratamento Cyl para 42,1% no tratamento Bac + Cyl (redução de 36,9%) (Tabela 4).

Mudas micropropagadas de Paulsen 1103 tiveram seu crescimento significativamente promovido por *Bacillus* sp. F62, com aumento de ΔFol1 , ΔFol2 , ΔCompr2 , MSA e MSR em relação ao Controle (Tabela 4). Já no tratamento Bac + Cyl, verificou-se um incremento de ΔCompr1 e MSR, demonstrando o papel da bactéria na promoção do crescimento inclusive em porta-enxertos infectados com "*Cylindrocarpon*" sp. Somado a isso, foi verificada uma redução no percentual de reisolamento do "*Cylindrocarpon*" sp., no tratamento Cyl, verificou-se 81,9% de incidência do fitopatógeno, enquanto no tratamento Bac + Cyl, o percentual foi de 52,4% (diferença de 36,1% na incidência da doença).

No comparativo entre os porta-enxertos, verificou-se que as mudas micropropagadas de SO4 apresentaram as respostas ΔCompr2 e MSA superiores em relação às mudas de Paulsen 1103, porém ΔFol1 foi inferior em mudas SO4. As respostas ΔCompr1 , ΔFol2 , MSR e RF apresentaram interação na análise entre porta-enxertos e tratamentos. Mudas de SO4 não diferiram das mudas de Paulsen 1103 em relação ao ΔFol2 , com exceção do controle que foi superior em SO4. De forma similar, ΔCompr1 não diferiu entre os porta-enxertos nos tratamentos Bac + Cyl e Cyl, porém mudas de SO4 tratadas com *Bacillus* sp. F62 apresentaram comprimento superior a mudas de Paulsen 1103. Por outro lado, mudas de SO4 apresentaram menor MSR que mudas de Paulsen 1103, exceto no tratamento Bac que foi estatisticamente similar as respostas verificadas em Paulsen 1103. Já, em relação ao RF, ambos os porta-enxertos demonstraram comportamentos similares, embora tenha sido verificada maior incidência de "*Cylindrocarpon*" sp. em Paulsen 1103.

Tabela 4. Respostas em mudas micropropagadas dos porta-enxertos de videira SO4 e Paulsen: variação no número de folhas em 30 dias (Δ Fol1), variação no comprimento da parte aérea em 30 dias (Δ Compr1), variação no número de folhas em 160 dias (Δ Fol2), variação no comprimento da parte aérea em 160 dias (Δ Compr2), massa seca da parte aérea (MSA), massa seca de raízes (MSR) e percentual de reisolamento fúngico (RF) em quatro tratamentos: Controle, *Bacillus* sp. F62 (Bac), *Bacillus* sp. F62 + “*Cylindrocarpon*” sp. (Bac + Cyl) e “*Cylindrocarpon*” sp. (Cyl).

Tratamentos	Δ Fol1	Δ Compr1 (cm)	Δ Fol2	Δ Compr2 (cm)	MSA (g)	MSR (g)	RF (%)
SO4							
Controle	2,1 ± 0,1bB	13,4 ± 0,6bcC	14,6 ± 0,5bB	669,3 ± 14,4bA	3,3 ± 0,1bA	2,6 ± 0,2bB	0,0 ± 0,0Dc
Bac	2,5 ± 0,1aB	22,6 ± 0,9aA	16,8 ± 0,6aA	735,0 ± 16,1aA	4,0 ± 0,1aA	3,8 ± 0,1aA	0,0 ± 0,0Dc
Bac + Cyl	2,0 ± 0,1bB	14,8 ± 0,6bC	14,9 ± 0,5abB	684,3 ± 14,9abA	3,2 ± 0,1bA	2,5 ± 0,2bB	42,1 ± 2,5Cb
Cyl	1,8 ± 0,1bB	11,2 ± 0,5cC	12,3 ± 0,5cC	596,2 ± 16,5cA	3,3 ± 0,1bA	1,5 ± 0,1cB	66,7 ± 2,2Ba
Paulsen 1103							
Controle	2,8 ± 0,2bA	17,1 ± 1,1aB	11,0 ± 0,6bC	294,3 ± 11,0bB	1,7 ± 0,1bB	3,0 ± 0,1bA	0,0 ± 0,0Dc
Bac	3,9 ± 0,3aA	16,9 ± 0,7aB	16,6 ± 1,0aA	387,2 ± 15,2aB	2,3 ± 0,1aB	4,2 ± 0,1aA	0,0 ± 0,0Dc
Bac + Cyl	3,0 ± 0,2bA	15,8 ± 0,8aC	13,6 ± 0,8bB	303,8 ± 11,5bB	1,8 ± 0,1bB	3,9 ± 0,1aA	52,4 ± 2,5Cb
Cyl	2,8 ± 0,2bA	11,3 ± 0,5bC	11,4 ± 0,6bC	291,3 ± 11,1bB	1,6 ± 0,1bB	2,6 ± 0,1bA	81,9 ± 1,6Aa

*Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey com 5% de significância entre os tratamentos. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os porta-enxertos no teste de Tukey e na interação entre os fatores (tratamentos x porta-enxertos) através do teste de Bonferroni com 5% de significância.

4.4 DISCUSSÃO

No ensaio *in vitro* de antagonismo por compostos difusíveis, verificou-se uma significativa redução no índice de crescimento micelial de “*Cylindrocarpon*” sp. De forma semelhante, estudos desenvolvidos por Alfonzo *et al.* (2009) indicaram que diferentes linhagens de *B. subtilis* inibiram o crescimento *in vitro* de quatro fungos fitopatogênicos na videira (*Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaemoniella chlamydospora*, *Fomitiporia mediterranea* e *Lasiodiplodia theobromae*). Ferreira *et al.* (1991) obtiveram redução de 88% no crescimento micelial *in vitro* de *Eutypa lata* empregando uma linhagem de *B. subtilis* isolada em fermentos de poda na videira.

Taxas de inibição no crescimento de fungos causadores da morte descendente na videira superiores a 50% foram verificadas por Wicaksono *et al.* (2017), no antagonismo por difusíveis, empregando as bactérias *Pseudomonas* sp. I2R21 e *Burkholderia* sp. W6R12A e W4R11. O percentual máximo de inibição (64,7%) foi verificado empregando *Pseudomonas* sp. I2R21 no biocontrole de *Diplodia seriata*. Resultados similares foram reportados por Santos *et al.* (2016) que verificaram inibição do crescimento micelial de 31,9% a 40,9% em *Dactylocnectria macrodidyma* (um dos agentes causadores do pé-preto na videira), empregando produtos comerciais contendo *B. subtilis* (Rizos® e Rizolyptus®). Outro estudo avaliando a ação de 19 linhagens bacterianas pertencentes aos gêneros *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium* e *Bacillus* sobre o crescimento de fungos causadores de doenças de tronco em videiras (*Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum* e *Schizophyllum commune*) demonstrou inibição variando de 2,5% a 81,5%, com média de 24,9% no cultivo pareado (Rezgui *et al.*, 2016).

O antagonismo por compostos voláteis de *Bacillus* sp. F62 foi pouco expressivo neste estudo, não diferindo estatisticamente do controle. Diferentemente, Santos *et al.* (2016) verificaram inibição do crescimento micelial por *B. subtilis* variando de 37% a 69% em *Dactylocnectria macrodidyma*. Wicaksono *et al.* (2017), também reportaram inibição do crescimento micelial por compostos voláteis superior a 30% em *Neofusicoccum ribis* empregando três isolados de *Pseudomonas* sp. W1R33, W7R11 e W7R13, atingindo inibição máxima de 50%. Muito embora não tenha sido verificada inibição no crescimento micelial foram detectadas anormalidades fisiológicas no micélio condizentes com as observações de Chaurasia *et al.* (2005) que reportaram lise de hifas, vacuolização e granulação de estruturas miceliais em *Fusarium oxysporum* induzidas por compostos voláteis e difusíveis de *B. subtilis*.

No ensaio de germinação de conídios, a inibição ocorreu através da suspensão e do

filtrado da cultura de *Bacillus* sp. F62, com algumas diferenças entre os diferentes isolados de “*Cylindrocarpon*” sp. Sotoyama *et al.* (2016) verificaram que *B. amyloliquefaciens* IUMC7 apresentou atividade antagonista em suspensão de conídios de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e que o sobrenadante da cultura bacteriana, contendo metabólitos, inibiu o alongamento e gerou anormalidades no tubo germinativo. Além disso, o antagonismo de *B. amyloliquefaciens* LBM 5006 sobre a germinação de conídios e o desenvolvimento do tubo germinativo em *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Bipolaris sorokiniana* foi reportado por Benitez *et al.* (2010). De forma semelhante, Cao *et al.* (2012) verificaram que *B. subtilis* linhagem SQR 9 inibiu o crescimento micelial e a germinação de conídios de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*.

Metabólitos produzidos por *B. subtilis*, como a bacilomicina D, causam injúrias severas à membrana, parede celular das hifas e esporos fúngicos. Estudos desenvolvidos por Romero *et al.* (2007) demonstraram que lipopolipeptídeos como a iturina e a fengicina produzidos por *B. subtilis* reduziram a germinação de conídios de míldio em *Podosphaera fusca*. Gong *et al.* (2014) estudaram o efeito da bacilomicina purificada em conídios e verificaram 96,63% de inibição sobre a germinação de esporos e 98,10% sobre a esporulação de *Aspergillus flavus*.

No ensaio *in vivo* foi verificada promoção do crescimento em estacas de SO4, enquanto em Paulsen 1103 não houve efeito significativo no tratamento com *Bacillus* sp. F62. Diferentemente, Santos *et al.* (2016) verificaram um aumento no comprimento do broto primário e no número de nós no broto primário em videiras cv. Merlot enxertadas sobre Paulsen 1103 com um ano de idade, quando tratadas com *B. subtilis* em relação ao controle. No entanto, os autores detectaram redução no número de nós totais, brotos totais, massa seca das raízes e da parte aérea. Essas diferentes respostas podem ser decorrentes da interação bactéria-planta hospedeira que envolve o processo de reconhecimento e interações específicas, como a produção de exsudatos que está vinculada à colonização da rizosfera e do rizoplano (Lugtenberg & Kamilova, 2009). Além disso, a composição do exsudato depende da exposição a situações de estresse, do genótipo e do estágio de desenvolvimento da planta (Haichar *et al.*, 2008).

Os porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e SO4 apresentaram diferentes respostas nos ensaios *in vivo* devido às suas características genéticas e fisiológicas. Enquanto SO4 é um porta-enxerto oriundo do cruzamento *V. berlandieri* x *V. riparia*, caracterizado pelo médio vigor; Paulsen 1103 é proveniente do cruzamento *V. berlandieri* x *V. rupestris* e apresenta alta vigor (Ollat *et al.*, 2016). Ademais, o crescimento e o desenvolvimento do sistema radicular dos porta-enxertos não dependem apenas do genótipo, mas também das condições ambientais, características físico-químicas do solo, fatores climáticos e interações com outros microorganismos (Kocsis *et al.*, 2016).

Outro fator que influencia na promoção do crescimento em diferentes espécies é a forma como *Bacillus* spp. coloniza raízes, visto que ela pode se desenvolver em toda a superfície ou em algumas células rizodermis, estabelecendo-se como microcolônias ou biofilmes. Além disso, a taxa de crescimento bacteriano e a capacidade de a bactéria migrar para a parte aérea da planta, devido a sua característica endofítica, são outros fatores envolvidos nas diferentes respostas expressas em plantas (Hallmann & Berg, 2007; Compant *et al.*, 2010).

No ensaio com mudas micropropagadas, tanto Paulsen 1103 quanto SO4 apresentaram efeitos positivos no crescimento quando tratados *Bacillus* sp. F62. Similarmente, estudos desenvolvidos por Nain *et al.* (2012) demonstraram que *B. subtilis* linhagem RM-2 teve efeitos positivos sobre a germinação de sementes, massa fresca e seca, área foliar, comprimento da parte aérea e de raízes, além de um incremento na produtividade em feijão. Lopez-Valdez *et al.* (2011) também verificaram promoção do crescimento, com incremento no comprimento de raízes, na massa fresca e seca das raízes e da parte aérea um mês após a inoculação de *B. subtilis* em girassol. A promoção do crescimento promovida por *Bacillus* spp. ocorre pelo aumento na absorção de nutrientes, decréscimo na produção de etileno e estímulo à biossíntese de fitormônios como ácido 3-indolacético e ácido giberélico (Shafi *et al.*, 2017). Enquanto, o ácido 3-indolacético desempenha um importante papel na emissão de raízes adventícias, o ácido giberélico atua em combinação com auxinas no alongamento da planta e na formação de gemas foliares (Srivastava, 2002).

A inoculação com *Bacillus* sp. F62 apresentou efeito positivo inclusive em plantas infectadas com "*Cylindrocarpon*" sp., muito embora a promoção do crescimento tenha sido menos expressiva que em plantas saudáveis. Sabe-se que a composição de exsudatos nas raízes de plantas é potencialmente influenciada por fitopatógenos, o que pode ter afetado a atividade da bactéria (Compant *et al.*, 2010). Para uma eficiente colonização radicular, os micro-organismos patogênicos e não patogênicos devem competir entre si por espaço e para suprir seus requerimentos nutricionais (Shafi *et al.*, 2017).

Em relação ao biocontrole, *Bacillus* sp. F62 possibilitou redução no reisolamento de "*Cylindrocarpon*" sp. em estacas de Paulsen 1103 e SO4. Santos *et al.* (2016) também verificaram redução no percentual de reisolamento de *D. macrodidyma*, variando de 17,87% a 40,32% em videiras com um ano de idade cv. Merlot enxertadas em Paulsen 1103. Em mudas micropropagadas, verificou-se que a inoculação com *Bacillus* sp. F62 reduziu a incidência de "*Cylindrocarpon*" sp. em ambos os porta-enxertos avaliados. Similarmente, Baumgartner & Warnock (2006) verificaram que *B. subtilis* promoveu inibição do crescimento de *Armillaria mellea*, causador da podridão de raízes em videira. No entanto, resultados a campo indicaram

que os tratamentos não preveniram a infecção, mas podem auxiliar no controle e na manutenção da produtividade em videiras doentes. Outro estudo desenvolvido em ferimentos de poda de videira das cultivares Merlot e Chenin blanc demonstrou o antagonismo de *B. subtilis* sobre os fungos *N. australe*, *N. parvum*, *D. seriata*, *L. theobromae*, *E. lata*, *P. chlamydospora* e *P. viticola*, com baixa incidência desses fungos em reisolamento realizado oito meses após início do ensaio (Kotze *et al.*, 2011). Ainda, corroborando nossos resultados, Rezgui *et al.* (2016) reportaram que *B. subtilis* B6 inibiu a porcentagem de necrose ocasionada por *N. parvum* em 35% quando comparado a estacas controle de videira cv. Muscat d'Italie enxertadas em Paulsen 1103, inoculadas apenas com o fungo fitopatogênico.

O mecanismo de ação fungicida envolve a formação de poros na membrana e na parede celular fúngica e a desintegração de organelas e ácidos nucleicos (Zhao *et al.*, 2013). Além disso, bactérias promotoras de crescimento de plantas produzem sideróforos, enzimas líticas (β -1,3-glucanases, quitinases, etc.) e enzimas oxidativas que reduzem o crescimento de fitopatógenos presentes na rizosfera (Van Loon & Bakker, 2005). As enzimas oxidativas são responsáveis por mudanças estruturais na célula: a fenilalanina amônia-liase (PAL) desempenha um importante papel na produção de lignina e de flavonoides; a polifenol oxidase (PPO) atua na ativação do sistema de defesa contra fitopatógenos e na catálise em reações oxidativas em compostos fenólicos (Shafi *et al.*, 2017).

Diferentes estudos têm demonstrado uma relação positiva entre a aplicação de *Bacillus* spp. e a indução de resistência contra micro-organismos fitopatogênicos. Akram & Anjum (2011) investigaram o mecanismo de ação de *B. fortis* e *B. subtilis* contra *Fusarium* em tomates e verificaram um aumento na concentração das enzimas fenilalanina amônia-liase, polifenol oxidase e peroxidase envolvidas na resistência sistêmica. O emprego de suspensão de *B. subtilis* em ginseng induziu a formação de periderme nos ferimentos em raízes desafiadas com *C. destructans* (Jang *et al.*, 2011). Resultados similares foram obtidos por Gupta *et al.* (2000) empregando filtrado de *B. subtilis* linhagem FZB-G que atuou na transdução de sinal e na ativação de genes relacionados à defesa em tomateiros.

A ativação de mecanismos de defesa é o principal efeito de rizobactérias na supressão de doenças em plantas (Iniguez *et al.*, 2005). Além disso, modificações químicas e estruturais estão envolvidas na redução da infecção por fitopatógenos como o aumento na deposição de parede celular, obstrução de espaços intercelulares e de células epidermais com compostos osmofílicos que dificultam a colonização fúngica (Shafi *et al.*, 2017). Dessa forma, diferentes mecanismos de ação de *Bacillus* sp. atuam na redução da incidência de fitopatógenos.

Em síntese, *Bacillus* sp. F62 auxiliou na promoção do crescimento principalmente em mudas micropropagadas e promoveu o biocontrole *in vitro* e *in vivo* de “*Cylindrocarpon*” sp. em estacas e mudas micropropagadas, tanto em Paulsen 1103 quanto em SO4. Dessa forma, *Bacillus* sp. F62 se caracteriza como potencial bioagente a ser utilizado na produção de mudas de videira, visando tanto à proteção contra “*Cylindrocarpon*” sp. quanto à promoção de crescimento de plantas. Além disso, outros estudos devem ser conduzidos para avaliar a indução de resistência em mudas de videira e compreender, de forma mais ampla, os mecanismos de ação deste bioagente na proteção ao desenvolvimento do pé-preto.

4.5 REFERÊNCIAS

- Abreo, E.; Martinez, S.; Bettucci, L.; Lupo, S. (2010). Morphological and molecular characterization of *Campylocarpon* and *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot disease of grapevines in Uruguay. **Australas. Plant. Pathol.** 39: 446-452.
- Akram, W.; Anjum, T. (2011). Quantitative changes in defense system of tomato induced by two strains of *Bacillus* against *Fusarium* wilt. **Indian J. Fund. Appl. Life Sci.** 1: 7–13.
- Alfonzo, A.; Conigliaro, G.; Torta, L.; Burruano, S.; Moschetti, G. (2009). Antagonism of *Bacillus subtilis* strain AG1 against vine wood fungal pathogens. **Phytopathol. Med.** 48:155–158.
- Aroca, A.; Gramaje, D.; Armengol, J.; García-Jiménez, J.; Raposo, R. (2010). Evaluation of grapevine nursery process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. **Eur. J. Plant Pathol.** 126: 165–174.
- Agustí-Brisach, C.; Armengol, J. (2013). Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. **Phytopathol. Mediterr.** 52: 245–261.
- Baumgartner, K.; Warnock, A. E. (2006). A soil inoculant inhibits *Armillaria mellea* *in vitro* and improves productivity of grapevines with root disease. **Plant Dis.** 90: 439-444.
- Benitez, L. B.; Velho, R. V.; Lisboa, M. P. (2010). Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. **J. Microbiol.** 48: 791–797.
- Boubakri, H.; Hadj-Brahim, A.; Schmitta, C.; Soustre-Gacougnolle, I.; Mliki, A. (2015). Biocontrol potential of chenodeoxycholic acid (CDCA) and endophytic *Bacillus subtilis* strains against the most destructive grapevine pathogens. **N. Z. J. Crop Hortic. Sci.** 4: 261-274.
- Cao, Y.; Xu, Z.; Ling, N. (2012). Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. **Sci Hortic.** 135: 32–39.

- Chaurasia, B.; Pandey, A.; Palni, L. M. S.; Trivedi, P.; Kumar, B.; Colvin, N. (2005). Diffusible and volatile compounds produced by antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. **Microbiol. Res.** 160: 75-81.
- Compant, S.; Clement, C.; Sessitsch, A. (2010). Plant growth promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants. Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biol. Biochem.** 42: 669–678.
- Correia, K. C.; Câmara, M. P. S.; Barbosa, M. A. G.; Sales, J. R.; Agustí-Brisach, C.; Gramaje, D.; León, M.; García-Jiménez, J.; Abad-Campos, P.; Armengol, J.; Michereff, S. J. (2013). Fungal trunk pathogens associated with table grape decline in Northeastern Brazil. **Phytopathol. Mediterr.** 52: 380-387.
- Ferreira, J. H. S.; Matthee, F. N.; Thomas, A. C. (1991). Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. **Phytopathol.** 81: 283-287.
- Furuya, S.; Mochizuki, M.; Aoki, Y.; Kobayashi, H.; Takayanagi, T.; Shimizu, M.; Suzuki, S. (2011). Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KS1 for the biocontrol of grapevine fungal diseases. **Biocontrol Sci. and Technol.** 21: 705–720.
- Garrido, L. R.; Sônego, O. R.; Urben, Gomes, V. N. (2004). Fungos associados com o declínio e morte de videiras no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatol. Bras.** 29: 322-324.
- Gong, Q.; Zhang, C.; Lu, F. (2014). Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. **Food Control.** 36: 8–14.
- Gramaje, D. (2016). Uso de la termoterapia con agua caliente para el control de enfermedades fúngicas de lamadera. **Vida Rural.** 1: 48-57.
- Gramaje, D.; Alaniz, S.; Abad-Campos, P.; García-Jiménez, J.; Armengol, J. (2016). Evaluation of grapevine rootstock against soilborne pathogens associated with trunk diseases. **Acta Hort.** 1136: 245-250.
- Gramaje, D.; Armengol, J. (2011). Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. **Plant Dis.** 95: 1040–1055.
- Gupta, V.; Bochow, H.; Dolej, S. (2000). Ein das Pflanzenwachstum fördernder *Bacillus subtilis*-Stamm als potentieller Resistenzinduktor gegen die *Fusarium*-Welke an Tomaten [Plant growth-promoting *Bacillus subtilis* strain as potential inducer of systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt]. **J. Plant Dis. Prot.** 1: 145–154.
- Haichar, F. Z.; Marol, C.; Berge, O.; Rangel-Castro, J. I. Prosser, J. I.; Balesdent, J.; Heulin, T.; Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME J.** 2: 1221-1230.
- Halleen, F.; Crous, P. W.; Petrini, O. (2003). Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. **Austral. Plant Pathol.** 32: 47-52.

- Halleen, F.; Fourie, P. H. (2016). An integrated strategy for the proactive management of grapevine trunk disease pathogen infections in grapevine nurseries. **S. Afr. J. Enol. Vitic.** 37: 104-114.
- Hallmann, J.; Berg, B. (2007). **Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes**. In: Schulz, B. J. E.; Boyle, C. J. C.; Sieber, T. N. (Eds). **Microbial root endophytes**. Springer, Berlin, Germany, pp. 15–31.
- Iniguez, A. L.; Dong, Y.; Carter, H. D.; Ahmer, B. M. M.; Stone, J. M.; Triplett, E. W. (2005). Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 18: 169-178.
- Jang, Y.; Kim, S. G.; Kim, Y. H. (2011). Biocontrol efficacies of *Bacillus* species against *Cylindrocarpon destructans* causing ginseng root rot. **Plant Pathol. J.** 27: 333-341.
- Kejela, T.; Thakkar, V. R.; Patel, R. R. (2017). A novel strain of *Pseudomonas* inhibits *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* infections and promotes germination of coffee. **Rhizosphere.** 4: 9-15.
- Kocsis, L.; Tarczal, E.; Kocsisné, G. M. (2016). Grapevine rootstock-scion interaction on root system development. **Acta Hort.** 1136: 27-31.
- Kotze, C.; Van Niekerk, J.; Mostert, L.; Halleen, F.; Fourie, P. (2011). Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. **Phytopathol. Mediterr.** 50: S247–S263.
- Lopez-Valdez, F.; Fernandez-Luqueno, F.; Ceballos-Ramírez, J. (2011). A strain of *Bacillus subtilis* stimulates sunflower growth (*Helianthus annuus* L.) temporarily. **Sci. Hort.** 128: 499–505.
- Lutenberg, B.; Kamilova, F. (2009). Plant growth promoting rhizobacteria. **Annu. Ver. Microbiol.** 63: 541-556.
- Maguire, J. D. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigours. **Crop Sci.** 2: 176-177.
- Murashige, T.; Skoog, F. A. (1962). A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiol.** 15: 473-479.
- Nain, L.; Yadav, R.; Saxena J. (2012). Characterization of multifaceted *Bacillus* sp. RM-2 for its use as plant growth promoting bioinoculant for crops grown in semi arid deserts. **Appl. Soil Ecol.** 59: 124–135.
- Ollat, N.; Bordenave, L.; Tandonnet, J. P.; Boursiquot, J. M.; Marguerit, E. (2016). Grapevine rootstocks: origin and perspectives. **Acta Hort.** 1136: 11-22.
- Oliveira, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tratamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

- Santos, R. F. Dos; Durigon, M. R.; Blume, E. (2015). Aggressiveness of “*Cylindrocarpon*” spp. and *Cylindrocarpon pauciseptatum* associated with black foot disease of grapevine. **Rev. Bras. Cienc. Agr.** 10: 49-53.
- Rezgui, A.; Ben Ghnaya-Chakroun, A.; Vallance, J.; Bruez, E.; Hajlaoui, M. R.; Sadfi-Zouaoui, N.; Rey, P. (2016). Endophytic bacteria with antagonistic traits inhabit the wood tissues of grapevines from Tunisian vineyards. **Biol. Control.** 99: 28-37.
- Romero. D.; de Vicente, A.; Rakotoaly, R. H. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 20: 430–440.
- Russi, A. R.; Nalin, R.; Dequigiovanni, G.; Gava, R.; Quecini, V.; Garrido, L.R.; Ritschel, P. (2010). Study of the genetic variability of Brazilian populations of *Cylindrocarpon* spp., causal agent of grapevine black foot. **Phytopathol. Mediterr.** 49:111–112.
- Santos, R. F. Dos; Heckler, L. I.; Lazarotto, M.; Garrido, L. Da R.; Rego, C.; Blume, E. (2014). First report of “*Cylindrocarpon*” *macrodidyma* associated with black foot disease of grapevine in Brazil. **Plant Dis.** 98: 156-156.
- Santos, R. F. Dos; Blume, E.; Muniz, M. F. B.; Heckler, L. I.; Finger, G.; Harakawa, R.; Garrido, L. Da R. (2016). *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* for control of *Dactylonectria macrodidyma* in grapevine. **Phytopathol. Mediterr.** 55: 293–300.
- Shafi, J.; Tian, H.; Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnol. Biotechnol. Equip.** 1: 446-459.
- Sotoyama, K.; Akutsu, K.; Nakajima, M. (2016). Biologicak control of *Fusarium* wilt by *Bacillus amyloliquefaciens* IUMC7 isolated from mushroom compost. **J. Gen. Plant Pathol.** 82: 105-109.
- Srivastava, L. M. (2002). **Plant growth and development: hormones and environment.** San Diego (CA): Academic Press, 319 p.
- Van Loon L. C.; Bakker, P. A. H. M. (2005). **Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria.** In: Siddiqui, Z. A. (Ed). **PGPR: biocontrol and biofertilization.** Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 39–66.
- Waite, H.; Whitelaw-Weckert, M.; Torley, P. (2015). Grapevine propagation: principles and methods for the production of high-quality grapevine plant material. **New Zeal. J. Crop Hort. Sci.** 43: 144-161.
- Wicaksono, W. A.; Jones, E. E.; Monk, J.; Ridgway, H. J. (2017). Using bacterial endophytes from a New Zealand native medicinal plant for control of grapevine trunk diseases. **Biol. Control.** 114: 65-72.
- Zhao, X.; Zhou, Z-J.; Han, Y. (2013). Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. **Microbiol. Res.** 168: 598–606.

4.6 MATERIAL SUPLEMENTAR (MS1)

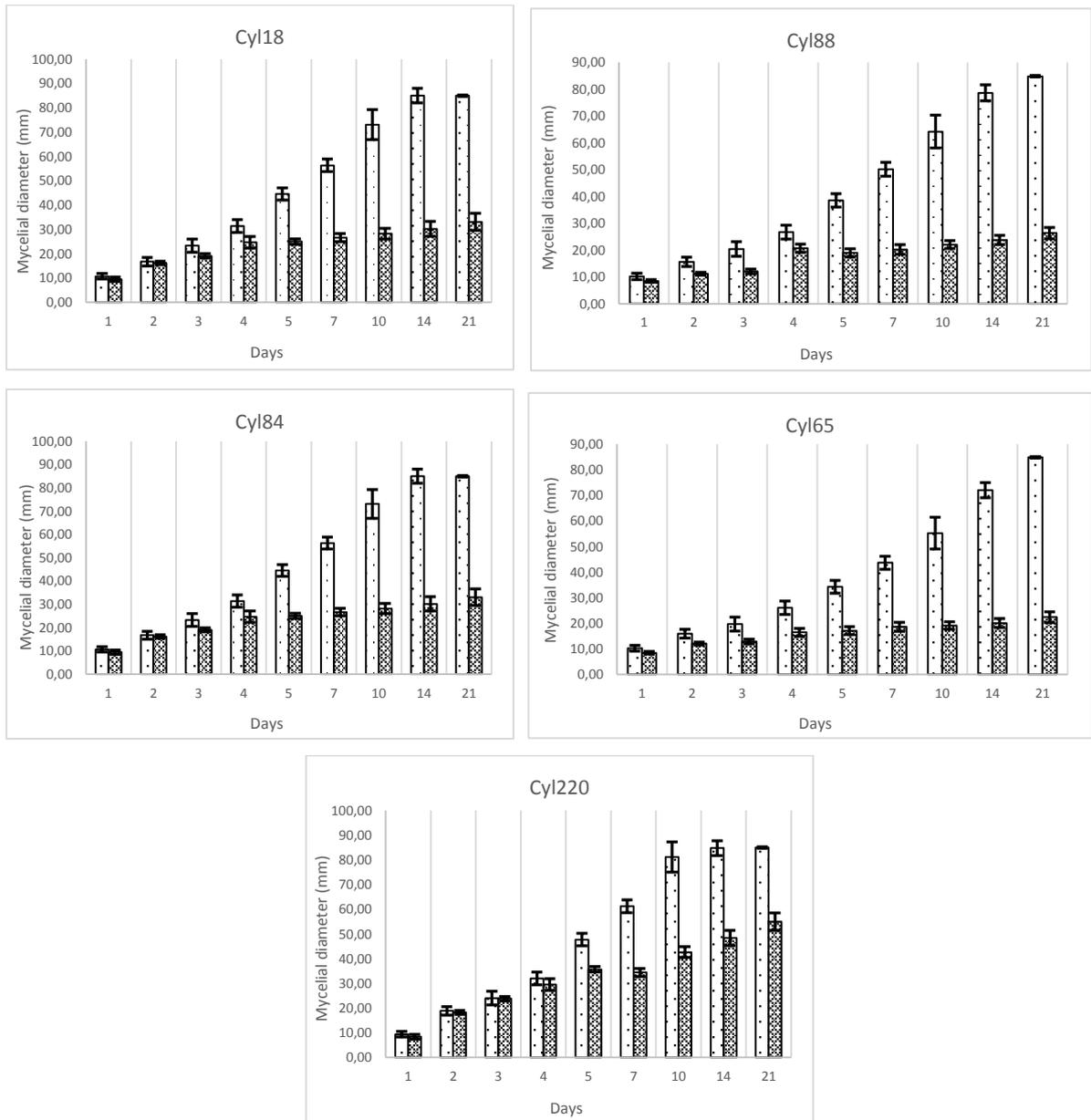


Gráfico do diâmetro micelial de isolados de "*Cylindrocarpon*" sp., ao longo dos 21 dias de incubação em meio BDA, no ensaio de antagonismo por compostos difusíveis em dois tratamentos distintos: controle e Cyl + Bac.

4.7 MATERIAL SUPLEMENTAR (MS2)

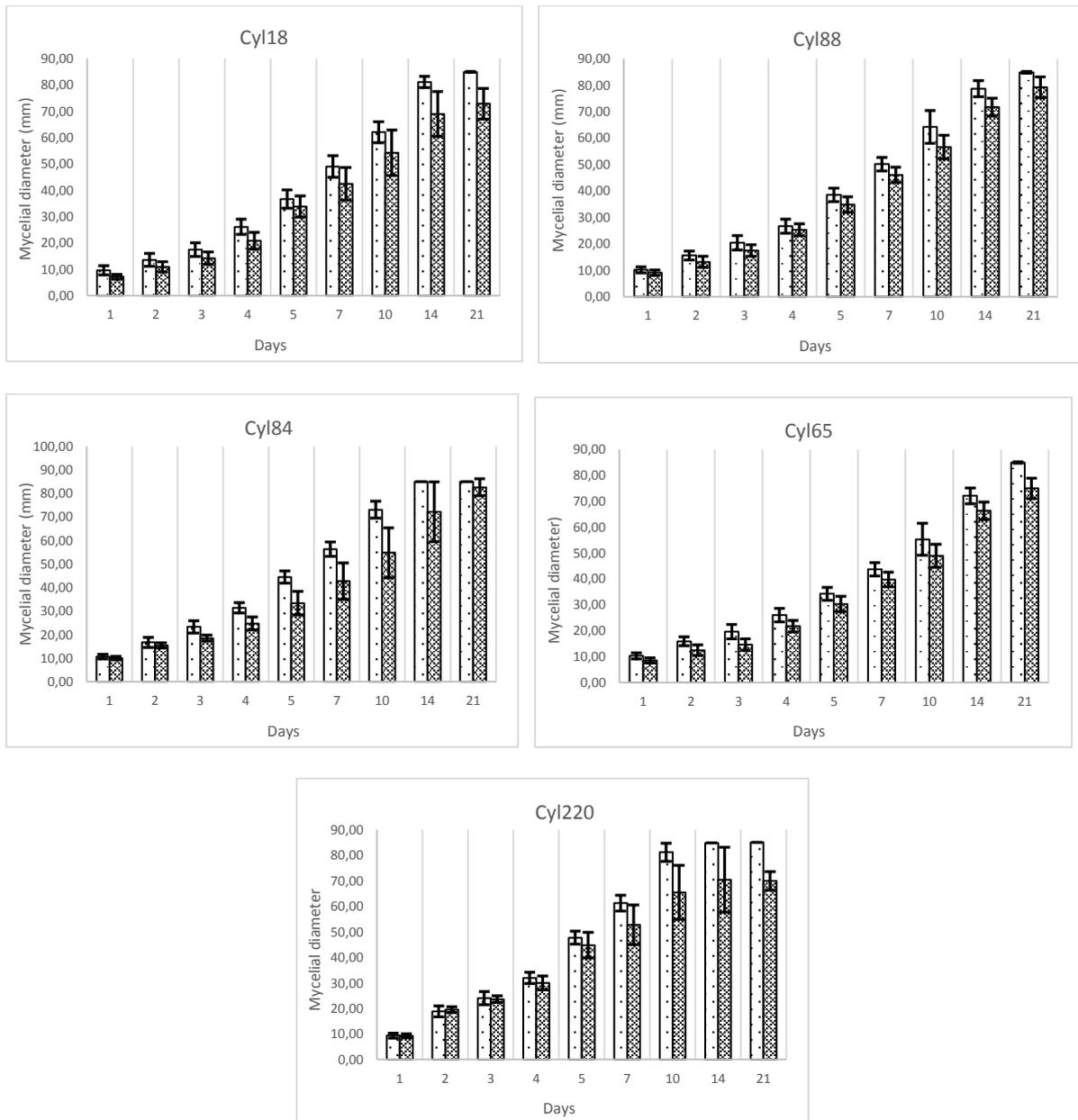


Gráfico do diâmetro micelial de isolados de “*Cylindrocarpon*” sp., ao longo dos 21 dias de incubação em meio BDA, no ensaio de antagonismo por compostos voláteis em dois tratamentos distintos: controle e Cyl + Bac.

5. CAPÍTULO 2

***Bacillus* sp. F62 no biocontrole de *Fusarium* sp. e na promoção do crescimento do porta-enxerto de videira SO4**

Alessandra Russi, Marcus André Kurtz Almança, Daniel Santos Grohs, Joséli Schwambach

Resumo

A fusariose é uma doença fúngica que afeta a viticultura, causando significativas perdas econômicas. Além disso, seu agente causador *Fusarium* sp. tem sido associado ao declínio e morte de videiras. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antagonístico de *Bacillus* sp. linhagem F62 sobre o crescimento micelial e a germinação de conídios de quatro isolados de *Fusarium* sp., bem como a promoção do crescimento e o biocontrole do fitopatógeno em estacas e mudas micropropagadas do porta-enxerto SO4 (*Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*). No ensaio *in vitro*, foi avaliado o antagonismo de *Bacillus* sp. F62 através de compostos difusíveis e de compostos voláteis, além do percentual de germinação de conídios em meio contendo suspensão bacteriana ou filtrado de seus metabólitos. No ensaio *in vivo*, estacas e mudas micropropagadas foram submetidas a diferentes tratamentos: Controle, Bac, Bac + Fus e Fus. A inibição do crescimento micelial ocorreu através dos difusíveis (inibição de 51,30%), enquanto compostos voláteis não apresentaram efeito significativo. Em relação à germinação de conídios, tanto o tratamento com suspensão bacteriana quanto o filtrado inibiram a germinação. Nos ensaios *in vivo*, verificou-se a ação de *Bacillus* sp. F62 na promoção do crescimento em estacas e mudas micropropagadas de SO4 e no biocontrole de *Fusarium* sp., com redução do percentual de reisolamento fúngico de 17,6% em estacas e 52,4% em mudas micropropagadas. Os resultados demonstram o potencial de *Bacillus* sp. F62 no desenvolvimento vegetal e no biocontrole *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium* sp. no porta-enxerto SO4.

Palavras-chave: Bioagente, Fusariose, *Vitis* sp., Controle biológico

5.1 INTRODUÇÃO

A fusariose da videira é causada pelo fungo de solo *Fusarium* spp. Schlecht. que causa apodrecimento de raízes e murchamento de plantas, afetando principalmente regiões vitícolas de clima quente (Dean *et al.*, 2012; Compant *et al.*, 2013). Além disso, o fungo tem sido associado ao declínio e morte precoce de videiras (Halleen *et al.*, 2003; Garrido *et al.*, 2004; Waite *et al.*, 2015), gerando perdas significativas à viticultura.

O fungo *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis* Tochetto foi detectado pela primeira vez no Brasil, em 1954, em *Vitis labrusca* (Sônego *et al.*, 2005). Na Austrália, *F. oxysporum* causou

podridão radicular e diminuição do volume de raízes que resultaram em brotações fracas e tardias, bem como na baixa produtividade de vinhedos (Highet & Nair, 1995). Na África do Sul, *Fusarium* sp. foi isolado de mudas de videira em viveiros apresentando sintomas de declínio (Halleen *et al.*, 2003). *F. oxysporum* também foi detectado em viveiros na Polônia (Król, 2006) e no Egito (Ziedan *et al.*, 2011).

O gênero *Fusarium* infecta as videiras através de ferimentos em raízes, causando o murchamento da planta, escurecimento longitudinal dos ramos, amarelecimento e desprendimento de folhas (Sônego *et al.*, 2005; Dean *et al.*, 2012). Ao penetrar no sistema vascular das plantas, o fungo provoca o bloqueio do xilema, podendo causar a morte da planta pela obstrução do transporte de água e nutrientes (Eljounaidi *et al.*, 2016).

O controle da fusariose baseia-se no emprego de porta-enxertos resistentes (Sônego *et al.*, 2005) e no uso de defensivos químicos, os quais podem causar danos ao meio ambiente e à saúde humana, além de contribuir para a seleção de espécies resistentes de fitopatógenos (Boubakri *et al.*, 2015; Kejela *et al.*, 2017). Ademais, *Fusarium* spp. produz estruturas de resistência que podem persistir no solo por longos períodos, dificultando o controle da doença (Yadeta & Thomma, 2013).

O emprego de rizobactérias endofíticas como *Bacillus* spp. representa uma alternativa no controle da fusariose. O mecanismo de ação dessa bactéria envolve a promoção do crescimento e da produtividade de culturas (Ahemad & Kibret, 2014; Eljounaidi *et al.*, 2016; Shafī *et al.*, 2017) e o biocontrole de fitopatógenos (Compant *et al.*, 2013; Boubakri *et al.*, 2015; Clemente *et al.*, 2016). Sendo este último baseado na competição por espaço e nutrientes, bem como pela síntese de antibióticos e pela indução da resistência no hospedeiro (Tokpah *et al.*, 2016).

Resultados positivos no biocontrole de *Fusarium* sp. na videira foram obtidos empregando *Streptomyces* spp. (Ziedan *et al.*, 2010) e *Pseudomonas fluorescens* (Ziedan & El-Mohamedy, 2008; Svercel *et al.*, 2010). Similarmente, foram relatados efeitos antagonísticos de *B. subtilis* em *F. oxysporum* f. sp. *lentis* (El-Hassan & Gowen, 2006), *Bacillus* sp. e *Burkholdeira* sp. em *F. circinatum* em *Pinus* (Soria *et al.*, 2012), *B. subtilis* em *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Ramyabharathi *et al.*, 2016), *Pseudomonas* sp. em *F. oxysporum* em café (Kejela *et al.*, 2017). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação antagonística de *Bacillus* sp. linhagem F62 no biocontrole *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium* sp. bem como o potencial bacteriano na promoção do crescimento do porta-enxerto SO4 (*Vitis berlandieri* x *V. riparia*).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Agente de controle biológico e isolados fúngicos

No ensaio *in vitro* foram utilizados quatro isolados de *Fusarium* sp. (FusA93-09, FusA44-11, FusA49-10 e FusA12-15) provenientes da micoteca do Laboratório de Controle Biológico de Doenças de Plantas da Universidade de Caxias do Sul. Os conídios foram obtidos de colônias cultivadas por 14 dias em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. As placas foram lavadas com água destilada e autoclavada e a suspensão obtida foi ajustada em 10^5 conídios.mL⁻¹, com adição de Tween 20.

O agente de biocontrole *Bacillus* sp. linhagem F62, proveniente do Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Caxias do Sul, foi incubado em 100 mL de caldo BD (Batata-Dextrose), a 27°C, durante 24 horas em um agitador orbital. Em seguida, as células foram centrifugadas a 12.000×g durante 10 minutos, sendo o precipitado celular reservado e o sobrenadante descartado.

5.2.2 Ensaio de antagonismo *in vitro*: crescimento micelial

O efeito de *Bacillus* sp. F62 sobre o crescimento micelial foi avaliado em dois ensaios distintos, empregando delineamento inteiramente casualizado. O ensaio de cultivo pareado consistiu na inoculação de um disco de 6 mm de diâmetro de micélio fúngico com 10 dias no centro de uma placa de Petri contendo meio BDA. Decorridas 24 horas, foram adicionados 25 µL de suspensão de *Bacillus* sp. F62 (10^6 UFC.mL⁻¹) em quatro pontos equidistantes. O ensaio de inibição compostos voláteis consistiu no emprego de duas placas de Petri, contendo meio BDA, sobrepostas e seladas com parafilme. No centro da placa superior foi inoculado um disco de 6 mm de diâmetro de ágar coletado de cultura fúngica com 10 dias e na placa inferior foi espalhado 100 µL de suspensão de células de *Bacillus* sp. F62 (10^6 UFC.mL⁻¹). As placas foram incubadas a 25°C, no escuro, durante 21 dias. Foram efetuadas medições ortogonais do diâmetro das colônias diariamente na primeira semana e, posteriormente, no 10° e 14° dia. Para avaliar o percentual de inibição do crescimento micelial utilizou-se como referência o tratamento controle contendo apenas o fungo, sem adição da suspensão bacteriana. Em ambos os testes, foram realizadas 10 replicatas para cada isolado fúngico e para o controle. Os dados obtidos foram utilizados no cálculo do Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), conforme fórmula de Maguire (1962), adaptada por Oliveira (1991) sendo, portanto, IVCM =

$\Sigma(D-Da)/N$, onde, D = diâmetro médio atual da colônia; Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior; N = número de dias após a inoculação.

5.2.3 Ensaio de antagonismo *in vitro*: germinação de conídios

Para investigar a ação de *Bacillus* sp. F62 sobre a germinação de conídios dos isolados fúngicos, a bactéria foi cultivada durante 48 h em caldo BD (200 g.L⁻¹ de caldo de batata e 20 g.L⁻¹ de dextrose) a 28°C, em agitador a 150 rpm. Posteriormente, a cultura foi centrifugada a 3.500xg por 5 min a 23°C. O pellet bacteriano foi lavado três vezes com água estéril e ressuspendido em solução NaCl 0,85% e a concentração bacteriana foi ajustada para 10⁵ UFC.mL⁻¹. O filtrado livre de células foi obtido do sobrenadante do cultivo bacteriano após filtração em membrana de 0,22 µm. A germinação de conídios foi realizada em frascos contendo 50 mL de caldo BD, em agitador orbital a 130 rpm, a 28°C, durante 24 horas, em três diferentes tratamentos para cada isolado: Controle = 10⁵ conídios.mL⁻¹; Fungo + Bac = 10⁵ conídios.mL⁻¹ + 10⁵ UFC.mL⁻¹ de suspensão bacteriana; Fungo + Filtrado = 10⁵ conídios.mL⁻¹ + 10 mL de filtrado bacteriano. O experimento foi realizado em triplicata. Decorridas 24 horas do início do ensaio, a contagem de conídios foi realizada em hemocitômetro, empregando-se 10 µL da suspensão. Foram considerados germinados os conídios que apresentavam pelo menos o dobro do tamanho original e foi calculado o percentual de germinação em relação ao controle.

5.2.4 Ensaio *in vivo* em estacas

Material vegetativo do porta-enxerto SO4 foi coletado na Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS e mantido em câmara fria durante 60 dias. Estacas com aproximadamente 30 cm de comprimento, 12 mm de diâmetro e três gemas foram selecionadas para o experimento. A gema basal e a apical foram mantidas; a intermediária foi removida. Após hidratação em água destilada e autoclavada durante 24 horas, as estacas foram submetidas a tratamento com água quente, conforme descrito por Gramaje (2016). Em seguida, as estacas foram dispostas em câmara de forçagem a 28°C e 70% de umidade relativa, durante 15 dias. Posteriormente, as estacas foram aclimatadas a temperatura ambiente, durante cinco dias e transferidas para tubetes contendo 250 mL de substrato autoclavado (turfa sphagnum 90% e vermiculita 10%) e adição de 5 g.L⁻¹ de fertilizante de liberação controlada (5 a 6 meses).

Para o ensaio *in vivo* foi selecionado o isolado FusA49-10, que apresentou comportamento intermediário no antagonismo por *Bacillus* sp. F62. A suspensão com

5.10^5 conídios.g⁻¹ de substrato foi preparada de acordo com Santos *et al.* (2016) e a bactéria foi inoculada na concentração 10^4 UFC.g⁻¹ de substrato. Após plantio em tubete e transferência para estufa, 30 estacas de cada porta-enxerto foram submetidas a quatro tratamentos distintos, com aplicação de 10 mL de suspensão no substrato: Controle = água destilada e autoclavada; Bac = *Bacillus* sp. F62 (1° e 14° dias); Bac + Fus = *Bacillus* sp. F62 (1° e 14° dias) e FusA49-10 (7° dia) + Fus = FusA49-10 (7° dia).

O experimento foi mantido em casa de vegetação durante 160 dias conforme descrito por Gramaje *et al.* (2016). Decorrido esse período, foram mensurados o comprimento do broto primário (CBP), número de nós do broto primário (NBP), número de brotos totais (BT), número de nós totais (NT), massa seca da parte aérea (MSA) e das raízes (MSR). A massa seca foi determinada após secagem do material vegetal em ventilação forçada a 60°C, até obtenção de massa constante. O reisolamento de patógenos foi realizado empregando-se oito fragmentos do colo das estacas distribuídos em duas placas de Petri. A desinfestação e incubação dos fragmentos de estacas foram realizadas conforme Santos *et al.* (2016).

5.2.5 Ensaio *in vivo* em mudas micropropagadas

Inicialmente foram coletadas brotações de estacas de SO4 previamente submetidas a tratamento com água quente. Na desinfestação, os brotos foram imersos em álcool 70% (v/v) durante 1 minuto, em hipoclorito de sódio 1% (v/v), contendo 0,02% (v/v) de Tween 20, durante 20 minutos e lavados três vezes por imersão em água estéril. Os propágulos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 12 mL de meio MS/2 (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de ágar, 1 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e o pH foi ajustado para 5,8. Os explantes foram submetidos a dois subcultivos e as plântulas foram enraizadas em meio MS/2, suplementado com 15 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de ágar e 0,1 µg.L⁻¹ de ANA (ácido α -naftalenoacético). O crescimento foi realizado a 25 °C \pm 2 °C, 70% de umidade relativa, com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 72 µmol.m⁻²s⁻¹ proveniente de lâmpadas fluorescentes. Plântulas com aproximadamente quatro folhas e sistema radicular bem desenvolvido foram transferidas para copos plásticos contendo 180 mL de substrato autoclavado (turfa sphagnum 90% e vermiculita 10%) e aclimatizadas durante 30 dias a 23-28 °C, umidade relativa superior a 60% e intensidade luminosa de 400 µmol.m⁻²s⁻¹.

O ensaio *in vivo* com mudas micropropagadas de SO4 foi realizado em triplicata com 20 repetições por tratamento e o delineamento foi inteiramente casualizado. As concentrações de *Bacillus* sp. e *Fusarium* sp. foram iguais às empregadas no experimento com estacas. As

plântulas, imediatamente após transferência para aclimatização, foram submetidas a quatro tratamentos, com aplicação de 4 mL de suspensão no substrato: Controle = água destilada e autoclavada; Bac = *Bacillus* sp. F62 (1° e 14° dias); Bac + Fus = *Bacillus* sp. F62 (1° e 14° dias) + FusA49-10 (7° dia) e Fus = FusA49-10 (7° dia).

As replicatas de cada ensaio foram avaliadas em três períodos distintos: início do ensaio; 30 dias depois: determinação da variação do número de folhas (ΔFol1) e da variação comprimento da parte aérea (ΔCompr1); 160 dias depois: medição da variação do número de folhas (ΔFol2), variação do comprimento da parte aérea (ΔCompr2), massa seca da parte aérea (MSA), massa seca de raízes (MSR) e percentual de reisolamento fúngico (RF).

5.2.6 Análise estatística

Os tratamentos dos ensaios *in vitro* foram comparados através do teste t com $p \leq 0,05$. Os isolados fúngicos foram comparados entre si através de ANOVA, seguido de comparação de média por teste de Tukey com $p \leq 0,05$. Para os ensaios *in vivo*, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para avaliar a normalidade dos dados. Posteriormente, os dados normais foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey com $p \leq 0,05$, utilizando programa de estatística SPSS® 22.0.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Ensaio de antagonismo *in vitro*

Dos quatro isolados de *Fusarium* sp. avaliados no ensaio de antagonismo *in vitro* verificou-se Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) médio de 5,10 para o controle no ensaio de antagonismo por compostos difusíveis. Esses mesmos isolados fúngicos submetidos ao tratamento com *Bacillus* sp. F62 em cultivo pareado, apresentaram redução no índice em relação ao controle, com média de IVCM de 2,05 (Tabela 1).

O crescimento micelial e o IVCM em cultivo pareado foi reduzido significativamente em relação ao controle e variou entre os isolados de 1,47 (FusA44-11) a 2,72 (FusA93-09), enquanto o Percentual de inibição do crescimento micelial (PICM) em relação ao controle apresentou valor médio de 51,30% (Tabela 1 e Material suplementar 1).

Tabela 1. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e Percentual de inibição do crescimento micelial (PICM) de quatro isolados de *Fusarium* sp. no ensaio de antagonismo por compostos difusíveis e voláteis de *Bacillus* sp. F62.

Isolados	IVCM		PICM*
	Controle	Fus + Bac	
	Antagonismo por difusíveis		
FusA93-09	5,12 ± 0,12aA	2,72 ± 0,27bA	35,35%
FusA44-11	5,28 ± 0,09aA	1,47 ± 0,34bC	63,62%
FusA49-10	5,16 ± 0,11aA	1,81 ± 0,88bBC	56,42%
FusA12-15	5,10 ± 0,22aA	2,15 ± 0,30bAB	49,84%
Média	5,10 ± 0,12a	2,05 ± 0,42b	51,30%
	Antagonismo por voláteis		
FusA93-09	5,11 ± 0,13aA	4,99 ± 0,97aB	0%
FusA44-11	5,27 ± 0,10aA	5,38 ± 0,14aA	0%
FusA49-10	5,06 ± 0,11aA	4,94 ± 0,18aB	0%
FusA12-15	5,09 ± 0,24aA	4,97 ± 0,34aB	7,15%
Média	5,13 ± 0,14a	5,07 ± 0,41a	1,78%

* Calculado a partir dos dados de crescimento micelial no 14º dia de cultivo.

Análise estatística foi realizada separadamente nos ensaios de antagonismo por compostos voláteis e difusíveis. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos Controle e Fus + Bac através do teste t com $p \leq 0,05$. Letras maiúsculas iguais indicam que os isolados de *Fusarium* sp. não diferiram entre si através de ANOVA seguida de teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

No ensaio de compostos voláteis, os quatro isolados submetidos ao tratamento controle apresentaram IVCM médio de 5,13, enquanto, no tratamento com compostos voláteis de *Bacillus* sp. F62 verificou-se IVCM médio de 5,07, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (Tabela 1 e Material suplementar 2). O percentual de inibição do crescimento micelial (PICM) determinado no último dia de avaliação do ensaio foi nulo para três isolados de *Fusarium* sp. e apenas FusA12-15 sofreu inibição de 7,15% em seu diâmetro em relação ao controle. Apesar do antagonismo por compostos voláteis não ter sido significativo, esses compostos sintetizados por *Bacillus* sp. F62 induziram anormalidades na estrutura micelial dos isolados fúngicos avaliados (Figura 1A-B).



Figura 1. Crescimento micelial de *Fusarium* sp. isolado FusA49-10, no décimo quarto dia de crescimento, em condições de antagonismo por compostos difusíveis (A) e compostos voláteis (B)

No ensaio de germinação de conídios, o controle apresentou germinação média de 90,74% esporos fúngicos após 24 horas do início do ensaio (dado não apresentado). No tratamento Fungo + Bac, os quatro isolados diferiram estatisticamente do controle, com percentual de inibição de germinação em relação ao controle variando entre 29,77% para FusA49-10 e 69,99% para FusA12-15 (Figura 2).

No tratamento Fungo + Filtrado, observou-se redução no PIGC em todos os isolados, com redução entre 16,82% (FusA93-09) a 62,23% (FusA12-15). Além disso, nos isolados FusA12-15 e FusA49-10 não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos Fungo + Bac e Fungo + Filtrado (Figura 2).

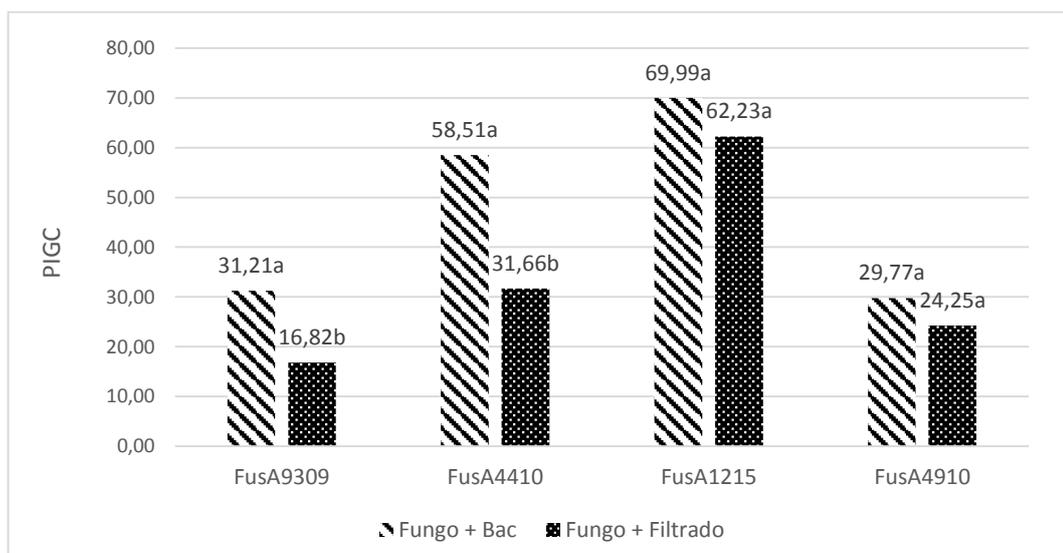


Figura 2. Percentual de Inibição da Germinação de Conídios (PIGC) de quatro isolados de *Fusarium* sp. em relação ao controle, em caldo BD, 24 horas após início do ensaio.

*Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa no teste t, com 5% de significância.

5.3.2 Ensaio *in vivo* em estacas

No ensaio *in vivo*, o tratamento com *Bacillus* sp. F62 em estacas de SO4 teve um efeito estatisticamente significativo em CBP, NBP e NT, enquanto as demais respostas BT, MSR e MSA não diferiram estatisticamente do controle (Tabela 2).

Para o ensaio de biocontrole *in vivo* foi selecionado o isolado FusA49-10 que apresentou comportamento intermediário no antagonismo por *Bacillus* sp. F62. No tratamento Bac + Fus, o bioagente proporcionou um aumento em CBP, NBP e MSA em relação ao tratamento Fus, minimizando os sintomas negativos de *Fusarium* sp. no porta-enxerto. Além disso, houve uma redução de 17,6% no reisolamento de *Fusarium* sp. em fragmentos da base de estacas (de 75,8% em Fus para 62,5% em Bac + Fus).

5.3.3 Ensaio *in vivo* em mudas micropropagadas

Em mudas micropropagadas de SO4, verificou-se um aumento significativo de Δ Compr1, Δ Fol2, Δ Compr2 e MSR, no tratamento Bac; enquanto as respostas Δ Fol1 e MSA não diferiram estatisticamente do controle (Tabela 3). Por outro lado, as plantas submetidas ao tratamento Fus apresentaram as respostas Δ Fol1, Δ Compr2 e MSA inferiores àquelas verificadas no controle, em decorrência da suscetibilidade à fusariose do porta-enxerto SO4.

O tratamento Bac + Fus promoveu aumento de todas as respostas avaliadas (Δ Fol1, Δ Fol2, Δ Compr1, Δ Compr2, MSA e MSR) em relação ao tratamento Fus. Ademais, houve uma redução no percentual de reisolamento de *Fusarium* sp. de 59,9% no tratamento Fus para 28,5% no tratamento Bac + Fus (diferença de 52,42%) (Tabela 3).

Tabela 2. Respostas em estacas do porta-enxerto de videira SO4: comprimento do broto primário (CBP), número de nós no broto primário (NBP), nós totais (NT), brotos totais (BT), massa seca da parte aérea (MSA), massa seca de raízes (MSR) e percentual de reisolamento fúngico (RF), em quatro tratamentos distintos: Controle, *Bacillus* sp. F62 (Bac), *Bacillus* + *Fusarium* sp. (Bac + Fus) e *Fusarium* sp. (Fus).

Tratamentos	CBP (cm)	NBP (cm)	NT	BT	MSA (g)	MSR (g)	RF (%)
Controle	222,0 ± 12,9bc	8,1 ± 0,3bc	8,8 ± 0,3b	1,2 ± 0,4a	2,2 ± 0,2a	2,1 ± 0,1ab	0,0 ± 0,0c
Bac	299,5 ± 7,7a	10,5 ± 0,2a	11,5 ± 0,3a	1,2 ± 0,4a	2,3 ± 0,1a	2,4 ± 0,1a	0,0 ± 0,0c
Bac + Fus	258,5 ± 8,7ab	9,7 ± 0,2ab	10,0 ± 0,3ab	1,1 ± 0,3a	2,3 ± 0,2a	2,0 ± 0,1ab	62,5 ± 2,1b
Fus	185,0 ± 7,1c	7,4 ± 0,2c	8,2 ± 0,3b	1,0 ± 0,3a	1,1 ± 0,1b	1,6 ± 0,1b	75,8 ± 1,5a

*Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey, com 5% de significância.

Tabela 3. Respostas em mudas micropropagadas do porta-enxerto de videira SO4: variação no número de folhas em 30 dias (Δ Fol1), variação no comprimento da parte aérea em 30 dias (Δ Compr1), variação no número de folhas em 160 dias (Δ Fol2), variação no comprimento da parte aérea em 160 dias (Δ Compr2), massa seca da parte aérea (MSA), massa seca de raízes (MSR) e percentual de reisolamento fúngico (RF), em quatro tratamentos distintos: Controle, *Bacillus* sp. F62 (Bac), *Bacillus* + *Fusarium* sp. (Bac + Fus) e *Fusarium* sp. (Fus).

Tratamentos	Δ Fol1	Δ Compr1 (cm)	Δ Fol2	Δ Compr2 (cm)	MSA (g)	MSR (g)	RF (%)
Controle	2,3 ± 0,1a	10,9 ± 0,3c	12,7 ± 0,3bc	592,9 ± 9,0b	3,6 ± 0,1a	1,7 ± 0,1c	0,0 ± 0,0c
Bac	2,6 ± 0,1a	23,4 ± 1,0 a	16,6 ± 0,6a	680,7 ± 13,2a	3,8 ± 0,1a	3,5 ± 0,1a	0,0 ± 0,0c
Bac + Fus	2,3 ± 0,1a	15,9 ± 0,5b	13,7 ± 0,3b	617,7 ± 12,1b	3,5 ± 0,1a	2,7 ± 0,1b	28,5 ± 2,4b
Fus	1,3 ± 0,1b	10,9 ± 0,5c	11,2 ± 0,2c	511,6 ± 14,2c	2,9 ± 0,1b	1,3 ± 0,1c	59,9 ± 2,7a

*Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa no teste de Tukey, com 5% de significância.

5.4 DISCUSSÃO

No corrente estudo, foi verificada significativa ação antagonística *in vitro* de *Bacillus* sp. linhagem F62 no cultivo pareado. Similarmente, Zhang *et al.* (2009) avaliaram o potencial antagonístico de 22 linhagens de *B. subtilis* sobre o crescimento micelial de *F. oxysporum* e *F. graminearum* e verificaram que todas as linhagens inibiram o crescimento micelial em relação ao controle de *F. oxysporum* (17 a 48%) e *F. graminearum* (10 to 32%). Soria *et al.* (2012) estudaram o efeito de quatro linhagens de *B. subtilis* e uma linhagem de *Burkholderia* no controle *in vitro* de *F. circinatum* e verificaram que metabólitos termostáveis reduziram a taxa de crescimento de alguns isolados fúngicos em mais de 50%. Os antibióticos produzidos por *B. subtilis* EPCO 16, também, inibiram o crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em 44,44% no cultivo pareado (Ramyabharathi *et al.*, 2016).

Corroborando nossos resultados, Ziedan *et al.* (2010) verificaram que sete linhagens de *Streptomyces* spp. apresentaram atividade antagonística contra *F. oxysporum* em cultivo pareado, com destaque para *Streptomyces alni* que promoveu maior inibição do crescimento fúngico e ocasionou má formação e lise de hifas. Em outro estudo, Pseudomonas sp. linhagem pf4 inibiu o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* em 41,67% e de *F. oxysporum* em 48,14% (Manjunatha *et al.*, 2012). Posteriormente, Kejela *et al.* (2017) avaliaram 40 isolados de *Pseudomonas* sp. e verificaram que o isolado PT11 apresentou inibição de 70% no controle de *C. gloeosporioides* e de 72% em *F. oxysporum* em cultivo pareado.

No presente estudo não foi verificada redução no crescimento micelial por compostos voláteis no ensaio *in vitro*. Diferentemente, Santos *et al.* (2016) verificaram inibição no crescimento micelial variando de 29,5% a 69,1% em *Dactylonectria macrodidyma* por compostos voláteis de *B. subtilis* e Wicaksono *et al.* (2017) observaram inibição $\geq 30\%$ no crescimento de espécies botriosferiáceas empregando compostos voláteis sintetizados por três linhagens distintas de *Pseudomonas* sp. Embora, não tenha sido detectada inibição no crescimento micelial no antagonismo por compostos voláteis, foram observadas anormalidades no desenvolvimento fúngico em relação ao controle. De forma similar, Chaurasia *et al.* (2005) reportaram alterações no micélio e em hifas de *Alternaria alternata*, *Cladosporium oxysporum*, *F. oxysporum* e *Pythium afertile* decorrentes da produção de compostos voláteis e difusíveis por *B. subtilis*.

Em relação à germinação de conídios, verificou-se que o emprego de suspensão bacteriana e o filtrado da cultura promoveram inibição na germinação de esporos de *Fusarium* sp. Similarmente, estudos conduzidos por Sotoyama *et al.* (2016) demonstraram que tanto a suspensão de *B. amyloliquefaciens* IUMC7 quanto o filtrado da cultura bacteriana inibiram a germinação de conídios de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Boubakri *et al.* (2015) confirmaram o efeito inibitório de *B. subtilis* linhagens Bs1 e Bs2 sobre o crescimento *in vitro* de *Botrytis cinerea* através de metabólitos filtrados, porém de forma menos expressiva que a inibição empregando células bacterianas. Os autores reportaram, ainda, que as linhagens Bs1 e Bs2 não inibiram a germinação de conídios de *Plasmopara viticola* em discos foliares de videira da cv. Chardonnay.

Diversos outros estudos descreveram o potencial de do filtrado da cultura bacteriana e seus metabólitos na inibição da germinação de conídios. Zhang *et al.* (2009) verificaram que metabólitos produzidos por dez linhagens de *B. subtilis* promoveram inibição de germinação de macroconídios com redução de 20% a 48% da germinação em *F. oxysporum* e de 14% a 32% em *F. graminearum* em relação ao controle. Benitez *et al.* (2010) observaram que *B. amyloliquefaciens* LBM 5006 reduziu a germinação de conídios e ocasionou o desenvolvimento anormal do tubo germinativo em *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Bipolaris sorokiniana*. Cao *et al.* (2012) reportaram que o uso *B. subtilis* SQR 9 inibiu germinação de conídios de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Resultados semelhantes foram verificados por Gong *et al.* (2014) que estudaram o efeito do metabólito bacilomicina em conídios e verificaram 96,63% de inibição sobre a germinação de esporos e 98,10% sobre a esporulação de *Aspergillus flavus*.

No ensaio em estacas de SO4, *Bacillus* sp. F62 apresentou efeito significativo na promoção do crescimento. Similarmente, Santos *et al.* (2016) reportaram um aumento no comprimento do broto primário (CBP) e no número de nós no broto primário (NBP) em videiras cv. Merlot enxertadas sobre Paulsen 1103 com um ano de idade quando tratadas com *B. subtilis* em relação ao controle. No entanto, os autores detectaram redução no número de nós totais (NT), brotos totais (BT), massa seca das raízes e da parte aérea (MSA e MSR). Por outro lado, Toffanin *et al.* (2016) avaliaram o efeito da bactéria promotora de crescimento *Azospirillum brasilense* Sp245 no enraizamento de estacas de SO4 e verificaram um incremento do número de raízes e da biomassa total quando tratadas na etapa de hidratação e antes da enxertia. No entanto, estacas tratadas durante a hidratação e após a forçagem não apresentaram aumento de biomassa estatisticamente significativo. Essa diferença nos resultados pode ser decorrente da forma pela qual se deu a colonização dos tecidos, da linhagem bacteriana empregada nos experimentos e da interação planta-bactéria.

No ensaio com plantas micropropagadas foi verificado efeito positivo de *Bacillus* sp. F62 sobre o crescimento de SO₄, inclusive em mudas infectadas com *Fusarium* sp. De forma semelhante, Ziedan *et al.* (2010) verificaram um incremento na produtividade em videiras cv. Superior empregando a bactéria promotora de crescimento *Streptomyces* associada ao biofertilizante Rhizobacterin, que contém *Klebsiella planticola* linhagem BIM B-161. Similarmente, Hao *et al.* (2017) avaliaram o efeito de *Paenibacillus* sp. linhagem B2 em plantas micropropagadas de SO₄ e no biocontrole em coinoculação com o nematoide *Xiphinema index* e verificaram aumento na biomassa de raízes, sendo que essa promoção do crescimento não foi afetada pela coinoculação com o nematoide.

Resultados semelhantes foram obtidos empregando bactérias promotoras de crescimento em outras culturas. El-Hassan & Gowen (2006) verificaram ação antagonística de *B. subtilis* sobre *F. oxysporum* f. sp. *lentis*, tanto na aplicação em sementes quanto no solo, além de elevação da massa seca em plantas de lentilha. Ramyabharathi *et al.* (2016) verificaram altas taxas de germinação, aumento do comprimento de brotações e raízes ao realizar tratamento em sementes de tomate com *B. subtilis* EPCO 16. Além disso, Kejela *et al.* (2017) reportaram promoção do crescimento, elevação na taxa de germinação, redução na incidência de doenças e aumento na atividade de enzimas relacionadas à defesa em café, após tratamento com *Pseudomonas* linhagem PT11.

Em estudo realizado em estacas de videira cv. Sauvignon blanc submetidas a tratamentos com *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp. e *Serratia* sp. através de aspersão no solo ou inóculo em ferimentos no tronco, verificou-se presença de *Pseudomonas* sp. linhagem I2R21 em ramos 3 cm acima do ferimento dois meses após a inoculação (Wicaksono *et al.*, 2017). Por outro lado, os demais endófitos não conseguiram colonizar estacas quando inoculados no solo, tendo sobrevivido por até quatro semanas após a inoculação. De acordo com Balmer *et al.* (2012), barreiras físicas como a parede celular, toxinas antimicrobianas e outros mecanismos de defesa podem dificultar o estabelecimento e a migração de endófitos. No entanto, as bactérias empregadas no estudo foram isoladas da planta mãnuka (*Leptospermum scoparium*), sendo a videira, nesse caso, um hospedeiro heterólogo. Isso sugere que diferentes espécies ou isolados bacterianos apresentam diferentes habilidades de colonização do hospedeiro (Hardoim *et al.*, 2008; Wicaksono *et al.*, 2017).

Diferentes efeitos sobre a promoção do crescimento podem ser decorrentes da forma pela qual se deu a colonização bacteriana, visto que o sistema radicular não é colonizado uniformemente. Esse padrão distinto de colonização está associado à liberação diferenciada de exsudatos pela planta, taxa de crescimento das rizobactérias e interações bactéria-hospedeiro

(Benizri *et al.*, 2001; Compant *et al.*, 2010). Além disso, a composição de exsudatos varia com o genótipo, condições de estresse, estágio de desenvolvimento da planta e até mesmo interação com a microbiota natural do solo (Haichar *et al.*, 2008). Todos esses fatores influenciam no modo como a bactéria coloniza as raízes e como, posteriormente, ocorre a migração para os tecidos internos. Após o estabelecimento em tecidos vegetais, a comunidade endofítica apresenta caráter dinâmico, sendo influenciada por características físico-químicas do solo, fase de desenvolvimento da planta, condições fisiológicas e ambientais (Mercado-Blanco & Lugtemberg, 2014). Aliado a isso, bactérias endofíticas possuem relação mais intensa com o hospedeiro do que rizobactérias (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006).

Em relação ao biocontrole de *Fusarium* sp. pode-se dizer que diferentes níveis de inibição fúngica podem ser decorrentes da virulência do fitopatógeno, da colonização bacteriana e do mecanismo de ação e de produção de metabólitos antifúngicos por diferentes espécies de *Bacillus* (Shafi *et al.*, 2017). Além disso, para que o fitopatógeno ocasionar a infecção é necessário o reconhecimento das raízes do hospedeiro, a penetração das hifas, a degradação de barreiras físicas, a proliferação de hifas, a adaptação às respostas de defesa da planta e, ainda, a secreção de fitotoxinas (Di Pietro *et al.*, 2003).

A infecção por fitopatógenos altera o padrão de liberação de exsudatos influenciando a colonização bacteriana (Compant *et al.*, 2010) e, com isso, o mecanismo de ação de endófitos que envolve a síntese de enzimas líticas, antibióticos e sideróforos os quais inibem o desenvolvimento e o processo de infecção dos fitopatógenos (Van Loon & Bakker, 2005). É importante que endófitos apresentem diferentes mecanismos de ação sobre fitopatógenos a fim de evitar resistência. Assim, caso uma forma de biocontrole não seja tão eficaz, haverá mecanismos distintos para impedir ou minimizar a infecção (Eljounaidi *et al.*, 2016).

No presente estudo, comprovou-se a capacidade de *Bacillus* sp. F62 atuar no biocontrole de *Fusarium* sp., através na inoculação em solo, em estacas e mudas micropropagadas de SO4. Diferentemente, Baumgartner & Warnock (2006), verificaram que a aplicação no solo de *B. subtilis*, *B. lentimorbus*, *Comamonas testosteroni*, *Pseudomonas aeruginosa* e *P. mendocina* em videiras Cabernet Sauvignon enxertadas em 110R (*V. berlandieri* × *V. rupestris*) não controlou a podridão de raízes causada por *Armillaria mellea*. Contudo, plantas sintomáticas tratadas com as bactérias apresentaram maior produtividade e rendimento. Wicaksono *et al.* (2017) avaliaram o efeito de *Pseudomonas* sp. I2R21 e W1R33 no biocontrole das espécies botriosferiáceas *Neofusicoccum luteum* e *N. parvum* em estacas de videira cv. Sauvignon blanc e verificaram redução do comprimento de lesões causadas pelo patógeno de 32% a 52% em relação ao controle.

A eficácia do gênero *Bacillus* no biocontrole de *Fusarium* spp. foi relatada em diversas culturas. El-Hassan & Gowen (2006) verificaram atividade antagonística de *B. subtilis* com redução superior a 70% da incidência de *F. oxysporum* f. sp. *lentis* empregando o agente de biocontrole no tratamento do solo e de sementes na cultura da lentilha. Zhang *et al.* (2009) verificaram que oito linhagens de *B. subtilis* reduziram a severidade da infecção por *F. oxysporum* e *F. graminearum* em soja, quando inoculadas em sementes ou no solo. No tratamento de sementes, houve de 43 a 63% de redução na severidade da doença, 18% de aumento na altura das plantas e 19% de aumento da massa seca de raízes em relação ao controle. No tratamento do solo, a redução na severidade da doença foi superior atingindo 74%, além disso, houve aumento do comprimento das plantas em até 23% e da massa seca de raízes em até 24%. Ramyabharathi *et al.* (2016) verificaram que a inoculação de formulação líquida *B. subtilis* linhagem EPCO16 em sementes de tomateiros, a inoculação no solo e a aspersão foliar permitiram a redução na incidência de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em até 68,42%.

De forma geral, pode-se afirmar que *Bacillus* sp. F62 demonstrou ação antagonística *in vitro* sobre quatro isolados de *Fusarium* sp. obtidos de videiras sintomáticas reduzindo o crescimento micelial e a germinação de conídios. Ensaios *in vivo* demonstraram que a bactéria apresenta potencial de redução da incidência de *Fusarium* sp. e na promoção do crescimento, principalmente, em mudas do porta-enxerto SO4 obtidas através de micropropagação. Sendo assim, *Bacillus* sp. F62 tem potencial aplicação como bioagente no auxílio do controle do desenvolvimento da fusariose no porta-enxerto suscetível SO4.

5.5 REFERÊNCIAS

- Ahemad, M.; Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **J. King Saud. Univ. Sci.** 26: 1-20.
- Balmer, D.; Planchamp, C.; Mauch-Mani, B. (2012). On the move: induced resistance in monocots. **J. Exp. Bot.** 64: 1249-1261.
- Baumgartner, K.; Warnock, A. E. (2006). A soil inoculant inhibits *Armillaria mellea* *in vitro* and improves productivity of grapevines with root disease. **Plant Dis.** 90: 439-444.
- Benitez, L. B.; Velho, R. V.; Lisboa, M. P. (2010). Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. **J. Microbiol.** 48: 791-797.
- Benizri, E.; Baudoin, E.; Guckert, A. (2001). Root colonization by inoculated plant growth rhizobacteria. **Biocontrol Sci. Technol.** 11: 557-574.

- Boubakri, H.; Hadj-Brahim, A.; Schmitta, C.; Soustre-Gacougnolle, I.; Mliki, A. (2015). Biocontrol potential of chenodeoxycholic acid (CDCA) and endophytic *Bacillus subtilis* strains against the most destructive grapevine pathogens. **N. Z. J. Crop Hortic. Sci.** 4: 261-274.
- Cao, Y.; Xu, Z.; Ling, N. (2012). Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. **Sci. Hortic.** 135: 32–39.
- Chaurasia, B.; Pandey, A.; Palni, L. M. S.; Trivedi, P.; Kumar, B.; Colvin, N. (2005). Diffusible and volatile compounds produced by antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. **Microbiol. Res.** 160: 75-81.
- Clemente, J. M.; Cardoso, C. R.; Vieira, B. S. E.; Da Mata Flor, I.; Costa, R. L. (2016). Use of *Bacillus* spp. as growth promoter in carrot crop. **Afr. J. Agric. Res.** 11: 3355-3359.
- Compant, S.; Clement, C.; Sessitsch, A. (2010). Plant growth promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants. Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biol. Biochem.** 42: 669–678.
- Compant, S.; Brader, G.; Muzammil, S.; Sessitsch, A.; Lebrihi, A.; Mathi, F. (2013). Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. **Biol. Control.** 58: 435-455.
- Dean, R.; Van Kan, J. A. L.; Pretorius, Z. A.; Hammond-Kosack, K. E.; Di Pietro, A.; Spanu, P. D.; Rudd, J. J.; Dickman, M.; Kahmann, R.; Ellis, J.; Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Mol. Plant Pathol.** 13: 414-430.
- Di Pietro, A.; Madrid, M. P.; Caracuel, Z.; Delgado-Jarana, J.; Roncero, M. I. G. (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. **Mol. Plant Pathol.** 4: 315-325.
- Eljounaidi, K.; Lee, S. K.; Bae, H. (2016). Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. **Biol. Control.** 103: 62–68.
- El-Hassan, S. A.; Gowen, S. R. (2006). Formulation and delivery of the bacterial antagonist *Bacillus subtilis* for by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. **J. Phytopathol.** 154: 148-155.
- Garrido, L. R.; Sônego, O. R.; Urben, Gomes, V. N. (2004). Fungos associados com o declínio e morte de videiras no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatol. Bras.** 29: 322-324.
- Gong, Q.; Zhang, C.; Lu, F. (2014). Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. **Food Control.** 36: 8–14.
- Gramaje, D. (2016). Uso de la termoterapia con agua caliente para el control de enfermedades fúngicas de lamadera. **Vida Rural.** 1: 48-57.
- Gramaje, D.; Alaniz, S.; Abad-Campos, P.; García-Jiménez, J.; Armengol, J. (2016). Evaluation of grapevine rootstock against soilborne pathogens associated with trunk diseases. **Acta Hortic.** 1136: 245-250.

- Haichar, F. Z.; Marol, C.; Berge, O.; Rangel-Castro, J. I. Prosser, J. I.; Balesdent, J.; Heulin, T.; Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal**. 2: 1221-1230.
- Halleen, F.; Crous, P. W.; Petrini, O. (2003). Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. **Austral. Plant Pathol.** 32: 47-52.
- Hao, Z.; Van Tuinen, D.; Wipf, D.; Fayolle, L.; Chataignier, O.; Li, X.; Chen, B.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson, V.; Adrian, M. (2017). Biocontrol of grapevine aerial and root pathogens by *Paenibacillus* sp. strain B2 and paenimyxin *in vitro* and *in planta*. **Biol. Control**. 109: 42–50.
- Hardoim, P. R.; van Overbeek, L. S.; van Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends Microbiol.** 16: 463-471.
- Hight, A. S.; Nair, N. G. (1995). *Fusarium oxysporum* associated with grapevine decline in the Hunter Valley, NSW, Australia. **Austral. J. Grape Wine Res.** 1: 48-50.
- Kejela, T.; Thakkar, V. R.; Patel, R. R. (2017). A novel strain of *Pseudomonas* inhibits *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* infections and promotes germination of coffee. **Rhizosphere**. 4: 9-15.
- Król, E. (2006). Fungi inhabiting decaying grapevine (*Vitis* spp.) cuttings. **J. Plant Prot. Res.** 46: 353-358.
- Maguire, J. D. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigours. **Crop Sci.** 2: 176-177.
- Manjunatha, H.; Naik, M. K.; Patil, M. B.; Lokesha, R.; Vasudevan, S. N. (2012). Isolation and characterization of native fluorescent pseudomonads and antagonistic activity against major plant pathogens. **Karnataka J. Agric. Sci.** 25: 346-349.
- Mercado-Blanco, J.; Lugtenberg, B. (2014). Biotechnological applications of bacterial endophytes. **Curr. Biotechnol.** 3: 60–75.
- Murashige, T.; Skoog, F.A. (1962). A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiol.** 15: 473-479.
- Oliveira, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tratamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.
- Ramyabharathi, S.; Rajendran, L.; Karthikeyan, G.; Raguchander, T. (2016). Liquid formulation of endophytic *Bacillus* and its standardization for the management of *Fusarium* wilt in tomato. **Bangladesh J. Bot.** 45: 283-290.
- Rosenblueth, M.; Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Mol. Plant Microbe Interact.** 19: 827-837.

- Santos, R. F. Dos; Heckler, L. I.; Lazarotto, M.; Garrido, L. Da R.; Rego, C.; Blume, E. (2016). *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* for control of *Dactylonectria macrodidyma* in grapevine. **Phytopathol. Mediterr.** 55: 293–300.
- Shafi, J.; Tian, H.; Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnol. Biotechnol. Equip.** 1: 446-459.
- Sônego, O. R.; Garrido, L. R.; Grigoletti, A. (2005). **Principais doenças fúngicas da videira no sul do Brasil**. Embrapa Uva e Vinho: Bento Gonçalves. 32p.
- Soria, S.; Alonso, R.; Bettucci, L. (2012). Endophytic bacteria from *Pinus taeda* L. as biocontrol agents of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell. **Chil. J. Agric. Res.** 72: 281-284.
- Sotoyama, K.; Akutsu, K.; Nakajima, M. (2016). Biological control of *Fusarium* wilt by *Bacillus amyloliquefaciens* IUMC7 isolated from mushroom compost. **J. Gen. Plant Pathol.** 82: 105-109.
- Svercel, M.; Christen, D.; Moëne-Loccoz, Y.; Duffy, B.; Défago, G. (2010). Distribution of *Pseudomonas* populations harboring *phlD* or *hcnAB* biocontrol genes is related to depth in vineyard soils. **Soil Biol. Biochem.** 42: 466–472.
- Toffanin, A.; D'Onofrio, C.; Carrozza, G. P.; Scalabrelli, G. (2016). Use of beneficial bacteria *Azospirillum brasiliense* Sp245 on grapevine rootstocks grafted with 'Sangiovese'. **Acta Hort.** 1136: 177-184.
- Tokpah, D. P.; Li, H.; Wang, L.; Liu, X.; Mulbah, Q. S.; Liu, H. (2016). An assessment system for screening effective bacteria as biological control agents against *Magnaporthe grisea* on rice. **Biol. Control.** 103: 21–29.
- Van Loon, L. C.; Bakker, P. A. H. M. (2005). **Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria**. In: Siddiqui, Z. A. (Ed.). **PGPR: biocontrol and biofertilization**. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 39-76.
- Yadeta, K. A.; Thomma, B. P. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. **Front. Plant Sci.** 4: 1-12.
- Waite, H.; Whitelaw-Weckert, M.; Torley, P. (2015). Grapevine propagation: principles and methods for the production of high-quality grapevine plant material. **New Zeal. J. Crop Hort. Sci.** 43: 144-161.
- Wicaksono, W. A.; Jones, E. E.; Monk, J.; Ridgway, H. J. (2017). Using bacterial endophytes from a New Zealand native medicinal plant for control of grapevine trunk diseases. **Biol. Control.** 114: 65-72.
- Zhang, J. X., Xue, A. G., Tambong, J. T. (2009). Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rot caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. **Plant Dis.** 93: 1317-1323.
- Ziedan, E. H. E.; El-Mohamedy, R. S. R. (2008). Application of *Pseudomonas fluorescens* for controlling root-rot disease of grapevine. **Res. J. Agric. Biol. Sci.** 4: 346-353.

Ziedan, E. S. H.; Farrag, E. S.; El-Mohamedy, R. S.; Abd Alla, M. A. (2010). *Streptomyces alni* as a biocontrol agent to root-rot of grapevine and increasing their efficiency by biofertilisers inocula. **Arch. Phytopathol. Plant Prot.** 43:634–646.

Ziedan, E. S. H.; Embaby, E. S. M.; Farrag, E. S. (2011). First record of *Fusarium vascular* wilt on grapevine in Egypt. **Arch. Phytopathol. Plant Prot.** 44: 1719–1727.

5.6 MATERIAL SUPLEMENTAR (MS1)

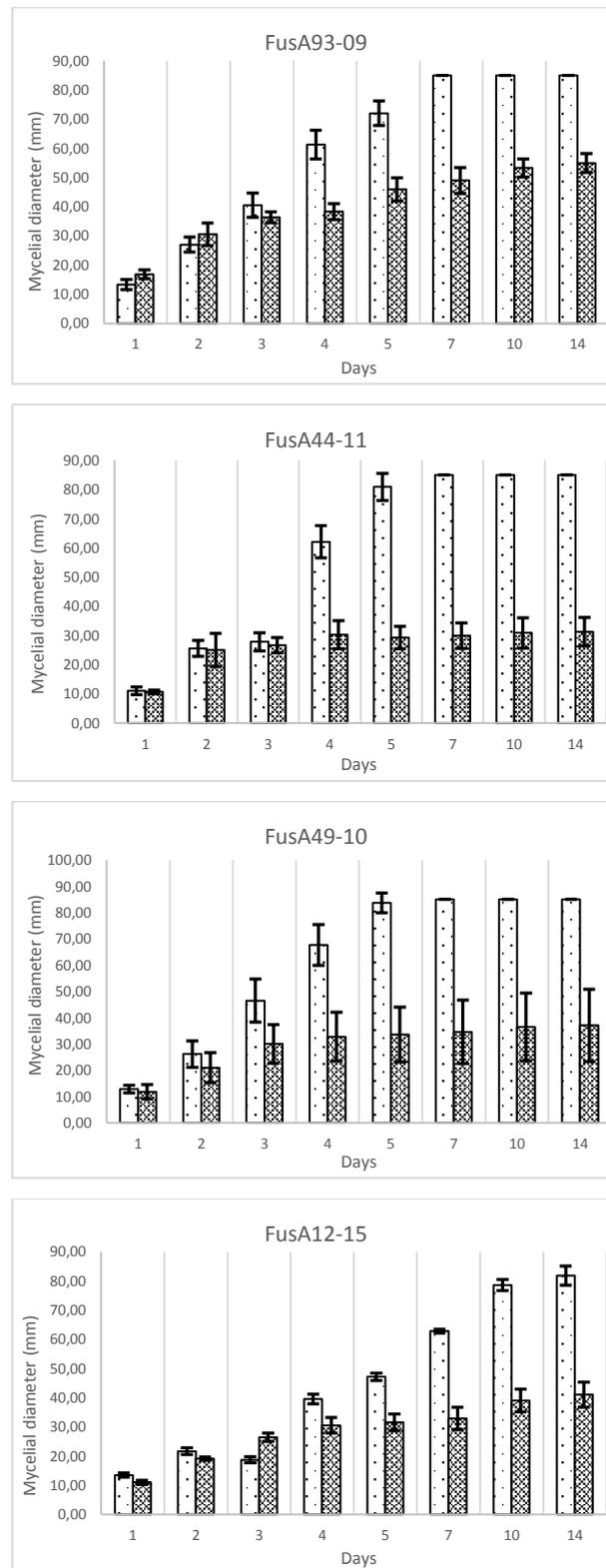


Gráfico do diâmetro micelial de isolados de *Fusarium* sp., ao longo dos 14 dias em meio BDA, no ensaio de antagonismo por compostos difusíveis em dois tratamentos distintos: controle e Fus + Bac.

5.7 MATERIAL SUPLEMENTAR (MS2)

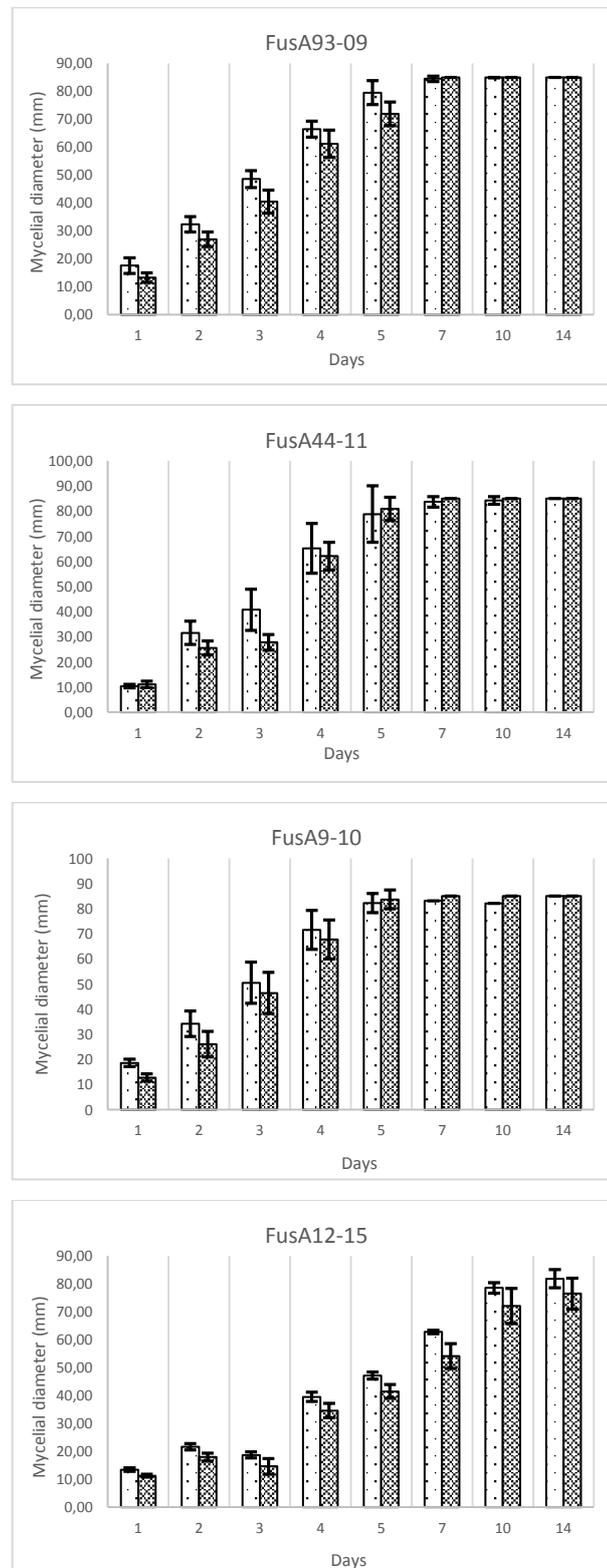


Gráfico do diâmetro micelial de isolados de *Fusarium* sp., ao longo dos 14 dias em meio BDA, no ensaio de antagonismo por compostos voláteis em dois tratamentos distintos: controle e Fus + Bac.

6. DISCUSSÃO GERAL

A viticultura brasileira vem sofrendo sérios problemas nos últimos anos, com destaque para o declínio e morte precoce de videiras que tem afetado principalmente vinhedos jovens, levando à erradicação de plantas que estariam no início da fase produtiva. A baixa disponibilidade de novas áreas destinadas à viticultura, somada às restrições impostas pelo novo Código Florestal limitam significativamente os locais adequados para a implantação de vinhedos. Além disso, área vitícolas antigas necessitam de um manejo adequado, visto que muitas vezes apresentam resíduos culturais infectados ou, até mesmo, altas concentrações de cobre dificultando a sobrevivência da videira.

Levando em consideração essas limitações, o produtor necessita não somente de material vegetativo com qualidade fitossanitária, mas também, de todo um aparato tecnológico para assegurar que seus investimentos na viticultura apresentem rentabilidade. Para isso, as mudas adquiridas precisam estar preparadas para resistir às condições ambientais adversas existentes nos vinhedos.

Os fungos associados a doenças de tronco e raízes são considerados patógenos agressivos cujo controle químico é significativamente caro, impactante e ineficaz, representando um entrave para a viticultura (Gramaje & Armengol, 2011). Nesse contexto, o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem um controle preventivo desses fitopatógenos é uma alternativa interessante. O tratamento de mudas com agentes de biocontrole, previamente ao seu plantio a campo, pode contribuir para promover o crescimento das plantas e torná-las menos suscetíveis a infecções fúngicas.

O gênero *Bacillus* está entre as principais bactérias antagonistas empregadas em estudos visando à promoção do crescimento em plantas, bem como, ao biocontrole de diferentes agentes fitopatogênicos (Eljounaidi *et al.*, 2016; Shafi *et al.*, 2017). *Bacillus* sp. destaca-se por ser uma bactéria natural de solo, apresentar altas taxas de multiplicação, ser resistente a condições ambientais adversas, possuir amplo espectro de biocontrole e produzir endósporos de resistência (Castillo *et al.*, 2013; Shafi *et al.*, 2017).

Considerando o potencial de *Bacillus* spp., este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de *Bacillus* sp. linhagem F62 no controle da fusariose e do pé-preto na videira. Dessa forma, diferentes ensaios foram conduzidos *in vitro* e *in vivo* em dois porta-enxertos de importância econômica para a viticultura brasileira. A ação antagonística de *Bacillus* sp. F62 sobre *Fusarium* sp. e "*Cylindrocarpon*" sp. foi inicialmente avaliada *in vitro*; tendo sido demonstrado o potencial da bactéria na inibição do crescimento micelial e na inibição da

germinação de conídios desses fitopatógenos. Diferentemente de outros estudos, a rizobactéria não demonstrou antagonismo através de compostos voláteis, muito embora, metabólitos difusíveis tenham sido secretados em meio de cultura, ocasionando má-formação de hifas, alterações miceliais e halos de inibição, condizentes com dados obtidos por Chaurasia *et al.* (2005). Assim, iniciou-se a etapa seguinte do estudo para verificar se ação bacteriana apresentada *in vitro* era mantida em ensaios *in vivo*. Resultados contraditórios *in vitro* e *in planta* foram relatados em outros estudos (Xiao *et al.*, 2002; Ghazalibiglar *et al.*, 2016) e podem estar relacionados à disponibilidade diferenciada de nutrientes, a qual influencia a produção de antibióticos pela bactéria (Wicaksono *et al.*, 2017). Além disso, o biocontrole pode ser afetado pela extensão e pela intensidade da colonização bacteriana (Roberts *et al.*, 2005).

Nesse contexto, decidiu-se realizar o experimento *in vivo* simulando a inoculação de *Bacillus* sp. F62 em mudas de videira dentro do padrão ideal de qualidade requerido pelo mercado, seja através de mudas produzidas em viveiros que passam por etapas de enxertia de mesa, forçagem e aclimação; ou ainda, através de plantas oriundas de cultivo *in vitro*. Para garantir maior sanidade do material vegetal empregado no experimento e impedir que o efeito de outros agentes fitopatogênicos pré-existentes pudessem interferir no experimento, realizou-se tratamento com água quente do material vegetativo coletado a campo. Esse tratamento consiste na imersão de estacas em água quente a aproximadamente 50 °C durante 30 minutos (Gramaje, 2016), tendo sua eficácia sido validada para as cultivares e condições brasileiras (Lerin *et al.*, 2017).

No experimento *in vivo* realizado com estacas dos porta-enxertos, foi realizada a inoculação de *Bacillus* sp. F62 após a aclimatização de estacas saídas da forçagem, no momento do transplante e diretamente no substrato. Dentre os isolados de “*Cylindrocarpon*” sp. e *Fusarium* sp. testados *in vitro*, foi selecionado um isolado de cada fitopatógeno com comportamento mediano no *screening* realizado para avaliar a inibição de *Bacillus* sp. F62.

Estacas de Paulsen 1103 tratadas com a suspensão bacteriana não apresentaram efeito estatisticamente significativo no crescimento e vigor. Diferentemente, estacas de SO4 tiveram incremento no desenvolvimento, conforme reportado por outros autores (Santos *et al.*, 2016; Toffanin *et al.*, 2016). Por outro lado, o tratamento com a rizobactéria reduziu o percentual de reisolamento de “*Cylindrocarpon*” sp. em 27,8% em SO4 e em 10,3% em Paulsen 1103. Assim, pode-se dizer que os porta-enxertos responderam de forma distinta à inoculação com o “*Cylindrocarpon*” sp., sendo que a incidência da doença foi superior em SO4, assim como o biocontrole demonstrado por *Bacillus* sp. linhagem F62. Além disso, no tratamento preventivo das estacas seguido da inoculação do patógeno, o material vegetativo de SO4, diferentemente

de Paulsen 1103, apresentou um incremento estatisticamente significativo do desenvolvimento das plantas.

Esses diferentes níveis de inibição fúngica de um mesmo isolado fitopatogênico em diferentes porta-enxertos é provavelmente decorrente da interação bactéria-planta hospedeira. O padrão de liberação de exsudatos pelos porta-enxertos, assim como o mecanismo de colonização bacteriana podem influenciar o modo pelo qual se dá o estabelecimento da bactéria nos tecidos internos da planta e, posteriormente, na forma pela qual ocorrerá a inibição do fitopatógeno (Haichar *et al.*, 2008; Compant *et al.*, 2013).

Além disso, os porta-enxertos apresentam diferentes características morfológicas, agrônômicas e genéticas. SO4 é um porta-enxerto oriundo do cruzamento *V. berlandieri* x *V. riparia*, caracterizado pelo médio vigor, resistência à seca e a solos com alto teor de alumínio, bom pegamento da enxertia, rápido desenvolvimento, sensibilidade à fusariose e ao dessecamento da ráquis (Silva, 2008; Camargo *et al.*, 2011; Ollat *et al.*, 2016). Já, Paulsen 1103 é proveniente do cruzamento *V. berlandieri* x *V. rupestris*, apresenta alta vigor, fácil enraizamento, boa pega de enxertia e afinidade com diversas cultivares de copa, além de alta resistência ao míldio, fusariose e filoxera nas raízes (Camargo *et al.*, 2011). Vale ressaltar que o crescimento e o desenvolvimento do sistema radicular dos porta-enxertos não dependem apenas do genótipo, mas também de condições ambientais, características físico-químicas do solo, fatores climáticos e interações com outros micro-organismos (Kocsis *et al.*, 2016). Assim, as condições de realização dos experimentos podem ter induzido diferentes respostas nos porta-enxertos.

Diferentemente, o tratamento com *Bacillus* sp. F62 em estacas de SO4 desafiadas com *Fusarium* sp. reduziu o percentual de reisolamento fúngico em 17,6%, indicando que no mesmo porta-enxerto o potencial de ação da bactéria foi superior no controle da fusariose do do que no controle do pé-preto. Tal resultado pode ser decorrente da interação agente de biocontrole-fitopatógeno que afeta o processo de colonização, infecção e reprodução desses micro-organismos. Além disso, a competição por espaço e nutrientes ou a biossíntese de substâncias antimicrobianas pela bactéria podem ter afetado mais intensamente o isolado de *Fusarium* sp. avaliado neste estudo (Castillo *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2015). Ademais, o agente de biocontrole pode agir através da indução da resistência no hospedeiro (Tokpah *et al.*, 2016), ou ainda, através da produção de enzimas líticas como quitinases, glucanases, proteases, etc. (Leelasphakul *et al.*, 2008; Lanna Filho *et al.*, 2010).

O ensaio *in vivo* foi realizado, também, em mudas micropropagadas de ambos os porta-enxertos. O material vegetativo para estabelecimento *in vitro* foi obtido de estacas submetidas

à tratamento com água quente (Gramaje, 2016) e mantidas em casas de vegetação em condições fitossanitárias adequadas. Esses explantes foram micropropagados a fim de obter uma população de plantas homogêneas e sadias (Cid & Teixeira, 2014). Nesse ensaio houve significativa promoção do crescimento em ambos os porta-enxertos, diferentemente dos resultados observados em estacas desses porta-enxertos. Isso pode ter ocorrido em virtude da maior concentração de reservas nutricionais e fitormônios em estacas que contribuem para o enraizamento (Facchinello, 1994; Nogueira *et al.*, 2007), tornando o efeito de *Bacillus* sp. F62 menos perceptível que em mudas micropropagadas. Além disso, o efeito da bactéria promotora de crescimento pode ser mais facilmente visualizado em cultivares de copa (*Vitis vinifera*) do que em porta-enxertos, visto que estes últimos tendem a apresentar maior vigor.

A ação de *Bacillus* sp. F62 na promoção de crescimento ocorreu tanto na parte aérea quanto em raízes de ambos os porta-enxertos. Em Paulsen 1103 foi verificado um incremento significativo do número de folhas e da massa seca de parte aérea, enquanto em SO4 observou-se maior comprimento da parte aérea, o qual se manteve ao longo do período de avaliação do experimento. Ambos os porta-enxertos apresentaram aumento da massa seca de raízes. Dessa forma, pode-se dizer que foram observados diferentes comportamentos dos porta-enxertos quando tratados com *Bacillus* sp. F62, indicando diferenças na interação da planta com microorganismos (Benizri *et al.*, 2001).

Em relação ao antagonismo de *Bacillus* sp. F62 em mudas micropropagadas, observou-se uma redução no percentual de reisolamento de "*Cylindrocarpon*" sp. de 36,0% tanto em Paulsen 1103 quanto em SO4. Diferentemente, o biocontrole de *Fusarium* sp. em mudas micropropagadas de SO4 reduziu o percentual de reisolamento fúngico em 52,4%, indicando que o isolado fúngico avaliado apresentou maior sensibilidade ao antagonismo bacteriano. A sensibilidade distinta a doenças apresentada pelos porta-enxertos avaliados pode ser decorrente do metabolismo de cada planta, assim como do mecanismo de defesa dos porta-enxertos frente aos fitopatógenos (Liminana *et al.*, 2009). Sabe-se que o padrão de liberação de exsudatos é modificado pela infecção por fitopatógenos, influenciando a colonização bacteriana (Compant *et al.*, 2010). Dessa forma, ocorrem alterações no mecanismo de ação de bactérias promotoras de crescimento que envolve a síntese de enzimas líticas, antibióticos e sideróforos que inibem o desenvolvimento e o processo de infecção dos fitopatógenos (Van Loon & Bakker, 2005, Eljounaidi *et al.*, 2016).

De acordo com Eljounaidi *et al.* (2016), bactérias endofíticas como *Bacillus* spp., apresentam alto potencial no biocontrole de patógenos causadores de murchas vasculares, como a fusariose, visto que ambos colonizam tecidos vasculares de formas semelhantes; no entanto,

os endófitos enfrentam competição com a microbiota natural de solos e fatores ambientais.

Além de apresentar potencial na redução da incidência dos fitopatógenos, *Bacillus* sp. linhagem F62 possibilitou que mudas desafiadas com *Fusarium* sp. e “*Cylindrocarpon*” sp. apresentassem um melhor desenvolvimento vegetativo, com minimização de sintomas adversos ocasionados pelos patógenos. Houve incremento de diversas respostas em plantas de Paulsen 1103 tratadas com suspensão bacteriana em relação às plantas inoculadas com “*Cylindrocarpon*” sp. e de plantas de SO4, também tratadas com *Bacillus* sp. F62 em relação às plantas infectadas com *Fusarium* sp.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo foi possível concluir que:

- *Bacillus* sp. F62 apresentou potencial de controle *in vitro* de cinco isolados de “*Cylindrocarpon*” sp. e quatro isolados de *Fusarium* sp. A inibição do crescimento micelial ocorreu através do antagonismo por compostos difusíveis;
- No ensaio *in vitro* de inibição da germinação de conídios fúngicos, tanto o tratamento com suspensão de *Bacillus* sp. F62 quanto o tratamento com filtrado da cultura bacteriana, apresentaram significativa inibição na germinação de esporos de *Fusarium* sp. e de “*Cylindrocarpon*” sp.;
- Mudanças micropropagadas dos porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e SO4 apresentaram redução no percentual de reisolamento fúngico de “*Cylindrocarpon*” sp. e *Fusarium* sp. quando submetidas à tratamento com suspensão de *Bacillus* sp. F62;
- Estacas dos porta-enxertos de videira Paulsen 1103 e SO4 apresentaram redução no percentual de reisolamento de *Fusarium* sp. e “*Cylindrocarpon*” sp. através de tratamento com suspensão de *Bacillus* sp. F62, contudo, a redução da incidência fúngica foi menos expressiva que em mudas micropropagadas desses porta-enxertos;
- *Bacillus* sp. F62 demonstrou potencial na promoção do crescimento de mudas micropropagadas dos porta-enxertos Paulsen 1103 e SO4, quando inoculado na fase de aclimatização das mudas, com significativo incremento no número de folhas, comprimento, massa seca de raízes e parte aérea. No entanto, a ação bacteriana na promoção do crescimento em estacas dos porta-enxertos foi distinta, com efeito positivo em SO4 e sem efeito estatisticamente significativo em Paulsen 1103.

8. PERSPECTIVAS

Para a continuidade deste trabalho, seria importante:

- Analisar o uso do filtrado da cultura de *Bacillus* sp. F62 através da aplicação em mudas micropropagadas de Paulsen 1103 e SO4, visando determinar efeitos antagonísticos sobre *Fusarium* sp. e “*Cylindrocarpon*” sp., além de determinar a composição química dessas substâncias;
- Determinar se ocorreu a indução de resistência sistêmica nos porta-enxertos Paulsen 1103 e SO4 inoculados com *Bacillus* sp. F62 através da ativação de genes de defesa, biossíntese de enzimas e outras substâncias envolvidas em mecanismos de resistência;
- Realizar novamente experimento *in vivo* com estacas de porta-enxertos de videira realizando enxertia de cultivar de copa para verificar se haverá efeito estatisticamente significativo na promoção do crescimento, no vigor e na qualidade das mudas obtidas;
- Avaliar o desempenho de mudas micropropagadas de Paulsen 1103 e SO4 inoculadas com *Bacillus* sp. F62 em viveiros, a fim de verificar ação bacteriana na promoção do crescimento e na prevenção de doenças fúngicas radiculares, bem como determinar interações com demais micro-organismos existentes no ambiente;
- Determinar concentrações e intervalos para reaplicação da suspensão bacteriana com intuito de manter uma população bacteriana adequada, além da colonização em tecidos vegetais e persistência ao longo do tempo.

REFERÊNCIAS

- Abreo, E.; Martinez, S.; Bettucci, L.; Lupo, S. (2010). Morphological and molecular characterization of *Campylocarpon* and *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot disease of grapevines in Uruguay. **Australas. Plant. Pathol.** 39: 446-452.
- Agrios, G. N. (2005). **Plant pathology**. 5. ed. San Diego: Elsevier, 948p.
- Agustí-Brisach, C.; Armengol, J. (2013). Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. **Phytopathol. Mediterr.** 52: 245–261.
- Ahemad, M.; Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **J. King Saud. Univ. Sci.** 26: 1-20.
- Al-Ajlani, M. M.; Sheikh, M. A.; Ahmad, Z.; Hasnain, S. (2007). Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. **Microb. Cell. Fact.** 6: 1475-2859.
- Alaniz, S.; Leon, M.; Vicent, A.; Garcia-Jimenez, J.; Abad, P.; Armengol, J. (2007). Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black foot disease of grapevine in Spain. **Plant Dis.** 91: 1187–1193.
- Alaniz, S.; Abad-Campos, P.; Garcia-Jimenez, J.; Armengol, J. (2011). Evaluation of fungicides to control *Cylindrocarpon liriodendri* on *Cylindrocarpon macrodidymum* *in vitro*, and their effect during the rooting phase in the grapevine propagation process. **Crop Prot.** 30: 489-494.
- Alleweldt, G.; Dettweiler, E. (1994). **The genetic resources of *Vitis*: world list of grapevine collections**. 2. ed. Geilweilerhof: Siebeldingen. 327p.
- Almança, M. A. K.; Abreu, C. M.; Scopel, F. B.; Benedetti, M.; Halleen, F.; Cavalcanti, F. R. (2013). **Evidências morfológicas da ocorrência de *Phaeoconiella chlamydospora* em videiras no estado do Rio Grande do Sul**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 12p.
- Araújo, A. S. F.; Carneiro, R. F. V.; Bezerra, A. A. C.; Araújo, F. F. (2010). Co-inoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento das plantas. **Cienc. Rural**, 43: 182-185.
- Arkhipova, T. N.; Veselov, S. U.; Melentiev, A. I.; Martynenko, E. V.; Kudoyarova, G. R. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. **Plant and Soil.** 272: 201–209.
- Armengol, J.; Gramaje, D. (2016). Soil borne fungal pathogens affecting grapevine rootstocks: current status and future prospects. **Acta Hort.** 1136: 235-238.
- Aroca, A.; Gramaje, D.; Armengol, J.; García-Jiménez, J.; Raposo, R. (2010). Evaluation of grapevine nursery process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeoconiella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. **Eur. J. Plant Pathol.** 126: 165–174.

- Asghar, H. N.; Zahir, Z. A.; Arshad, M.; Khaliq, A. (2002). Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biol. Fertil. Soils**. 35: 231–237.
- Bacon, C. W.; White, J. F. (2000). **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker. 487p.
- Balbi-Peña, M. I.; Becker, A.; Franzener, G.; Lopes, M. C.; Schawan-Estrada, K. R. F. (2006). Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina – II. Avaliação *in vivo*. **Fitopatol. Bras**. 31: 401-404.
- Basurto-Cadena, M. G. L.; Vázquez-Arista, M.; García-Jiménez, J.; Salcedo-Hernández, R.; Bideshi, D. K.; Barboza-Corona, J. E. (2012). Isolation of a new Mexican strain of *Bacillus subtilis* with antifungal and antibacterial activities. **Sci. World J**. 1: 1-7.
- Benizri, E.; Baudoin, E.; Guckert, A. (2001). Root colonization by inoculated plant growth rhizobacteria. **Biocontrol Sci. Technol**. 11: 557-574.
- Bettiol, W.; Ghini, R. (2003). **Proteção de plantas em sistemas agrícolas**. In: Campanhola, C.; Bettiol, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. pp. 79-96.
- Bettiol, W.; Morandi, M. (2009). **Biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. pp. 15-28.
- Bettoni, J. C.; Dalla Costa, M.; Gardin, J. P. P.; Kretzschmar, A. A.; Pathirana, R. (2016). Cryotherapy: a new technique to obtain grapevine plants free of viruses. **Rev. Bras. Frutic**. 38: 11-23.
- Blanco, L. M. (2012). **Caracterización molecular, fenotípica, patogénica y medios de control de *Phaeoacremonium aleophilum* y outros hongos asociados a los decaimientos de la vid em Castilla y León**. Castilla y León: Universidade de León. pp. 11-81.
- Botton, M.; Ringenberg, R.; Zanardi, O. Z. (2004). Controle químico da forma galícola da filoxera *Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch, 1856) (Hemiptera: Phylloxeridae) na cultura da videira. **Cienc. Rural**. 34: 1327- 1331.
- Boubakri, H.; Hadj-Brahim, A.; Schmitta, C.; Soustre-Gacougnolle, I.; Mliki, A. (2015). Biocontrol potential of chenodeoxycholic acid (CDCA) and endophytic *Bacillus subtilis* strains against the most destructive grapevine pathogens. **N. Z. J. Crop Hortic. Sci**. 4: 261-274.
- Cabral, A.; Rego, C.; Nascimento, T.; Oliveira, H.; Groenewald, J. Z.; Crous, P. W. (2012). Multi-gene analysis and morphology reveal novel “*Cylindrocarpon*” species associated with black foot disease of grapevines. **Fungal Biol**. 116: 62–80.
- Camargo, U. A. (2006). Porta-enxertos e cultivares de videira. **Disponível (online)** <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/portaenx.html> (10 de junho).
- Camargo, U. A.; Dias, M. F. (1986). **Identificação varietal de algumas videiras cultivadas no Rio Grande do Sul**. 2. ed. rev. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 45p.

- Camargo, U. A.; Maia, J. D. G.; Ritschel, P. (2011). **Cultivares de videira**. In: Silveira, S. V. Da; Monteiro, R. **Implantação e manejo de vinhedos de base ecológica**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 86p.
- Campos Silva, J. R.; Souza, R. M.; Zacarone, A. B.; Silva, L. H. C. P.; Castro, A. M. S. (2008). Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Cienc. Agrotec.** 32: 1062-1072.
- Castillo, H. F. D.; Reyes, C. F.; Morales, G. G.; Herrera, R. R.; Aguilar, C. (2013). Biological control of root pathogens by plant-growth promoting *Bacillus* spp. **InTech.** 4: 79-98.
- Caudwell, A.; Larrue, J.; Boudon-Padieu, E.; Mclean, G. D. (1997). Flavescence dorée elimination from dormant wood of grapevines by hot-water treatment. **Aust. J. Grape Wine R.** 3: 21-25.
- Cavalcanti, F. R.; Pereira, V. F.; Ribeiro Junior, P. M. (2014). **Aspectos da indução de resistência em plantas de videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 20p.
- Chaurasia, B.; Pandey, A.; Palni, L. M. S.; Trivedi, P.; Kumar, B.; Colvin, N. (2005). Diffusible and volatile compounds produced by antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. **Microbiol. Res.** 160: 75-81.
- Chaverri, P.; Salgado, C.; Hirooka, Y.; Rossman, A. Y.; Samuels, G. J. (2011). Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. **Stud. Mycol.** 68: 57-78.
- Chen, X.; Zhang, Y.; Fu, X.; Li, Y.; Wang, Q. (2016). Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. **Postharvest Biol. Technol.** 115: 113-121.
- Chinnasri, B.; Borsics, T.; Christopher, D. A.; Sipes, B. S. (2017). Induction of pathogenesis-related gene 1 (PR-1) by acibenzolar-s-methyl application in pineapple and its effect on reniform nematodes (*Rotylenchulus reniformis*). **Agric. Nat. Resour.** 1: 1-6.
- Cid, L. P. B.; Teixeira, J. B. (2014). **Explante, meio nutritivo, luz e temperatura**. In: Cid, L. P. B. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. 3. ed. ampl. Brasília: Embrapa – Cenargen. pp. 17-51.
- Combrinck, S.; Regnier, T.; Kamatou, G. P. P. (2011). *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Ind. Crops Prod.** 33: 344-349.
- Compant, S.; Clement, C.; Sessitsch, A. (2010). Plant growth promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants. Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biol. Biochem.** 42: 669-678.
- Compant, S.; Brader, G.; Muzammil, S.; Sessitsch, A.; Lebrhi, A.; Mathi, F. (2013). Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. **Biol. Control.** 58: 435-455.

- Correia, K. C.; Câmara, M. P. S.; Barbosa, M. A. G.; Sales, J. R.; Agustí-Brisach, C.; Gramaje, D.; León, M.; García-Jiménez, J.; Abad-Campos, P.; Armengol, J.; Michereff, S. J. (2013). Fungal trunk pathogens associated with table grape decline in Northeastern Brazil. **Phytopathol. Mediterr.** 52: 380-387.
- Dean, R.; Van Kan, J. A. L.; Pretorius, Z. A.; Hammond-Kosack, K. E.; Di Pietro, A.; Spanu, P. D.; Rudd, J. J.; Dickman, M.; Kahmann, R.; Ellis, J.; Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Mol. Plant Pathol.** 13: 414–430.
- Di Pietro, A.; Madrid, M. P.; Caracuel, Z.; Delgado-Jarana, J.; Roncero, M. I. G. (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. **Mol. Plant Pathol.** 4: 315-325.
- Durrant, W. E.; Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.** 42: 185-209.
- Edwards, J.; Marchi, G.; Pascoe, I. G. (2001). Young esca in Australia. **Phytopathol. Mediterr.** 40: 303–310.
- Eljounaidi, K.; Lee, S. K.; Bae, H. (2016). Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – review and future prospects. **Biol. Control.** 103: 62–68.
- Facchinello, J. C.; Hoffman, A.; Nachtigal, J. C.; Kersten, E.; Fortes, G. R. L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado.** Pelotas: UFPEL, 1994. 179p.
- Ferraz, S.; Freitas, L.; Lopes, E.; Dias-Arieira, C. (2010). **Manejo sustentável de fitonematoídes.** Viçosa: UFV. 306p.
- Fourie, P. H.; Halleen, F. (2002). Investigation on the occurrence of *Phaeoconiella chlamydospora* in canes of rootstock mother vines. **Austral. Plant Pathol.** 31: 425– 426.
- Galet, P. (2000). **Grape varieties and rootstock varieties.** Chaintre: Oenoloplurimédia. 315p.
- Garrido, L. R.; Gava, R. (2014). **Manual de doenças fúngicas da videira.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 101p.
- Garrido, L. R.; Sônego, O. R. (2003). Videira protegida. **Cultivar HF.** 4: 26-28.
- Garrido, L. R.; Sônego, O. R.; Urban, Gomes, V. N. (2004a). Fungos associados com o declínio e morte de videiras no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatol. Bras.** 29: 322-324.
- Garrido, L. R.; Sônego, O. R.; Urban, A. F. (2004b). *Cylindrocarpon destructans* causador do pé-preto da videira no Rio Grande do Sul. **Fitopatol. Bras.** 29: 248-250.
- Gatica M.; Césari, C.; Magnin, S.; Dupont, J. (2001). *Phaeoacremonium* species and *Phaeoconiella chlamydospora* in vines showing hoja de malvón and young vine decline symptoms in Argentina. **Phytopathol. Mediterr.** 40: S317–S324.

- Ghazalibiglar, H.; Hampton, G.; VanZijll; Jong, E.; Holyoake, de A. (2016). Evaluation of *Paenibacillus* spp. isolates for the biological control of black rot in *Brassica oleracea* var. *capitata* (cabbage). **Biocontrol Sci. Technol.** 26:504-515
- Ghini, R.; Bettiol, W. (2009). **Impactos das mudanças climáticas sobre o controle de doenças de plantas**. In: Bettiol, W.; Morandi, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 341p.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.** 43: 205-227.
- Gond, S. K.; Bergen, M. S.; Torres, M. S.; White Jr, J. F. (2015). Endophytic *Bacillus* spp. produce lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. **Microbiol. Res.** 172: 79-87.
- Gotor-Vila, A.; Teixido, N.; Francesco, A. Di; Usall, J.; Ugolini, L.; Torres, R.; Mari, M. (2017). Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. **Food Microbiol.** 64: 219-225.
- Gramaje, D. (2016). Uso de la termoterapia con agua caliente para el control de enfermedades fúngicas de lamadera. **Vida Rural.** 1: 48-57.
- Gramaje, D.; Alaniz, S.; Abad-Campos, P.; García-Jiménez, J.; Armengol, J. (2010). Effect of hot-water treatments *in vitro* on conidial germination and mycelial growth of grapevine trunk pathogens. **Ann. Appl. Biol.** 156: 231-241.
- Gramaje, D.; Armengol, J. (2011). Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. **Plant Dis.** 95: 1040–1055.
- Grasso, S.; Magnano San Lio, G. (1975). Infezioni di *Cylindrocarpon obtusisporum* su piante di vite in Sicilia. **Vitis.** 14: 38–39.
- Grigoletti, J. R. (1993). **Fusariose da videira – resistência de cultivares, sintomas e controle**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 20p.
- Haichar, F. Z.; Marol, C.; Berge, O.; Rangel-Castro, J. I. Prosser, J. I.; Balesdent, J.; Heulin, T.; Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal.** 2: 1221-1230.
- Halfeld-Vieira, B. A.; Vieira, J. R.; Romeiro, R. S.; Silva, H. S. A.; Baraca, T.; Pereira, M. C. (2006). Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesq. Agropec. Bras.** 41: 1247-1252.
- Halleen, F.; Crous, P. W.; Petrini, O. (2003). Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. **Austral. Plant Pathol.** 32: 47-52.
- Halleen, F.; Fourie, P. H.; Crous, P. W. (2007). Control of black foot disease in grapevine nurseries. **Plant Pathol.** 56: 637-645.

- Halleen, F.; Fourie, P. H. (2016). An integrated strategy for the proactive management of grapevine trunk disease pathogen infections in grapevine nurseries. **S. Afr. J. Enol. Vitic.** 37: 1-11.
- Halleen, F.; Khan, A.; Naseem, A.; Rupa, L.; Prathibha, B. (2011). Screening and potency evaluation of antifungal from soil isolates of *Bacillus subtilis* on selected fungi. **Int. J. Adv. Biotechnol. Res.** 10: 35-37.
- Halleen, F.; Schroers, H. J.; Groenewald, J. Z.; Crous, P.W. (2004). Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). **Stud. Mycol.** 50: 431-455.
- Halleen, F.; Schroers, H. J.; Groenewald, J. Z.; Rego, C.; Oliveira, H.; Crous, P. W. (2006). *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevine. **Stud. Mycol.** 55: 227-234.
- Hammami, I.; Rhouma, A.; Jaouadi, B.; Rebai, A.; Nesme, X. (2009). Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. **Lett. Appl. Microbiol.** 48: 253-260.
- Hassi, M.; David, S.; Haggoud, A.; El-Guendouzi, S.; El-Ouarti, A.; Souda, S. I.; Iraqui, M. (2012). *In vitro* and intracellular antimycobacterial activity of a *Bacillus pumilus* strain. **Afr. J. Microbiol. Res.** 6: 2299-2304.
- Henriques, A. O.; Moran Junior, C. P. (2000). Structure and assembly of the bacterial endospore coat. **Methods.** 20: 95-110.
- Hernández, S. M.; Hernández-Castillo, F. D.; Gallegos-Morales, G.; Lira-Saldivar, R. H.; Rodríguez-Herrera, R.; Cristóbal, N. (2011). Biocontrol of soil fungi in tomato with microencapsulates containing *Bacillus subtilis*. **Am. J. Agric. Biol. Sci.** 6: 89-195.
- Howel, C. H. (2007). Effect of seed quality and combination fungicide-*Trichoderma* spp. seed treatments on pre- and post-emergence damping-off in cotton. **Phytopathol.** 97: 66-71.
- Jones, E. E.; Brown, D. S.; Bleach, C. M.; Pathrose, B.; Barclay, C.; Jaspers, M. V.; Ridgway, H. J. (2012). First report of *Cylindrocladiella parva* as a grapevine pathogen in New Zealand. **Plant Dis.** 96: 144-152.
- Joo, G. J.; Kim, Y. M.; Lee, I. J.; Song, K. S.; Rhee, I. K. (2004). Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. **Biotechnol. Lett.** 26: 487-491.
- Kai, M.; Efmert, U.; Berg, G.; Piechulla, B. (2007). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Arch. Microbiol.** 187: 351-360.
- Kocsis, L.; Tarczal, E.; Kocsisné, G. M. (2016). Grapevine rootstock-scion interaction on root system development. **Acta Hort.** 1136: 27-31.

- Kupper, K. C.; Gimenes-Fernandes, N.; Goes, A. de. (2003). Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatol. Bras.** 28: 251-257.
- Lanna Filho, R.; Ferro, M. H.; Pinho, R. S. C. de. (2010). Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **R. Trop. Ci. Agr. Biol.** 4: 1-20.
- Larignon, P. (1998). Black foot disease in France. In: DXXX International Ampelography Society. **Proceedings Black Goo Occurrence and Symptoms of Grapevine Declines - IAS/ ICGTD**. pp. 89–90. Fort Valley, USA, 1999.
- Lazo-Javalera, M. F.; Troncoso-Rojas, R.; Tiznado-Hernandez, M. E.; Martinez-Tellez, M. A.; Vargas-Arispuro, I.; Islas-Osuna, M. A.; Rivera-Dominguez, M. (2016). Surface disinfection procedure and *in vitro* regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds. **Springer Plus.** 5: 1-10.
- Lazzarotto, J. J.; Taffarel, J. C.; Monteiro, R. (2016). **Caracterização e análise de aspectos sociais, tecnológicos e econômicos-financeiros da viticultura gaúcha e catarinense**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 54p.
- Leclère, V.; Béchet, M.; Adam, A.; Guez, J. S.; Wathelet, B.; Ongena, M.; Thonart, P.; Gancel, F.; Chollet-Imbert, M.; Jacques, P. (2005). Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organisms antagonistic and biocontrol activities. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 4577-4584.
- Lecomte, C.; Alabouvette, C.; Edel-Hermann, V.; Steinberg, C. (2016). Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: a review. **Biol. Control.** 101: 17–30.
- Leelasuphakul, W.; Hemmanee, P.; Chuenchitt, S. (2008). Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biol. Technol.** 48: 113-121.
- Lemos, E. E. P. de. (2014). **Organogênese**. In: Cid, L. P. B. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. 3. ed. ampl. Brasília: Embrapa – Cenargen. pp. 17-51.
- Lerin, S.; Grohs, D. S.; Almança, M. A. K.; Botton, M.; Mello-Farias, P.; Fachinello, J. C. (2017). Prediction model for phenology of grapevine cultivars with hot water treatment. **Pesq. Agropec. Bras.** 52: 887-895.
- Leslie, J. F.; Summerell, B. A. (2006). **The Fusarium laboratory manual**. Ames: Wiley-Blackwell. 388p.
- Lima, L. H. C.; De Marco, J. L.; Felix, C. R. (2000). **Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo**. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. v. 2. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. pp. 263-304.
- Lima, C. O. de C.; Marchi, M. N. G.; Lima-Brito, A.; Carneiro, C. E.; Bellintani, M. C.; Santana, J. R. F. de. (2012). Organogênese direta de *Orthophytum mucugense*. **Cienc. Rural.** 42: 249-254.

- Liminana, J.; Pacreau, G.; Boureau, F.; Menard, E.; David, S.; Himonnet, C.; Fermaud, M.; Goutouly, J.; Lecomte, P.; Dumot, V. (2009). Inner necrosis in a grapevine rootstock vineyard in the Cognac area (Charentes, France). **Phytopathol. Mediterr.** 48: 92-100.
- Logan, N. A.; Lebbe, L.; Hoste, B.; Goris, J.; Forsyth, G.; Heyndrickx, M.; Murray, B. L.; Syme, N.; Wynn-Williams, D. D.; De Vos, P. (2000). Aerobic endospore-forming bacteria from geothermal environments in northern Victoria Land, Antarctica, and Candlemas Island, South Sandwich archipelago, with the proposal of *Bacillus fumarioli* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 5: 1741-1753.
- Logan, N. A.; De Vos, P. (2009). **Genus I. *Bacillus* Cohn 1872**. In: Sneath, P. H. A. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. v. 3. Baltimore: Williams & Wilkins Company. pp. 1104-1139.
- Lombard, L.; Shivas, R. G.; To-Anun, C.; Crous, P. W. (2012). Phylogeny and taxonomy of the genus *Cylindrocladiella*. **Mycol. Prog.** 11: 835–868.
- Mello, L. M. R. de. (2016). Desempenho da vitivinicultura brasileira em 2015. **Campo & Negócio – HF**. 8: 108-116.
- Menezes-Netto, A. C.; Souza, A. L. K.; Arioli, C. J.; Souza, E. L.; Hickel, E. R.; Andrade, E. R.; Schuck, E.; Araujo Filho, J. V.; Gardin, J. P. P.; Dalbó, M. A.; Dambrós, R. N. (2016). **Declínio e morte de videiras no estado de Santa Catarina: causas e alternativas de controle**. Florianópolis: Epagri. 81 p.
- Morandi, M. A. B.; Bettiol, W. (2009). **Controle biológico de doenças de plantas no Brasil**. In: Bettiol, W.; Morandi, M. **Biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. pp. 15-28.
- Moyne, A. L.; Shelby, R.; Cleveland, T. E.; Tuzun, S. (2001). Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. **J. Appl. Microbiol.** 90: 622-629.
- Ollat, N.; Bordenave, L.; Tandonnet, J. P.; Boursiquot, J. M.; Marguerit, E. (2016). Grapevine rootstocks: origin and perspectives. **Acta Hort.** 1136: 11-22.
- Oliveira, H.; Rego, C.; Nascimento, T. (2004). Decline of young grapevines caused by fungi. **Acta Hort.** 652: 295-304.
- Omer, A. D.; Granett, J.; Wakeman, R. J. (1999). Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* on different *Vitis* rootstocks. **J. Phytopathol.** 147: 433-436.
- Ongena, M.; Duby, F.; Jourdan, E.; Beaudry, T.; Jadin, V.; Dommes, J.; Thonart, P. (2005). *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 67: 692-698.
- Ongena, M.; Jourdan, E.; Adam, A.; Paquot, M.; Brans, A.; Joris, B.; Arpigny, J.; Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitor of induced systemic resistance in plants. **Appl. Environ. Microbiol.** 9: 1084-1090.

- Ongena, M.; Thonart, P. (2006). **Resistance induced in plants by non-pathogenic microorganisms: elicitation and defense responses**. In: Teixeira Da Silva, J. A. (Ed.). **Floriculture ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues**, v. 3. London: Global Science Books. pp. 447-463.
- Othani, M. (2015). Regulation of RNA metabolism is important for *in vitro* dedifferentiation of plant cells. **J. Plant Res.** 128: 361-369.
- Pathirana, R.; Carra, A.; McLachuan, A.; Hedderley, D.; Panis, B.; Carimi, F. (2013). Cryotherapy of grapevine (*Vitis* spp.) to remove leafroll viruses from infected plants. In: XX Reunião Biental Da Linhagem. **Anais...** pp. 23-24. Nova Zelândia, 2013.
- Pertot, I.; Caffi, T.; Rossi, V.; Mugnai, L.; Hoffmann, C.; Grando, M. S.; Gary, C.; Lafond, D.; Duso, C.; Thiery, D.; Mazzoni, V.; Anfora, G. (2016). A critical review of plant protection tools for reducing pesticide use on grapevine and new perspectives for the implementation of IPM in viticulture. **Crop Prot.** 2: 12-25.
- Petit, E.; Gubler, W. D. (2007). First report of *Cylindrocarpon liriodendri* causing black foot disease in California. **Plant Dis.** 91: 1060-1060.
- Piechulla, B.; Pott, M. B. (2003). Plant scent-mediator of inter- and intraorganismic communication. **Planta.** 217: 687-689.
- Pomella, A. W. V.; Ribeiro, R. T. S. (2009). **Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas - uso e perspectivas**. In: Bettioli, W.; Morandi, M. **Biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. pp. 82-98.
- Probst, C. M. (2011). ***Cylindrocarpon* black foot disease in grapevines identification and epidemiology**. Christchurch, New Zealand: Lincoln. 275p.
- Protas, J. F. da S. (2009). Vitivinicultura brasileira: desafios estruturais e oportunidades tecnológicas. **Agropec. Catarin.** 22: 19-23.
- Raudales, R. E.; Parke, J. L.; Guy, C. L.; Fisher, P. R. (2014). Control of waterborne microbes in irrigation: a review. **Agric. Water Manag.** 143: 9-28.
- Rego, C.; Nascimento, T.; Oliveira, H. (2001). Characterization of *Cylindrocarpon destructans* isolates from grapevines in Portugal. **Phytopathol. Mediterr.** 40: 343-350.
- Rego, C.; Farropas, L.; Nascimento, T.; Cabral, A.; Oliveira, H. (2006). Black foot of grapevine, sensitivity of *Cylindrocarpon destructans* to fungicides. **Phytopathol. Mediterr.** 45S: 93-100.
- Rezende, R. K. S.; Paiva, L. V.; Paiva, R.; Chalfun Júnior, A.; Torga, P. P.; Castro, E. M. de. (2008). Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam. **Cienc. Agrotec.** 32: 821-827.
- Riaz, S.; Doligez, A.; Henry, R. J.; Walker, M. A. (2007). **Genome mapping and molecular breeding in plants: fruits and nuts**. Califórnia: Springer Berlin Heidelberg. 328p.

- Ribas, P. P. (2010). Compatibilidade de *Trichoderma* spp. a princípios ativos de fungicidas comerciais aplicados na cultura do feijão. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.
- Ribeiro, A. P. (2012). Micropropagação, avaliação da variação somaclonal e detecção de vírus em videiras. **Dissertação de mestrado**. Programa Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras. Lavras, Brasil.
- Roberts, D. P.; Lohrke, S. M.; Meyer, S. L.; Buyer, J. S.; Bowers, J. H.; Baker, C. J.; Li, W., de Souza, J. T.; Lewis, J. A.; Chung, S. (2005). Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. **Crop Prot.** 24: 141–155.
- Rosenblueth, M.; Martinez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Mol. Plant Microbe Interact.** 19: 827-837.
- Rumbos, I.; Rumbou, R. (2001). Fungi associated with esca and young grapevine decline in Greece. **Phytopathol. Mediterr.** 40: S330–S335.
- Ryan, R. P.; Germaine, K.; Franks, A.; Ryan, D. J.; Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiol. Lett.** 278: 1-9.
- Sabir, A.; Yazici, M. S. A.; Kara, Z.; Sahin, F. (2012). Growth and mineral acquisition response of grapevine rootstocks (*Vitis* spp.) to inoculation with different strains of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **J. Sci. Food Agric.** 92: 2148–2153.
- Santoyo, G.; Del Carmen Orozco-Mosqueda, M.; Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. **Biocontrol Sci. Technol.** 22: 855–872.
- Santos, R. F. dos; Durigon, M. R.; Blume, E. (2015). Aggressiveness of “*Cylindrocarpon*” spp. and *Cylindrocarpon pauciseptatum* associated with black foot disease of grapevine. **Rev. Bras. Cienc. Agr.** 10: 49-53.
- Santos, R. F. dos; Heckler, L. I.; Lazarotto, M.; Garrido, L. da R.; Rego, C.; Blume, E. (2016). *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* for control of *Dactylonectria macrodidyma* in grapevine. **Phytopathol. Mediterr.** 55: 293–300.
- Schallmey, M.; Singh, A.; Owen, P. W. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Can. J. Microbiol.** 50: 1–17.
- Scheck, H. J.; Vasquez, S. J.; Gubler, W. D. (1998). First report of black-foot disease, caused by *Cylindrocarpon obtusisporum*, of grapevine in California. **Plant Dis.** 82: 448-448.
- Schuck, E.; Dal Bó, M. A.; Andrade, E. R de; Rosier, J. P. (2007). **Avaliação de cultivares para o estado de Santa Catarina 2007/2008**. Florianópolis: Epagri. pp. 139-143.
- Shafí, J.; Tian, H.; Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnol. Biotechnol. Equip.** 1: 446-459.

- Sidoti, A.; Buonocore, E.; Serges, T.; Mugnai, L. (2000). Decline of young grapevines associated with *Phaeoacremonium chlamydosporum* in SicCyl (Italy). **Phytopathol. Mediterr.** 39: 87-91.
- Silva, T. P. (2008). Desenvolvimento vegetativo de porta-enxertos de videira em condições subtropicais. **Dissertação de mestrado**. Departamento de Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, Brasil.
- Silveira, S. V. da; Hoffmann, A.; Santos, R. S. S. dos. (2017). **Estágio atual e procedimentos para adoção do sistema de produção integrada de uva para processamento**. In: Silveira, S. V. da; Garrido, L. da R.; Hoffmann, A. (Eds.). **Produção integrada de uvas para processamento: PIUP**. v. 1. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 74p.
- Sluis, A.; Hake, S. (2015). Organogenesis in plants: initiation and elaboration of leaves. **Trends Gen.** 31: 300-306.
- Smart, R.; Mugnai, L.; Lane, C. (2012). International viticultural consultant's view of grapevine trunk diseases and their impact on clients. **Phytopathol. Mediterr.** 51: 433-434.
- Sônego, O. R.; Garrido, L. da R. (2007). Doenças fúngicas da videira e seu controle. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. **Disponível (online)**. <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/doevid.html> (22 de junho).
- Sônego, O. R.; Garrido, L. R.; Grigoletti, A. (2005). **Principais doenças fúngicas da videira no sul do Brasil**. Embrapa Uva e Vinho: Bento Gonçalves. 32p.
- Stangarlin, J. R.; Kuhn, O. J.; Toledo, M. V.; Portz, R. L.; Schwan-Estrada, K. R. F.; Pascholati, S. F. (2011). A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**. 10:18-46.
- Sugiyama, M. (2015). Historical review of research on plant cell dedifferentiation. **J. Plant Res.** 128: 349-359.
- Tamehiro, N.; Okamoto-Hosoya, Y.; Okamoto, S.; Ubukata, M.; Hamada, M.; Naganawa, H.; Ochi, K. (2002). BacCylsocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. **Antimicrob. Agents Chemother.** 46: 315-320.
- Tandonnet, J. P.; Cookson, S. J.; Vivin, P.; Ollat, N. (2010). Scion genotype control biomass allocation and root development in grafted grapevines. **Aust. J. Grape Wine Res.** 16: 290-300.
- Teunissen, H. A.; Verkooijen, J.; Cornelissen, B. J.; Haring, M. A. (2002). Genetic exchange of avirulence determinants and extensive karyotype rearrangements in parasexual recombinants of *Fusarium oxysporum*. **Mol. Genet. Genomics**. 268: 298-310.
- Toffanin, A.; D'Onofrio, C.; Carrozza, G. P.; Scalabrelli, G. (2016). Use of beneficial bacteria *Azospirillum brasiliense* Sp245 on grapevine rootstocks grafted with 'Sangiovese'. **Acta Hort.** 1136: 177-184.

- Tokpah, D. P.; Li, H.; Wang, L.; Liu, X.; Mulbah, Q. S.; Liu, H. (2016). An assessment system for screening effective bacteria as biological control agents against *Magnaporthe grisea* on rice. **Biol. Control**. 103: 21–29.
- Van Loon, L. C.; Bakker, P. A. H. M. (2005). **Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria**. In: Siddiqui, Z. A. (Ed.). **PGPR: biocontrol and biofertilization**. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 39-76.
- Waite, H. (2010). Trunk diseases and vine failure: the costs of poor quality propagating and planting material. **Aust. New Zeal. Grape. Wine**. 55: 21-22.
- Waite, H.; Morton, L. (2007). Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material. **Phytopathol. Mediterr.** 46: 5-17.
- Waite, H.; Whitelaw-Weckert, M.; Torley, P. (2015). Grapevine propagation: principles and methods for the production of high-quality grapevine plant material. **New Zeal. J. Crop Hort. Sci.** 43: 144-161.
- Whitelaw-Weckert, M. A.; Nair, N. G.; Lamont, R.; Alonso, M.; Priest, M. J.; Huang, R. (2007). Root infection of *Vitis vinifera* by *Cylindrocarpon liriodendri* in Australia. **Austral. Plant Pathol.** 36: 403–406.
- Whitelaw-Weckert, M.; Rahman, L.; Appleby, L.; Hall, A.; Clark, A. C.; Waite, H. (2013). Co-infection by Botryosphaeriaceae and “*Cylindrocarpon*” spp. fungi during propagation causes decline of young grafted grapevines. **Plant Pathol.** 62: 1226–1237.
- Wicaksono, W. A.; Jones, E. E.; Monk, J.; Ridgway, H. J. (2017). Using bacterial endophytes from a New Zealand native medicinal plant for control of grapevine trunk diseases. **Biol. Control**. 114: 65-72.
- Willis, L.; Refahi, Y.; Wightman, R.; Landrein, B.; Teles, J.; Huang, K. C.; Meyerowitz, E. M.; Jönsson, H. (2016). Cell size and growth regulation in the *Arabidopsis thaliana* apical stem cell niche. **PNAS**. 113: E8238–E8246.
- Xiao, K.; Kinkel, L. L.; Samac, D. A. (2002). Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. **Biol. Control**. 23: 285-295.
- Yao, A.; Bochow, H.; Karimov, S.; Boturov, U.; Sanginboy, S.; Sharipov, A. (2006). Effect of FZB24R *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. **Arch. Phytopathol. Plant Prot.** 39: 323-328.
- Zart, M. (2012). Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica do ataque da pérola-da-terra, *Eurhizococcus brasiliensis* (Wille, 1922) (Hemiptera: Margarodidae), em videiras. **Tese de doutoramento**. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.
- Zhang, J. X., Xue, A. G., Tambong, J. T. (2009). Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rot caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. **Plant Dis.** 93: 1317-1323.