

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**RESISTÊNCIA INDUZIDA POR ELICITORES E  
PROTEÇÃO DE VIDEIRA CONTRA MÍLDIO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Geísa Finger**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

# **RESISTÊNCIA INDUZIDA POR ELICITORES E PROTEÇÃO DE VIDEIRA CONTRA MÍLDIO**

**Geísa Finger**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de  
Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em  
Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),  
como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Agronomia**

**Orientadora: Profa. PhD. Elena Blume**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**RESISTÊNCIA INDUZIDA POR ELICITORES E PROTEÇÃO DE  
VIDEIRA CONTRA MÍLDIO**

elaborada por  
**Geísa Finger**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Agronomia**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Elena Blume, PhD.**  
(Presidente/orientador)

---

**Marlove Fátima Brião Muniz, Dr. (UFSM)**

---

**Marcus André Kurtz Almança, Dr. (IFRS/Câmpus Bento Gonçalves)**

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2015.

Aos meus pais Aldamir e Julia, pela educação, amor, apoio incondicional e por terem sido exemplo de perseverança na minha vida.

**Dedico-lhes este trabalho**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, e ao corpo docente pelos ensinamentos transmitidos.

À minha orientadora Elena Blume, pelo suporte, no pouco tempo que lhe coube, pelos ensinamentos e incentivos.

Ao meu co-orientador Fábio Rossi Cavalcanti, pela amizade, ensinamentos, dedicação, paciência e acolhimento para a realização do projeto de pesquisa.

À professora Dra. Marlove Fátima Brião Muniz pela co-orientação e ajuda.

A todos funcionários da Embrapa que, de alguma forma, colaboraram para que o trabalho de pesquisa pudesse ser desenvolvido da melhor forma possível.

Ao professor Dr. Marcus André Kurtz Almança, pelo apoio e ajuda em todos os momentos.

Ao Thiago Hunoff e Carine Rusin pela ajuda e amizade.

Às empresas Syngenta, Grupo Farroupilha e Ballagro pela doação dos produtos utilizados nos ensaios de controle biológico.

À toda minha família, tios, tias, primos, primas e, especialmente, aos meus pais Aldamir e Julia, pelos conselhos, estímulo e apoio durante todo esse período.

À Jussara e Pompeu (*in memoriam*) pelo acolhimento e amizade em Bento Gonçalves.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria pelo companheirismo e amizade durante todos os anos.

Aos amigos e todas aquelas pessoas que, mesmo não mencionadas, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada.

# RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Universidade Federal de Santa Maria

## RESISTÊNCIA INDUZIDA POR ELICITORES E PROTEÇÃO DE VIDEIRA CONTRA MÍLDIO

Autor: Geísa Finger

Orientadora: Elena Blume

Local da defesa e data: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2015.

A videira é uma frutífera que possui relevante importância no setor econômico mundial, sendo que vários fatores podem comprometer seu desenvolvimento e conseqüente rendimento, incluindo o ataque de patógenos. A doença conhecida como míldio da videira, causada pelo pseudofungo *Plasmopara viticola*, causa sérios danos à cultura quando não controlada. Dessa maneira, a principal forma de controle da doença está associada à utilização de químicos, os quais causam riscos ao ambiente e à saúde do homem. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de agentes biológicos e quitosana, na viabilidade de esporângios de míldio, o efeito no progresso da doença e os mecanismos de indução de resistência vegetal, em plantas de videira cv. Cabernet Sauvignon. Hipotetizou-se que os agentes biológicos *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis*, bem como quitosana têm a capacidade de afetar diretamente a viabilidade de esporângios de *P. viticola*, assim como atrasar ou evitar o progresso de míldio e elicitar respostas de defesa em células foliares de videira. Para tanto, a viabilidade de esporângios de *P. viticola* foi analisada *in vitro* e experimentos em casa de vegetação foram conduzidos, afim de, acompanhar o progresso de míldio em plantas de videira expostas aos produtos estudados. Em outro experimento, na ausência do patógeno, tecido foliar de plantas de videira, submetidas aos mesmos produtos, foi coletado para realização de análises bioquímicas e metabólicas, visando à caracterização da indução de resistência (IR) celular vegetal. Foram determinadas atividades de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) como peroxidases de guaicol, quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases e polifenoloxidasas em folhas expostas aos produtos, bem como os teores de fenóis solúveis totais e lignina. A quitosana, mas não os agentes biológicos, reduziram a viabilidade dos esporângios. Todos os produtos estudados geraram alterações na produção de PRPs e fenóis totais. Os teores de lignina embora não significativos em relação à testemunha demonstraram aumento, e isso pode estar associado com a porcentagem de proteção que os produtos conferiram às plantas de videira na área abaixo da curva de progresso da doença, induzindo a produção de compostos envolvidos na síntese de lignina.

**Palavras-chave:** *Vitis vinifera*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma* spp., quitosana, PR-proteínas, lignina.

## ABSTRACT

Master's Degree Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### RESISTANCE INDUCED BY ELICITORS AND PROTECTION OF GRAPEVINE AGAINST DOWNY MILDEW

Author: Geísa Finger

Adviser: Elena Blume

Place of the defense and date: Santa Maria, February 27<sup>th</sup>, 2015

The grapevine is a fruit that has significant importance in the world economic sector and several factors may compromise its development and especially productivity, including pathogen attack. The disease known as downy mildew is caused by *Plasmopara viticola* and may cause serious damage to the crop if not controlled. Thus, the major way of controlling the disease is associated with the use of fungicides, which causes risks to the environment and human health. The aim of this study was to evaluate the potential of biological agents and chitosan on controlling downy mildew through the induced resistance mechanism in grapevine cv. Cabernet Sauvignon. It was hypothesized that the biological agents *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis*, as well as chitosan have the ability to affect directly the viability of *P. viticola* sporangia and to elicit defense responses in leaf cells of grapevine. Germination of sporangia was measured *in vitro* and experiments in greenhouse were conducted, aimed at monitoring the progress of downy mildew on plants exposed to the products studied and, two days later, inoculated with *P. viticola*. In another experiment, in the absence of the pathogen, leaf tissue of grapevine plants exposed to the same products was collected for conducting biochemical and biological analysis, aiming to characterize the induction of resistance (IR) in plant cells. The activity of pathogenesis related proteins (PRPs) such as guaiacol peroxidases, chitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, and polyphenoloxidases in leaves exposed to the products was determined, as well as the levels of total soluble phenols and lignin. Chitosan, but not the biological control agents, reduced the viability of sporangia of *P. viticola*. All products promoted protection, although not significant when compared to control plants. All studied products produced alterations in the production of PRPs and total phenols. Despite the sharp increase, but not significant, in the lignin content of leaves, small reduction in the area under the mildew progress curve was observed that can be attributed to mechanisms of resistance induction activated by the products studied through elicitor action.

**Key-words:** *Vitis vinifera*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma* spp, chitosan, PR-proteins, lignin.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Famílias de PR-proteínas.....	31
---	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estrutura química da molécula de quitina e quitosana .....27
- Figura 2 - Representação esquemática do processo enzimático e não enzimático de condensação para escurecimento.....34
- Figura 3– Hidrólise da  $\beta$ -1,3-glucana pela  $\beta$ -1,3-glucanase.....35
- Figura 4 - Teste de viabilidade de esporângios de *P. viticola* no lançamento de zoósporos em meio aquoso, medidos em porcentagem do controle (Ctrl). Ensaio para % de esporângios ( $10^5$  esporângios  $\text{mL}^{-1}$ ) que lançaram zoósporos para o meio (esporângios ativos/viáveis) sobre o número total de esporângios contados por tratamento ( $n = 400$ ), após 15 HAP. Os tratamentos avaliados foram: ‘Qui36’ (Quitosana  $3600 \mu\text{L L}^{-1}$ ), ‘Bac2’ (*Bacillus subtilis*, Serenade®,  $2 \text{ mL L}^{-1}$ ), ‘Eco’ (*T. harzianum*, Ecotrich,  $4 \text{ g L}^{-1}$ ), ‘Qua’ (*T. asperellum*, Quality,  $4 \text{ g L}^{-1}$ ); ‘ASM’ (acibenzolar S-metil, Bion®,  $0,8 \text{ g L}^{-1}$ ); ‘Midas’ (Midas®,  $1,2 \text{ g L}^{-1}$ ), sendo ‘Ctrl’, o controle em água destilada. Valores seguidos com as mesmas letras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).....43
- Figura 5 - Curvas de progresso de doença em plantas clonais de ‘Cabernet Sauvignon’, expostas a agentes de controle biológico e inoculadas com *P. viticola*. Em todos os gráficos, foram plotadas curvas de progresso de plantas pulverizadas com água destilada (Ctrl-) e acibenzolar S-metil (ASM Bion® 50%  $0,4 \text{ g L}^{-1}$ ), respectivamente como controles negativos e positivos. A. Progresso do míldio em plantas tratadas com *T. asperellum* (Quality  $2 \text{ g L}^{-1}$ ). B. Progresso do míldio em plantas tratadas com *T. asperellum* (Quality  $4 \text{ g L}^{-1}$ ); C. Progresso do míldio em plantas tratadas com *T. harzianum* (Ecotrich  $2 \text{ g L}^{-1}$ ); D. Progresso do míldio em plantas tratadas com *T. harzianum* (Ecotrich  $4 \text{ g L}^{-1}$ ). Dentro dos dias de avaliação, não foram observadas diferenças significativas, de acordo com o teste t (Student) a um nível de significância de 5%.....46
- Figura 6 - Curvas de progresso de doença em plantas clonais de ‘Cabernet-Sauvignon’, expostas a quitosana e *B. subtilis*, e inoculadas com *P. viticola*. Em todos os gráficos, foram plotadas curvas de progresso de plantas pulverizadas com água destilada (Ctrl-) e acibenzolar S-metil (ASM, Bion® 50%  $0,4 \text{ g L}^{-1}$ ). A. Progresso do míldio em plantas tratadas com quitosana (Quitosana Polymar,  $600 \mu\text{L L}^{-1}$ ); B. Progresso do míldio em plantas tratadas com quitosana (Quitosana Polymar,  $3600 \mu\text{L L}^{-1}$ ); C. Progresso do míldio em plantas tratadas com *Bacillus subtilis* (Serenade®,  $1 \text{ mL L}^{-1}$ ); D. Progresso do míldio em plantas tratadas com *B. subtilis* (Serenade®,  $2 \text{ mL L}^{-1}$ ). Asteriscos dentro do dia de avaliação representam diferenças significativas entre o tratamento e Ctrl-, de acordo com o teste t (Student) a um nível de significância de 5%.....47
- Figura 7 - Teores de proteínas solúveis totais em folhas de videira ‘Cabernet Sauvignon’ em rebrotas de 45 dias. Coletas de material fresco para a extração foram

realizadas 12, 24, 48 e 72 horas após o tratamento (HAT) das substâncias estudadas. As substâncias testadas (-■-) foram: A. *T. harzianum* (Ecotrich, 4 g L<sup>-1</sup>), B. *B. subtilis* (Serenade<sup>®</sup>, 2 mL L<sup>-1</sup>), C. Quitosana (Polymar, 3600 μL L<sup>-1</sup>), D. Acibenzolar S-metil (ASM, Bion<sup>®</sup> 50%, 0,8 g L<sup>-1</sup>), sendo 'Ctrl' (-○-), o controle em água destilada. Barras de erros indicam desvio-padrão da média.....49

Figura 8 - Atividades de peroxidases de guaiacol (GPX) em folhas de videira 'Cabernet Sauvignon'. Amostras de tecido foliar fresco foram obtidas de rebrotas de 45 dias e respostas enzimáticas foram monitoradas em 12, 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos tratamentos (HAT) das substâncias estudadas. As substâncias testadas (-■-) foram: A. *T. harzianum* (Ecotrich, 4 g L<sup>-1</sup>), B. *B. subtilis* (Serenade<sup>®</sup>, 2 mL L<sup>-1</sup>), C. Quitosana (Polymar, 3600 μL L<sup>-1</sup>), D. Acibenzolar S-metil (ASM, Bion<sup>®</sup> 50%, 0,8 g L<sup>-1</sup>), sendo 'Ctrl' (-○-), o controle em água destilada. Barras de erros indicam desvio-padrão da média.....51

Figura 9 - Atividades de polifenoloxidasas (PPO) na oxidação de orto-difenóis em folhas de videira 'Cabernet Sauvignon'. Amostras de tecido foliar fresco foram obtidas de rebrotas de 45 dias e respostas enzimáticas foram monitoradas em 12, 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos tratamentos (HAT) das substâncias estudadas. As substâncias testadas (-■-) foram: A. *T. harzianum* (Ecotrich, 4 g L<sup>-1</sup>), B. *B. subtilis* (Serenade<sup>®</sup>, 2 mL L<sup>-1</sup>), C. Quitosana (Polymar, 3600 μL L<sup>-1</sup>), D. Acibenzolar S-metil (ASM, Bion<sup>®</sup> 50%, 0,8 g L<sup>-1</sup>), sendo 'Ctrl' (-○-), o controle em água destilada. Barras de erros indicam desvio-padrão da média.....53

Figura 10 - Atividades de β-1,3-glucanases (GLU) em folhas de videira 'Cabernet Sauvignon'. Amostras de tecido foliar fresco foram obtidas de rebrotas de 45 dias e respostas enzimáticas foram monitoradas em 12, 24, 48 e 72 horas após o tratamento (HAT) das substâncias estudadas. As substâncias testadas (-■-) foram: A. *T. harzianum* (Ecotrich, 4 g L<sup>-1</sup>), B. *B. subtilis* (Serenade<sup>®</sup>, 2 mL L<sup>-1</sup>), C. Quitosana (Polymar, 3600 μL L<sup>-1</sup>), D. Acibenzolar S-metil (ASM, Bion<sup>®</sup> 50%, 0,8 g L<sup>-1</sup>), sendo 'Ctrl' (-○-), o controle em água destilada. Barras de erros indicam desvio-padrão da média.....55

Figura 11 - Atividades de quitinases (CHI) em folhas de videira 'Cabernet Sauvignon'. Amostras de tecido foliar fresco foram obtidas de rebrotas de 45 dias e respostas enzimáticas foram monitoradas em 12, 24, 48 e 72 horas após o tratamento (HAT) das substâncias estudadas. As substâncias testadas (-■-) foram: A. *T. harzianum* (Ecotrich, 4 g L<sup>-1</sup>), B. *B. subtilis* (Serenade<sup>®</sup>, 2 mL L<sup>-1</sup>), C. Quitosana (Polymar, 3600 μL L<sup>-1</sup>), D. Acibenzolar S-metil (ASM, Bion<sup>®</sup> 50%, 0,8 g L<sup>-1</sup>), sendo 'Ctrl' (-○-), o controle em água destilada. Barras de erros indicam desvio-padrão da média.....56

Figura 12 - Teores de fenóis solúveis totais em folhas de videira 'Cabernet Sauvignon' em rebrotas de 45 dias. Coletas de material fresco para a extração salina foram realizadas 12, 24, 48 e 72 horas após o tratamento (HAT) das substâncias estudadas (-■-) foram: A. *T. harzianum* (Ecotrich, 4 g L<sup>-1</sup>), B. *B. subtilis* (Serenade<sup>®</sup>, 2 mL L<sup>-1</sup>), C. Quitosana (Polymar, 3600 μL L<sup>-1</sup>), D. Acibenzolar S-metil (ASM, Bion<sup>®</sup> 50%, 0,8 g L<sup>-1</sup>), sendo 'Ctrl' (-○-), o controle em água destilada. Barras de erros indicam desvio-padrão da média.....58

Figura 13 - Teores de lignina em folhas de videira 'Cabernet Sauvignon'. Amostras de

tecido foliar fresco foram obtidas de rebrotas de 45 dias e 72 horas após o tratamento (HAT) das substâncias estudadas. As substâncias foram: 'Eco' (*T. harzianum*, Ecotrich, 4 g L<sup>-1</sup>), 'Bac' (*B. subtilis*, Serenade<sup>®</sup>, 2 mL L<sup>-1</sup>), 'Qui' (Quitosana, Polymar, 3600 µL L<sup>-1</sup>), 'ASM' (acibenzolar S-metil, ASM, Bion<sup>®</sup> 50%, 0,8 g L<sup>-1</sup>), sendo 'Ctrl', o controle em água destilada. Não há diferenças significativas entre as médias, dentro de cada tratamento avaliado, de acordo com o teste de Tukey (P > 0,05).....60

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Cultura da videira</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 Doenças da videira e impactos na vitivinicultura</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3 <i>Plasmopara viticola</i> e o manejo do míldio</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4 Controle biológico e seu papel no controle de doenças da videira</b> .....	<b>20</b>
<b>2.5 Mecanismos de defesa vegetal contra doenças</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6 Tipos de resistência e a percepção da planta ao patógeno</b> .....	<b>23</b>
2.6.1 Elicitores químicos (ASM e Quitosana) e aspectos de indução de resistência (IR) .....	25
2.6.2 Agentes de controle biológico e elicitores “biológicos” .....	28
2.6.2.1 <i>Trichoderma</i> spp.....	28
2.6.2.2 <i>Bacillus</i> spp. ....	29
<b>2.7 Proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas)</b> .....	<b>30</b>
2.7.1 Peroxidases.....	31
2.7.2 Polifenoloxidasas .....	32
2.7.3 Quitinases e $\beta$ -1,3-glucanases .....	34
2.7.4 Polímeros de parede e o papel da lignina na defesa vegetal .....	36
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1 Efeito de agentes de controle biológico, ASM e quitosana sobre a viabilidade de esporângios de <i>Plasmopara viticola</i></b> .....	<b>37</b>
<b>3.2 Redução do progresso do míldio em plantas expostas a agentes de controle biológico e quitosana</b> .....	<b>37</b>
<b>3.3 Respostas metabólicas associadas à indução de resistência promovida por agentes de controle biológico e quitosana</b> .....	<b>39</b>
3.3.1 Extração e dosagem de proteínas solúveis totais .....	39
3.3.2 Determinação da atividade de peroxidases (GPX).....	40
3.3.3 Determinação da atividade de polifenoloxidasas (PPO).....	40
3.3.4 Determinação da atividade de quitinase (CHI) .....	40
3.3.5 Determinação de beta-1,3-glucanase (GLU).....	41
3.3.6 Determinação de fenóis solúveis totais .....	41
3.3.7 Determinação de lignina em folhas .....	41
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>

<b>4.1 Ações <i>in vitro</i> de agentes de controle biológico sobre estruturas de <i>Plasmopara viticola</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2 Controle de míldio por agentes de controle biológico e quitosana .....</b>	<b>44</b>
<b>4.3 Atividade de enzimas relacionadas com a indução de resistência vegetal.....</b>	<b>48</b>
4.3.1 Extração e dosagem de proteínas solúveis totais .....	48
4.3.2 Determinação da atividade de peroxidase (GPX) .....	49
4.3.3 Determinação da atividade de polifenoloxidase (PPO).....	51
4.3.4 Determinação da atividade de $\beta$ -1,3-glucanases (GLU) .....	54
4.3.5 Determinação da atividade de quitinase (QUI).....	55
4.3.6 Determinação de fenóis solúveis totais .....	57
4.3.7 Determinação de lignina em folhas .....	59
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>60</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura da videira detém grande importância no setor econômico mundial. Fatores bióticos ou abióticos podem comprometer o desenvolvimento da cultura. As doenças destacam-se dentre os fatores bióticos, podendo comprometer a planta de videira tanto quantitativa quanto qualitativamente. A doença conhecida como míldio da videira, causada pelo pseudofungo *Plasmopara viticola*, pode destruir completamente um vinhedo, quando não controlada. Ocorre principalmente no período vegetativo da cultura, infectando as folhas e diminuindo a área fotossintetizante das mesmas, podendo atacar também ramos, flores e cachos comprometendo assim, a produtividade (BERGAMIN et al., 1997).

Atualmente, a principal forma de controle de doenças nos vinhedos é através da utilização de agrotóxicos, os quais podem acarretar sérios problemas aos consumidores e ao meio ambiente, principalmente quando os mesmos são utilizados de forma abusiva ou por negligência às recomendações do fabricante. Outro problema, ocasionado pela utilização excessiva e indiscriminada, é a possibilidade de raças dos fitopatógenos tornarem-se resistentes aos princípios ativos dos agrotóxicos. Por isso, é enorme a necessidade da busca por alternativas para diminuir ou, quando possível, evitar o uso de agrotóxicos.

O Manejo Integrado de Pragas e Doenças (MIPD) é uma ferramenta em adoção crescente por agricultores interessados em esclarecimento, tecnificação, rastreabilidade e, principalmente, redução nas aplicações de pesticidas. A adoção do MIPD, em uma situação particular, vai depender da combinação correta de técnicas de cultivo associadas à fitossanidade, introduzidas no momento certo durante a condução da lavoura. O MIPD da videira pode se valer de inúmeros recursos para mitigar doenças, desde a adequação dos sistemas de condução e a alteração de podas, até o uso de produtos baseados em controle biológico e indução de resistência.

Tanto o controle biológico quanto à indução de resistência de plantas a patógenos vêm sendo adotados, em algumas culturas, como forma de controle sustentável associada a boas práticas de manejo. Na indução de resistência, mecanismos de defesa vegetal que se encontram latentes na planta, podem ser desencadeados por elicitores (moléculas que ativam a sinalização da defesa vegetal), antes da chegada do patógeno. Essa ativação pode ocorrer no local em que o elicitor entrou em contato com a célula hospedeira ou pode ser sistêmica, manifestando-se em outras partes da planta, distantes do sítio de aplicação.

No controle biológico, micro-organismos possuem mecanismos que dificultam ou impedem a infecção de um patógeno no tecido hospedeiro e, geralmente, tais mecanismos se baseiam em uma inter-relação ecológica bastante íntima entre o agente de controle e o patógeno, obviamente deletéria a este. Tais inter-relações podem ser baseadas em mecanismos de antibiose, competição, micoparasitismo, degradação de enzimas da parede celular do patógeno e indução de resistência (LO, 1998).

Assim, os objetivos deste trabalho foram investigar a ação de agentes abióticos e de controle biológico, verificando: i) a viabilidade *in vitro* de esporângios de *P. viticola* ii) a proteção desses produtos em plantas de videira inoculados com o patógeno iii) a ativação de defesas vegetais por indução de resistência. Uma vez que, se hipotetiza que *Trichoderma* spp., *B. subtilis* e quitosana possuem elicitores capazes de promover respostas de defesa em células foliares de plantas de videira, cv. Cabernet Sauvignon contra *Plasmopara viticola*, através do aumento das atividades enzimáticas, as quais estão relacionadas com os mecanismos de defesa da planta.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cultura da videira

No Brasil, a história vitivinícola teve início com a colonização. A expedição comandada por Martim Afonso de Souza, trouxe as primeiras mudas de videira (*Vitis vinifera* L.) para o Brasil, as quais foram plantadas na Capitania de São Vicente, localizada no sudeste do país (IBRAVIN, 2010), atual estado de São Paulo, em 1532. No ano de 1626, no Rio Grande do Sul, os padres jesuítas introduziram as primeiras videiras, porém somente a partir de 1875 com a chegada dos imigrantes italianos a viticultura gaúcha ganhou impulso (LEÃO, 2010).

As videiras são classificadas no gênero *Vitis*, família Vitaceae, são espécies que possuem hábito trepador, cujas folhas se desenvolvem alternadamente no caule a partir dos nós, podendo ocorrer a formação de gavinhas ou cachos florais opostos das folhas. As flores são minúsculas e delicadas, uni- ou bissexuais, ocorrendo em cachos florais que se formam em grupos de quatro ou cinco, com os estames desenvolvendo-se em frente às pétalas. O ovário consiste de dois carpelos e a fruta (uva) pode conter até quatro sementes (JACKSON, 2008).

A viticultura possui grande importância no setor econômico mundial. Estima-se que no ano de 2010, a área mundial com videiras foi de aproximadamente 7,20 milhões de hectares, com uma produção de 68,31 milhões de toneladas. Mundialmente, os países que se destacam com as maiores áreas cultivadas com a frutífera são Espanha, França, Itália, China e Turquia, sendo que o Brasil ocupa o 20º lugar no ranking de área cultivada com videiras (MELLO, 2013), com uma área em torno de 80630 hectares (IBGE, 2013).

No Brasil, destacam-se duas regiões produtoras de uva bem distintas, a de clima temperado e subtropical, encontrada no paralelo 30º sul no estado do Rio Grande do Sul, e a de clima tropical, situada no paralelo 9º sul, na Região Nordeste (PROTAS et al., 2002).

Os principais destinos da uva, no Brasil, são a produção de vinhos, espumantes e sucos, assim como o consumo *in natura* (BRITO, 2011). O Rio Grande do Sul é responsável por 90% da produção nacional de vinhos, sucos e derivados da uva. A Região da Serra Gaúcha, além de produzir uvas de mesa e para processamento, tem na viticultura um atrativo

turístico (MELLO, 2012), sendo que a cidade de Bento Gonçalves, no ano de 2010, deteve mais da metade da produção brasileira de uva (IBGE, 2010). Na região Nordeste, o Vale do São Francisco tem se destacado na produção e exportação de uvas finas de mesa, com o pólo agrícola Petrolina, em Pernambuco, e Juazeiro, na Bahia (OLIVEIRA et al., 2011).

## 2.2 Doenças da videira e impactos na viticultura

A viticultura possui algumas limitações no seu cultivo, principalmente no âmbito das doenças, que constituem o principal problema para a produção quantitativa e qualitativa da uva. Quando as condições climáticas são favoráveis durante o ciclo da cultura, a videira pode ser atacada por inúmeros patógenos e os tratamentos fitossanitários podem atingir 30% dos custos de produção. Nas regiões Sul e Sudeste do país, devido à elevada precipitação anual, principalmente no período vegetativo da cultura, ocorrem epidemias de míldio e podridões de cacho, diferentemente da região produtora do Nordeste, cujo clima seco propicia epidemias de oídio. Portanto, o ambiente possui um papel fundamental no desenvolvimento das doenças (SÔNEGO et al., 2005).

As doenças podem afetar a fisiologia da planta de videira e influenciar seu rendimento e a qualidade de seu produto em diferentes graus. Dentre as principais doenças fúngicas da videira destacam-se os fungos *Botrytis cinerea* (podridão cinzenta), *Plasmopara viticola* (míldio), *Uncinula necator* (oídio), *Phaeomoniella chlamydospora* (doença de Petri) e *Cylindrocarpon destructans* (pé-preto da videira) (JACKSON, 2008).

Para que o cultivo da videira seja rentável ao agricultor, é necessário fazer uso de métodos de controle de doenças, os quais podem se basear no manejo integrado de doenças e pragas (MIDP), que consiste na utilização integrada de várias técnicas de controle de doenças.

## 2.3 *Plasmopara viticola* e o manejo do míldio

*Plasmopara viticola* (Berkeley & M. A. Curtis) Berl. & De Toni. é o agente causal da doença conhecida como míldio da videira, presente em várias partes do mundo, um Chromista, oomiceto que atua como parasita obrigatório, pertencente à família

Peronosporaceae. O pseudofungo infecta principalmente as folhas, comprometendo a capacidade fotossintetizante da mesma. Quando o patógeno não é controlado, as perdas na produção podem chegar a 100% (GALLOTTI; GRIGOLETTI, 1990).

Como sintoma inicial, a doença apresenta manchas verde-claras na face adaxial da folha conhecidas como mancha-óleo. Com o passar do tempo e sob condições favoráveis para o desenvolvimento da doença, essas manchas evoluem para necroses de coloração marrom avermelhada que podem cobrir grande parte do limbo foliar. Na parte abaxial da folha, formam-se estruturas de frutificação do agente da doença, de coloração esbranquiçada formada por esporângios e esporangióforos (BERGAMIN et al., 1997). Apesar de atacar principalmente as folhas da videira, a doença pode causar queda de flores, folhas e frutos, dependendo da severidade à que a planta está condicionada, fator esse relacionado com a suscetibilidade do hospedeiro e com as condições ambientais favoráveis (BEDENDO, 2011).

Quando as condições ambientais se tornam desfavoráveis para a sobrevivência do patógeno, ocorre a fase teleomórfica, resultando na formação dos esporos sexuais denominados de oósporos. Ainda que não dependa de temperaturas específicas, sua formação se dá, preferencialmente, em condições de seca, quando a germinação dos esporângios é impedida, ou na senescência das folhas (GRÜNZEL, 1961; GESSLER et al., 2011). A quantidade dessas estruturas de resistência geralmente é bem elevada, podendo atingir facilmente 250 oósporos/mm<sup>2</sup> (GESSLER et al., 2011). Os oósporos germinam quando as condições ambientais se tornam favoráveis, em temperaturas superiores a 11 °C e solo encharcado, produzindo esporângios dos quais são liberados os zoósporos, esporos assexuais que possuem mobilidade devido à presença de flagelos, os quais não são encontrados em fungos verdadeiros, caracterizando, portanto, pseudofungos que pertencem à classe dos oomicetos, que também não possuem parede celular (JEGER; PAUTASSO, 2008). Os zoósporos são transportados até a parte aérea da planta pelos respingos da chuva e do vento, necessitando de um filme de água na folha para alcançarem os estômatos e causarem a infecção primária (GALET, 1982).

Segundo estudo realizado por Blaeser (1978) apud Gessler (2011), a germinação de esporângios de *P. viticola* dependem de alguns fatores, principalmente ambientais, ou seja, umidade relativa do ar em torno de 98%, 4 h de escuro e temperatura mínima de 13 °C, sendo 19 °C a temperatura ótima. A germinação de esporângios ocorre no escuro e o tempo para conclusão de um ciclo de infecção é de aproximadamente 7 h.

Geralmente, o efeito da temperatura sobre a severidade da doença não depende somente da temperatura ótima para a sobrevivência do patógeno, mas também da temperatura

limite para que ocorra a liberação de zoósporos (25°C) (JUDELSON; BLANCO, 2005; JEGER; PAUTASSO, 2008), além de outros fatores como, densidade de inóculo e idade da planta (RAFTOYANNIS; DICK, 2002; JEGER; PAUTASSO, 2008). Além disso, estudos têm comprovado que o hospedeiro (*Vitis vinifera*) pode influenciar o processo de infecção causado por *P. viticola*, pois o mesmo poderia contribuir acelerando a liberação de zoósporos a partir de esporângios maduros, coordenando a morfogênese do tubo germinativo e direcionando os zoósporos para os estômatos (KIEFER et al., 2002; JEGER; PAUTASSO, 2008).

As medidas de controle da doença baseiam-se principalmente na utilização de cultivares resistentes e na proteção química, porém a adoção de algumas práticas culturais pode ajudar na redução da severidade da doença como: evitar o plantio em áreas sujeitas a neblina, utilizar o espaçamento e a densidade de plantas adequados e que permitam boa aeração entre as plantas, assim como realizar a poda de ramos para evitar a formação de microclima favorável à doença (BEDENDO, 2011).

O problema encontrado na adoção de cultivares resistentes é o fato de que as cultivares mais plantadas são suscetíveis a *P. viticola*. (SLAUGHTER et al., 2008). No Rio Grande do Sul, devido às condições climáticas e, principalmente, à uma série histórica com tendência ao excesso pluviométrico na região da Serra Gaúcha (WESTPHALEN, 2000), são realizadas, no cultivo convencional, em média 14 pulverizações com fungicidas (FREIRE et al., 1992) sendo que dessas de 8 a 10 são destinadas ao controle do míldio da videira (MENDES, 2002).

Dessa maneira, segundo Matasci et al. (2008), o controle do míldio requer aplicações constantes de fungicidas, muitos desses à base de cobre que acabam provocando contaminação no solo devido ao acúmulo desse metal pesado. Outros fungicidas sintéticos, com modo de ação específico, acabam desenvolvendo isolados resistentes de *P. viticola*. Portanto, é necessária a busca de alternativas para o controle do míldio da videira, através do controle biológico e da indução dos mecanismos de defesa vegetal.

#### **2.4 Controle biológico e seu papel no controle de doenças da videira**

Os métodos tradicionalmente utilizados para o controle de doenças que possuem altas taxas de dispersão em plantas estão baseados no uso de agrotóxicos. A aplicação excessiva e indiscriminada desses agrotóxicos na agricultura pode causar efeitos drásticos para o meio

ambiente, produtores e consumidores. Estratégias de controle químico intensivo e rotineiro, geralmente não são sustentáveis em longo prazo, pois poluem a atmosfera, prejudicam o meio ambiente, deixam resíduos nas folhas e podem contribuir para o desenvolvimento de populações resistentes do organismo alvo (NASEBY et al., 2000). A redução ou eliminação do uso de pesticidas na agricultura é desejável e um dos meios mais promissores para se atingir esse objetivo, está baseado no uso de agentes de controle biológico. Esses agentes podem ser utilizados sozinhos ou integrados com doses reduzidas do controle químico para o controle de patógenos, minimizando dessa forma os impactos causados pelos pesticidas no meio ambiente (HARMAN; KUBICEK, 1998 apud VINALE, 2008).

O controle biológico pode ser definido como a redução do inóculo ou dos fatores que determinam a doença na planta, a partir de organismos que não o homem (LO, 1998). Para Chet et al. (1997), o controle biológico é a interferência no metabolismo celular de organismos fitopatogênicos, causadores de doenças em plantas, a partir de micro-organismos benéficos específicos, os quais agem como uma ferramenta natural, assim como uma alternativa ecológica que pode ser utilizada para diminuir os problemas causados pelo uso do controle químico na proteção de plantas.

Apesar da sua importância, os produtos biológicos possuem um mercado mundial muito restrito quando comparados com os produtos químicos, detendo apenas 1% no controle de doenças de plantas. Apesar disso, existe uma perspectiva de crescimento à essa participação, principalmente pela pressão da sociedade por alimentos mais saudáveis, livre de agrotóxicos e pelas novas políticas que incentivam uma agricultura com bases ecológicas (BETTIOL, 2011). Segundo levantamento realizado por Bettiol et al. (2012) sobre produtos recomendados para o controle biológico de doenças, no mercado mundial são encontrados mais de 40 espécies antagonistas, das quais o fungo *Trichoderma* spp. se destaca com quase metade dos antagonistas comercializados, seguido pelos gêneros bacterianos *Bacillus*, *Paecilomyces*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*.

No Brasil, o número de produtos biológicos registrados também é muito pequeno. Existem cerca de 113 ingredientes ativos de fungicidas químicos registrados e apenas três “ingredientes ativos biológicos” aparecem no banco de dados de agrotóxicos do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Isso se deve, principalmente, ao fato da ação esperada pelos agentes de controle biológico ser lenta e, muitas vezes, cuidados especiais são necessários com esses produtos para o seu manejo (BETTIOL et al., 2012).

As principais interações antagônicas que ocorrem entre as espécies são: antibiose, competição, micoparasitismo, enzimas que degradam a parede celular e a indução de

resistência. A antibiose está relacionada com a supressão de doenças em plantas por determinados fungos e bactérias, os quais produzem substâncias de baixo peso molecular, com efeito antibiótico, que agem diretamente sobre outro micro-organismo (WELLER; THOMASHOW, 1993; LO, 1998). No caso da competição, ambos, agente de biocontrole e fitopatógeno, competem por nutrientes e/ou espaço físico no sítio de infecção do hospedeiro (LORITO et al., 1994; LO, 1998). O micoparasitismo envolve a predação, ou seja, o micro-organismo biocontrolador alimenta-se do agente fitopatogênico (MALOY, 1993; LO, 1998). Alguns micro-organismos detêm a capacidade de produzir enzimas hidrolíticas extracelulares, as quais desempenham um importante papel na supressão de doenças fúngicas, sendo as mais conhecidas as quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases que atuam sobre constituintes da parede celular da maioria das espécies fúngicas (LAM; GAFFNEY, 1993; LO, 1998). Portanto, o estudo do controle biológico torna-se uma estratégia no manejo de doenças de plantas, evitando ou diminuindo o uso de fungicidas na agricultura (LO, 1998).

## **2.5 Mecanismos de defesa vegetal contra doenças**

Quando comparadas com os animais superiores, as plantas não possuem um sistema de defesa imunológico capaz de produzir proteínas que aglutinem antígenos, porém elas detêm consigo defesas estruturais e bioquímicas capazes de impedir o desenvolvimento da maioria dos micro-organismos patogênicos que entram em contato com os seus tecidos. Os mecanismos de resistência, também denominados de fatores de resistência ou mecanismos de defesa de plantas a patógenos, podem ser divididos em pré-formados ou pós-formados, ambos estruturais e bioquímicos, em relação à tentativa de infecção do patógeno no hospedeiro (FREEMAN; BEATTIE, 2008).

Os fatores de resistência pré-formados (passivos ou constitutivos) encontram-se na planta antes mesmo do contato com o patógeno. Os mecanismos estruturais da planta são considerados defesas físicas, capazes de evitar ou restringir a infecção causada por patógenos. São constituintes desses mecanismos estruturais, cutícula, tricomas, estômatos e paredes celulares espessas (GUEST; BROWN, 1997). Os fatores bioquímicos pré-formados, também conhecidos como “fitoanticipinas” (CLIVE LO; NICHOLSON, 2008), são encontrados, geralmente, em altas concentrações e estão envolvidos nos processos de defesa vegetal, possuindo atividade antimicrobiana sobre o patógeno através da conversão de compostos em

substâncias altamente tóxicas. Esses fatores bioquímicos são constituídos por compostos de natureza química diferente como fenóis, alcalóides, lactonas, terpenóides, proteínas e peptídeos (STANGARLIN et al., 2010).

Diferentemente dos mecanismos bioquímicos pré-formados, os fatores bioquímicos pós-formados podem estar presentes nas células vegetais em baixos níveis ou até mesmo ausentes, manifestando-se apenas quando a planta entra em contato com moléculas elicitoras advindas do patógeno, reconhecendo-as em nível de membrana plasmática e, dessa maneira, ativando seus mecanismos bioquímicos de defesa (GARCION et al., 2007).

Resumidamente, o objetivo geral desses diferentes mecanismos sintetizados pela planta é evitar ou atrasar as relações de parasitismo do patógeno e gerar condições desfavoráveis para que a colonização dos tecidos não ocorra (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

## **2.6 Tipos de resistência e a percepção da planta ao patógeno**

As plantas desenvolveram um complexo sistema para perceber, reconhecer e responder aos estímulos causados por micro-organismos patogênicos, através da ativação de mecanismos de defesa, afim de impedir que o patógeno estabeleça relações de parasitismo (PANSTRUGA; DODDS, 2009; CAVALCANTI et al., 2014).

Segundo Gould (1976), o fenômeno específico de reconhecimento entre plantas e patógenos pode ser definido como o “evento inicial na comunicação célula a célula, a qual provoca uma resposta bioquímica, fisiológica ou morfológica definida”. Outra definição sugere que o reconhecimento é um “evento específico inicial que desencadeia uma resposta rápida e direta por parte do hospedeiro, que facilita ou impede o posterior crescimento do patógeno” (SEQUEIRA, 1978). Portanto, esse reconhecimento entre plantas e patógenos pode provocar duas respostas: compatível, ou seja, o patógeno consegue estabelecer relações de parasitismo através da obtenção de água e nutrientes da planta e, conseqüentemente, desenvolver suas estruturas viáveis de disseminação; ou incompatível, quando a planta consegue reconhecer o patógeno e através de mecanismos de defesa, evitar ou atrasar o estabelecimento da infecção em seus tecidos (BENT; MACKEY, 2007).

A grande maioria das espécies de plantas é resistente a vários micro-organismos potencialmente patogênicos, um fenômeno conhecido como mecanismo de resistência de não-hospedeiro (MYSORE; RYU, 2004; NÜRNBERGER; LIPKA, 2005). Acredita-se que esse

determinado tipo de resistência esteja baseado em mecanismos de proteção múltipla, ou seja, através das barreiras constitutivas e de reações induzíveis (NÜRNBERGER; LIPKA, 2005). Ao contrário da resistência induzida por genes-R, a qual é geneticamente governada por um único gene, a resistência de não-hospedeiro parece ser governada por múltiplos genes. A resistência mediada por genes-R parece ser facilmente superada, pois a mesma corresponde a genes de avirulência (AVR) que são facilmente modificados ou removidos pelo patógeno (MCDOWELL; WOFFENDEN, 2003; SENTHIL-KUMAR; MYSORE, 2013).

Assim, barreiras estruturais e bioquímicas pré-formadas sobre a superfície da planta como camada de cera, parede celular rígida e metabólitos secundários antimicrobianos podem, inicialmente, paralisar a infecção provocada pelo patógeno (DIXON, 2001; NÜRNBERGER; LIPKA, 2005). Todavia, quando um patógeno de não-hospedeiro consegue vencer as barreiras constitutivas da planta, o mesmo pode tornar-se objeto de reconhecimento por receptores encontrados na membrana plasmática da célula vegetal. Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados aos micro-organismos (MAMPs) mostraram um importante papel na ativação de respostas de defesa, mediada por receptores encontrados na planta não-hospedeira, ou seja, provavelmente esses sinais constatados por receptores da planta não-hospedeira ativem respostas de defesa contra micro-organismos naturais (ESPINOSA; ALFANO, 2004; NÜRNBERGER; LIPKA, 2005) e impeçam o desenvolvimento da doença. Geralmente, essas respostas de resistência estão associadas a reações de hipersensibilidade (HR), que são definidas como a morte programada das células vegetais no sítio da infecção, impedindo, dessa maneira, que a doença se desenvolva (SENTHIL-KUMAR; MYSORE, 2013).

Durante o processo evolutivo, determinadas espécies de patógenos adquiriram fatores de virulência, os quais conferem ao patógeno características de driblar ou suprimir os mecanismos de defesa vegetal (ALFANO; COLLMER, 2004). A resistência basal diferentemente da resistência de não-hospedeiro de plantas à patógenos, não impede que o patógeno estabeleça relações de parasitismo com a planta hospedeira suscetível, fazendo com que a doença se desenvolva, isso ocorre porque as defesas da planta induzidas por PAMPs são insuficientes para parar o processo de infecção. Segundo Senthil-Kumar e Mysore (2013), afirmam que a resistência basal é uma defesa fraca, vencida pelo patógeno e essa mesma resistência, tem a capacidade de reduzir o crescimento e desenvolvimento da doença.

### 2.6.1 Elicitores químicos (ASM - acibenzolar-S-metil e quitosana) e aspectos da indução de resistência

De um modo geral, elicitores são moléculas cuja função é induzir respostas de defesa da planta, como a resposta de hipersensibilidade (HR) em uma resistência de não-hospedeiro, e uma resistência sistêmica adquirida (SAR), em uma situação de compatibilidade basal (BENT; MACKEY, 2007). A SAR pode ser definida como uma propagação da resistência pelos tecidos da planta, a qual pode ser ativada em muitas espécies vegetais através de elicitores ou pelo próprio patógeno, conferindo à planta uma resistência de longa duração, muitas vezes podendo persistir por toda a vida da planta contra um amplo espectro de agentes patogênicos, incluindo vírus, bactérias, fungos e oomicetos (RYALS et al., 1995; STICHER et al., 1997; DURRANT; DONG, 2004).

Segundo Pascholati e Leite (1994), elicitores podem ser classificados de acordo com a origem em bióticos ou abióticos. Podem ser considerados como elicitores abióticos, luz UV, íons metálicos e algumas moléculas sintetizadas em laboratório. Os elicitores considerados bióticos são secretados pelo patógeno ou pela planta, durante a interação planta-patógeno. Também podem ser obtidos através do isolamento de proteínas, carboidratos ou glicoproteínas provenientes de tecido vegetal, fungos, bactérias e vírus (HAHN, 1996).

Elicitores químicos ou físicos podem ser utilizados na indução de resistência em plantas, como silício (SI), ácido D-L-aminobutírico (GABA), quitosana, cloreto férrico, fosfato de potássio dibásico, ácido salicílico (AS), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), fosfato de potássio monobásico, ácido jasmônico (AJ), metil jasmonato (MeJa), ácidos graxos ou luz em comprimento de onda específico (KUHN, 2007). Bion<sup>®</sup> 50WG (derivado do ácido salicílico), ChitoPlant<sup>®</sup> (formulação de quitosana), Auxigro<sup>®</sup> WP (formulação com GABA) dentre outros, são registrados nos EUA, Alemanha e Austrália como indutores de resistência (CAVALCANTI et al., 2014).

Produtos capazes de induzir mecanismos de defesa vegetal vêm sendo alvo de pesquisas nos últimos anos. Acibenzolar-S-metil (ASM) é o único produto registrado no mercado brasileiro como indutor de resistência em plantas a patógenos. Também conhecido como benzothidiazole (BTH), comercializado sob a marca Bion<sup>®</sup> (Syngenta), é um análogo do ácido salicílico e induz os mecanismos de defesa das plantas, ativando genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese e proteínas relacionadas com a produção de fitoalexinas e lignina (RESENDE et al., 2000).

Nojosa et al. (2009) observaram que ASM na concentração 0,1 g L<sup>-1</sup> e fosfito de potássio nas doses 2,5 e 5,0 mL L<sup>-1</sup> reduziram a severidade de *Phoma costarricensis* em mudas de cafeeiro em 80, 60,06 e 63,18%, respectivamente, sendo esses percentuais superiores aos observados em plantas tratadas com o fungicida tebuconazole. Cavalcanti et al. (2008) testaram ASM na concentração 0,2 g L<sup>-1</sup>, na redução da severidade de *Verticillium dahliae* em cacauzeiro. Os sintomas da doença foram avaliados 20, 30, 40, 50, 60 e 70 dias após a inoculação com o patógeno, conferindo uma redução de 30,2% em relação à testemunha que recebeu apenas água. Segundo Perazzolli et al. (2008), confirmado por Cavalcanti et al. (2011), videiras tratadas com ASM aumentaram a resistência contra míldio, não sendo verificado nenhum efeito direto sobre a morfologia ou germinação de esporângios de *Plasmopara viticola*, sugerindo que a atividade contra míldio *in vivo* é mediada pela ativação de mecanismos de defesa da videira.

A quitosana é um polissacarídeo natural, a qual tem como precursora a quitina, que foi descoberta por Henri Braconnot em 1811, a partir de cogumelos, recebendo o nome de fungina. Somente em 1823, Odier conseguiu isolá-la de insetos e então a denominou de quitina. Payen, em 1843 descobriu que na estrutura molecular da quitina havia nitrogênio. Quitosana (Figura 1) pode ser extraída da parede celular de fungos, assim como do exoesqueleto de artrópodes, através da fragmentação ou desacetilação da quitina (FORBES-SMITH, 1999). É um biopolímero formado por repetições de N-acetil-D-glucosamina, com comportamento catiônico e sua composição varia em função do grau de desacetilação (FORBES-SMITH, 1999).

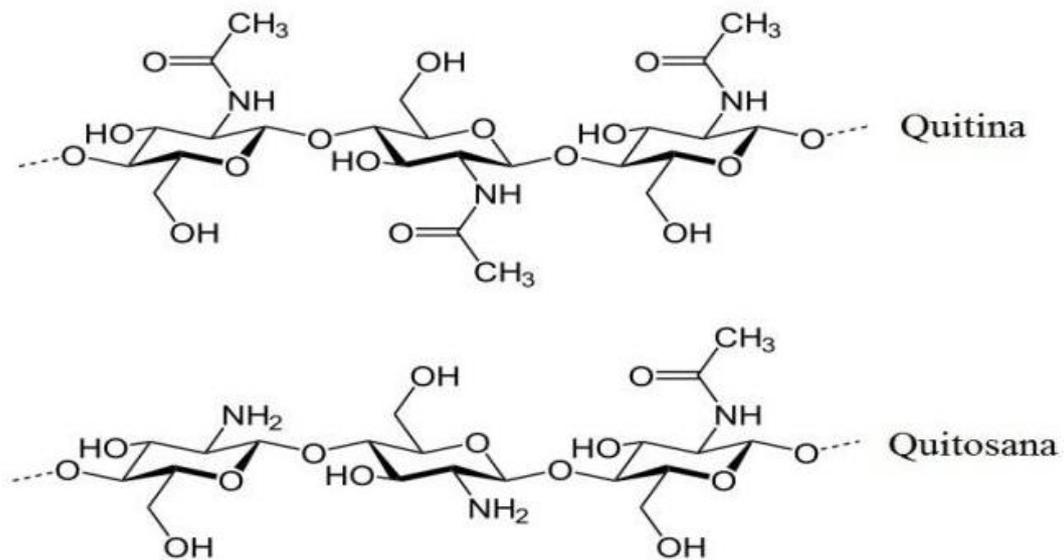


Figura 1: Estrutura química da molécula de quitina e quitosana (NO; MEYERS, 1997).

A atividade biológica da quitosana depende, dentre alguns parâmetros, do grau de desacetilação e da massa molar da sua molécula. Assim, o efeito antimicrobiano da quitosana aumenta com o percentual de desacetilação, pois isso aumentará o número de grupamentos aminos que, dependendo do pH do meio, podem apresentar cargas positivas capazes de interagir com cargas negativas, as quais são encontradas na superfície da células fúngicas, dificultando o movimento das moléculas através da membrana. Ainda, a quitosana tem a função de dificultar a transcrição do DNA dos patógenos (FANG et al., 1994).

Além da ação antimicrobiana, a quitosana é um composto que pode estar associado com a ativação dos mecanismos de defesa vegetal. Sua ação é muito similar ao que ocorre quando a planta é atacada por um patógeno, ou seja, os monômeros de quitina, produzidos pela degradação da hifa do fungo na superfície foliar, geram um sinal que atua no sítio ativo de recepção da célula, fazendo com que a mesma realize reações bioquímicas capazes de ativar mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos (SOBRINHO et al., 2005). Porém, a quitosana, ao invés de reagir com o sítio de recepção da célula vegetal, atua através da interação entre as cargas catiônicas da sua molécula com os fosfolipídios encontrados na superfície celular do vegetal (KAUSS et al., 1989). A quitosana também está associada com a produção de compostos que formam uma barreira estrutural na planta, através da lignificação da parede celular das células, ou pelo efeito inibitório sobre o crescimento de patógenos (BENHAMOU et al., 1998).

Segundo Ait Barka et al. (2004), a utilização de quitosana no tratamento de frutos de uva e morango, proporcionou resultados significativos no controle de *Botrytis cinerea*. A pulverização de quitosana, preventivamente, sobre folhas de feijoeiro, reduziu significativamente a severidade da antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. Essa redução foi relacionada tanto ao efeito direto que o composto exerceu sobre o patógeno, como pelo efeito que teve na ativação de enzimas como  $\beta$ -1,3-glucanase, que estão relacionadas com a defesa vegetal (DI PIERO; GARDA, 2008).

## 2.6.2 Agentes de controle biológico e elicitores “biológicos”

### 2.6.2.1 *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* corresponde à fase anamórfica do gênero *Hypocrea*, pertencente à família Moniliaceae (SAMUEL; HADAVI, 1996). Segundo Domsh et al. (1980), esse fungo se caracteriza pela presença de micélio, o qual possui crescimento rápido e coloração inicial branca, tornando-se cotonoso e compacto com tufos verdes à medida que se desenvolve, porém a coloração depende principalmente da pigmentação e da quantidade de conídios. *Trichoderma* spp. caracteriza-se por seus diferentes mecanismos de ação, como a produção de antibióticos e outras substâncias capazes de parasitar outros fungos (SIVASITHAMPARAM; GHISALBERTI, 1998), assim como competir com outros organismos por exsudatos liberados de sementes, os quais estimulam, no solo, a germinação de propágulos de fungos fitopatogênicos (HOWELL, 2002).

Estudos que envolvem o uso de *Trichoderma* spp. como um agente de controle biológico, geralmente estão voltados para o efeito direto que o patógeno tem sobre o controle de micro-organismos patogênicos (HARMAN et al., 2004). Porém, além da ação direta que o fungo exerce sobre outros patógenos, estudos recentes evidenciaram seu potencial no crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como na indução de resistência sistêmica e localizada em plantas a uma variedade de patógenos (YEDIDIA et al., 2000).

Dessa maneira, plantas respondem imediatamente à invasão por *Trichoderma* spp. através da ativação de mecanismos de defesa que culminam na deposição de calose e na síntese de polifênóis (SHORESH et al., 2010). Pesquisas identificaram uma série de proteínas

ligadas à indução de resistência em plantas por *Trichoderma* spp. como proteínas ligadas a genes de avirulência do patógeno (AVR) (BENT; MACKEY, 2007; SHORESH et al., 2010), que também são produzidas por bactérias, causando reações de hipersensibilidade (HR) e outras respostas ligadas à defesa em espécies vegetais que possuem o gene-R como receptor, ou através do reconhecimento pela planta de padrões moleculares associados a micro-organismos (MAMPs) (WOO et al., 2006; WOO; LORITO, 2007; SHORESH et al., 2010). Segundo Yedidia et al. (2000), *Trichoderma harzianum* (T-203) aumentou a atividade das enzimas quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, celulases e peroxidases durante os estágios iniciais de colonização das raízes pelo fungo em pepineiro.

#### 2.6.2.2 *Bacillus* spp.

O gênero *Bacillus* spp. é formado por bactérias esporulantes, gram negativas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, que possuem a forma de bastonete e podem se diferenciar em endósporos (LIMA, 2010). Representantes desse gênero podem ser encontrados facilmente na natureza e isolados do solo ou da água (PRIEST, 1989). Algumas espécies são encontradas em estreita relação com raízes de plantas, como *B. subtilis* que convive de maneira simbiótica com raízes de determinadas espécies, promovendo o crescimento e, em troca, recebendo nutrientes (PRIEST; HARWOOD, 1994).

Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (PGPR) fazem parte dos vários grupos de micro-organismos associados às plantas, que podem elicitar mecanismos de defesa vegetal (VAN LOON; GLICK, 2004). Nos últimos anos, estudos relacionados com PGPR e a indução de resistência sistêmica (ISR) em plantas hospedeiras contra patógenos, tem ganhado destaque. Segundo Kloepper et al. (2004) várias espécies de *Bacillus* spp. são conhecidas (*B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycoides* e *B. sphaericus*) por estarem associadas como potenciais indutores de ISR e exibirem significativa redução na incidência e severidade de diversas doenças em plantas hospedeiras, incluindo tomate, pimentão, melão, melancia, beterraba, tabaco, *Arabidopsis* spp., pepino, *Pinus taeda* e culturas tropicais.

*Bacillus subtilis* (AF1) foi testado como indutor de resistência em amendoim (*Arachis hypogaea*) contra *Aspergillus niger*. Podile et al. (1995) verificou que AF1 estimulou a produção de fenilalanina amônia-liase (PAL) e atividade de peroxidase em amendoim

indicando que AF1 possui a capacidade de ISR. Estudos também relataram que AF1 causou efeito na IRS, pois provocou uma significativa redução na incidência de *Aspergillus niger* em amendoim e isso coincidiu com o aumento de atividade de lipoxigenase, um fenômeno associado com ISR (SAILAJA et al., 1997). *Bacillus pumilus* (SE34) foi incorporado ao substrato e a proteção sistêmica de tomate contra a requeima causada pelo patógeno *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary foi avaliada. Quatro semanas após a semedura, os tratamentos foram aplicados e uma semana após a aplicação dos tratamentos, todas as plantas foram inoculadas com *Phytophthora infestans*. A severidade da doença foi avaliada e significativamente reduzida pelo tratamento com SE34, em relação às plantas testemunhas (YAN et al., 2003).

## **2.7 Proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas)**

Em 1970, foram detectadas as primeiras proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) em folhas de tabaco, as quais se manifestaram através de reações de hipersensibilidade ao vírus do mosaico do tabaco (TMV) (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). Nas folhas de fumo foram identificadas quitinases (LEGRAND et al., 1987; VAN LOON; VAN STRIEN, 1999) e  $\beta$ , 1-3, glucanases (KAUFFMANN et al., 1987; VAN LOON; VAN STRIEN, 1999), as quais revelaram fortíssimo potencial na atividade antifúngica, inibindo o crescimento micelial, multiplicação e disseminação de patógenos, assim como responsáveis pelo desencadeamento da SAR na planta (KOMBRINK; SOMSSICH, 1997; VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

Patógenos, insetos, nematóides e herbívoros são agentes de origem biótica capazes de induzir a formação de PR-proteínas em plantas. Fragmentos de glucanas e derivados de quitina da parede celular fúngica, glicoproteínas sintetizadas por fungos, peptídeos e proteínas são indutores de PR-proteínas derivados de organismos patogênicos (EDREVA, 2005). Os principais mecanismos de ação das PR-proteínas estão baseados na atividade de hidrólise sobre a parede celular, na mudança de permeabilidade da membrana plasmática, toxicidade direta e na sinalização de defesa, assim como na inibição de enzimas digestivas encontradas em insetos (STANGARLIN et al., 2011).

As PR-proteínas são identificadas através de propriedades bioquímicas específicas, pois são constituídas por proteínas de baixo peso molecular (6 - 43 kDa), estáveis e extraíveis

em pH menor ou igual a 3, termoestáveis e altamente resistentes a proteases (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). As famílias de PR-proteínas são numeradas de acordo com a ordem em que foram descobertas (Tabela 1) e muitas vezes as famílias podem possuir afinidades nas suas propriedades biológicas e bioquímicas, como, por exemplo, a família PR-2 que sintetiza  $\beta$ -1,3-endoglucanases ou as famílias PR- 3, 4, 8 e 11 que sintetizam endoquitinases, ambas atuando contra fungos fitopatogênicos (VAN LOON et al., 2006).

Tabela 1 – Famílias de PR-proteínas (adaptado de VAN LOON et al., 2006).

Family	Type member	Properties	Gene symbols
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tobacco PR-2	$\beta$ -1,3-glucanase	<i>Ypr2</i> , [ <i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')]
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>
PR-4	Tobacco 'R'	Chitinase type I, II	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>
PR-5	Tobacco S	Thaumatococcus-like	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pin</i> ')
PR-7	Tomato P <sub>69</sub>	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III	<i>Ypr8</i> , <i>Chib</i>
PR-9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	Peroxidase	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>
PR-10	Parsley "PR1"	Ribonuclease-like	<i>Ypr10</i>
PR-11	Tobacco "class V" chitinase	Chitinase, type I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin	<i>Ypr12</i>
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase	<i>Ypr15</i>
PR-16	Barley OxOLP	Oxalate-oxidase-like	<i>Ypr16</i>
PR-17	Tobacco PRp27	Unknown	<i>Ypr17</i>

### 2.7.1 Peroxidases

As peroxidases são encontradas em animais, plantas e micro-organismos e desempenham um importante papel, pois catalisam a oxirredução entre peróxido de hidrogênio e vários redutores (HIRAGA et al., 2001). Nas plantas, a peroxidase apresenta várias funções ligadas principalmente à defesa celular, atuando na lignificação, suberização e

no fortalecimento da parede celular. São classificadas como proteínas relacionadas a patogênese (PR-proteínas) pertencentes à família PR-9 (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

A peroxidase ( $H_2O_2$  oxireductase, EC. 1.11.1.7.) reage com compostos que possuem na sua conformação estrutural molecular o grupo hidroxila anexado a um anel aromático (HIRAGA et al., 2001). Essas enzimas reagem através da oxidação desidrogenativa do guaiacol (o-metoxi-fenol) que resulta na formação de radicais fenoxi que, conseqüentemente, se ligam a radicais instáveis, levando à polimerização não enzimática de monômeros. Da mesma maneira, as peroxidases são responsáveis pela oxidação do álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio, ou seja, fazem a remoção de átomos de hidrogênio do álcool hidroxicinâmico, cujos radicais se polimerizam e originam a lignina (HIRAGA et al., 2001). Sendo assim, esse polímero, que ocorre na parede celular das plantas superiores, juntamente com a celulose e outros polissacarídeos funciona como uma barreira física à penetração do patógeno (CAVALCANTI et al., 2005).

Além de participarem na formação de lignina, as peroxidases atuam nos vegetais na síntese do hormônio etileno (ISIGHE et al., 1993), na oxidação de compostos fenólicos que são acumulados nas plantas em resposta à infecções (FRY, 1986) e na oxidação do ácido indolil-3-acético (AIA) (HOAGLAND, 1990). Nesse contexto, plantas de fumo transgênicas, expressando atividade da enzima peroxidase suprimiram a formação de raízes laterais devido à degradação do AIA (LAGRIMINI et al., 1997).

### 2.7.2 Polifenoloxidasas

A polifenoloxidase, também conhecida como fenol oxidase, catecolase, fenolase, catecol oxidase ou tirosinase (OKOT-KOTBER et al., 2002), possui ampla especificidade de substratos. É encontrada nas plantas, bactérias, fungos e algas, exceto em algas unicelulares (MAYER; HAREL, 1979; FLURKEY, 1989).

Essas enzimas utilizam íons de cobre como grupo prostético que, por sua vez, participam de reações de oxirredução, sendo o oxigênio essencial no processo de catálise das reações. Polifenoloxidasas podem apresentar atividade de monofenolase quando participam da reação de hidroxilação de monofenóis para orto-difenóis e difenolase quando desempenham atividade na oxidação de orto-difenóis em orto-quinonas altamente reativas (Figura 2) (MAYER; HAREL, 1979; OKOT-KOTBER et al., 2002).

Geralmente, as polifenoloxidasas encontram-se inativas dentro das células vegetais, compartimentalizadas nos tilacóides dos cloroplastos e vacúolos, com uma pequena parte podendo estar localizada na parede celular (VAUGHN et al., 1984). Os níveis dessas enzimas na planta pode variar de acordo com a espécie, a cultivar (MAYER; HAREL, 1979) ou o ambiente, e sua expressão pode ser induzida por injúrias de várias naturezas e pelo fornecimento exógeno de jasmonato de metila (MeJa) (CONSTABEL; BERGEY; RYAN, 1995). Dessa maneira, quando ocorre o rompimento da célula vegetal, seja pela ação do patógeno, do inseto ou quando a planta entra em senescência, as polifenoloxidasas são liberadas e o processo de oxidação de compostos fenólicos é iniciado (CONSTABEL; BERGEY; RYAN, 1995; MOHAMMADI; KAZEMI, 2002; THIPYAPONG et al., 2004; KUHN, 2007).

Na defesa vegetal, a importância dessa enzima ocorre principalmente pela ação antinutritiva das quinonas na alimentação de insetos, ou seja, taninos podem ser oxidados a quinonas, as quais reagem com as proteínas da alimentação do inseto e impedem que o mesmo consiga digerí-las (TAIZ; ZEIGER, 2004). Outro papel importante das polifenoloxidasas refere-se à sua ação contra patógenos, pois quando ocorre o extravasamento da enzima dos tilacóides, devido à penetração do patógeno, a enzima oxida compostos fenólicos, produzindo quinonas (THIPYAPONG et al. 2004) que possuem ação antimicrobiana (MOHAMMADI; KAZEMI, 2002).

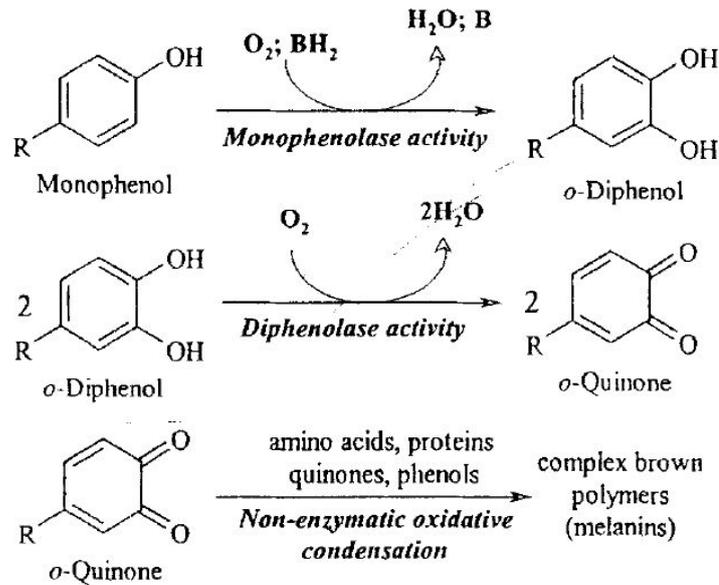


Figura 2 - Representação esquemática do processo enzimático e não enzimático de condensação para escurecimento (YORUK; MARSHALL, 2003).

### 2.7.3 Quitinases e $\beta$ -1,3-glucanases

São consideradas enzimas com atividade hidrolítica, devido ao fato de quitinases hidrolisarem a quitina (um polímero de N-acetilglucosamina) e  $\beta$ -1,3-glucanases efetuarem a hidrolização de  $\beta$ -1,3-glucanas. (PASCHOLATI, 2011). As quitinases podem ser encontradas em organismos como insetos, crustáceos, leveduras e fungos, os quais possuem quitina na sua estrutura, necessária para o seu crescimento e desenvolvimento. Também podem ser encontradas em organismos que não possuem quitina na sua constituição, como bactérias, plantas e vertebrados (KRAMER; MUTHUKRISHNAN, 1997; KASPRZEWSKA, 2003; KUHN, 2007).

As quitinases pertencem à família 18 e 19 das enzimas líticas, sendo classificadas em sete classes. Na família 18, estão as quitinases de fungos, animais, bactérias e plantas, enquanto que a família 19 inclui quitinases de plantas das classes I, II, IV, VI e VII (KASPRZEWSKA, 2003). Além da classificação como enzimas hidrolíticas, as quitinases podem ser classificadas como proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas). Atualmente, são conhecidas 17 famílias de PR-proteínas em vegetais, com diferenciadas funções (GORJANOVIC, 2009), sendo que em cada família incluem-se classes com diferentes isoformas, que podem ser ácidas ou básicas. As quitinases encontram-se nas



Dessa maneira, as enzimas podem clivar porções internas (endo- $\beta$ -1,3-glucanases) ou externas (exo- $\beta$ -1,3-glucanases) do polímero  $\beta$ -1,3-glucana, sendo que o produto liberado dessa clivagem determinará a classificação da enzima, devido à propriedade do seu sítio catalítico, ou seja, o produto pode ser uma glicose ou oligossacarídeos (LABANCA, 2002).

Portanto, a restrição da infecção patogênica pode estar relacionada ao acúmulo dessas enzimas na planta, enfatizando que as PR-proteínas, como quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases, desempenham uma função importante na proteção das plantas contra a infecção causada por patógenos (LABANCA, 2002). Outra justificativa seria o fato de que essas enzimas, são capazes de liberar da parede celular do patógeno compostos como glucanas, mananas e oligômeros formados por N-acetilglucosamina, os quais ativam o sistema de defesa da planta (HAMMERSCHMIDT, 1999). A atividade de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases pode ser aumentada através do tratamento com indutores de resistência em várias espécies vegetais (CAVALCANTI et al., 2006; CAVALCANTI et al., 2008).

#### 2.7.4 Polímeros de parede e o papel da lignina na defesa vegetal

A lignificação é um mecanismo de resistência da planta contra doenças. No processo de interação entre planta-patógeno, respostas de defesa são acionadas na planta, dentre elas pode ocorrer a deposição de lignina nas paredes das células. Além disso, a lignificação desempenha um importante papel na integridade estrutural das paredes das células vegetais e, portanto, se torna fundamental para o desenvolvimento da planta (VANCE et al., 1980; NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; BHUIYAN et al., 2009). Segundo Lange et al. (1995), a composição monomérica da lignina pode variar dependendo do processo a que esteja envolvida, ou seja, a lignina acumulada como processo de defesa através de um tratamento indutor, demonstrou ser significativamente diferente da lignina encontrada em tecidos vasculares, sugerindo que a síntese da mesma seja diferentemente regulada.

A lignina, assim como taninos, flavonoides, antocianinas e algumas fitoalexinas são compostos fenólicos sintetizados na célula vegetal, geralmente pela via do chiquimato e malonil-CoA, e relacionados com a defesa vegetal, representando uma grande classe de metabólitos secundários (KASHIF et al., 2010; AHUJA et al., 2012; CAVALCANTI et al., 2014).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Efeito de agentes de controle biológico e quitosana sobre a viabilidade de esporângios de *Plasmopara viticola*

Com o objetivo de avaliar a ação direta dos produtos testados sobre a viabilidade dos esporângios de *P. viticola*, foi realizado um ensaio *in vitro*. Para tanto, em uma lâmina escavada dividida em quatro quadrantes, foram adicionados 40 µL de uma suspensão contendo  $10^5$  esporângios mL<sup>-1</sup>, ajustada com o auxílio de hemacitômetro, 40 µL com as substâncias testadas (tratamentos) concentradas três vezes e 40 µL de água Mili-Q, resultando em 120 uL. A testemunha recebeu 40 µL da suspensão de esporângios e 80 µL de água Mili-Q. As lâminas foram mantidas em ambiente saturado e temperatura de 25 °C. Ao término de 15 horas após o preparo (HAP) avaliou-se, por contagem simples, o número de esporângios viáveis (que liberaram zoósporos) e não viáveis (que não liberaram seus zoósporos). Foram avaliados 100 esporângios por tratamento em cada quadrante da cavidade, com o auxílio de microscópio ótico. Foram avaliados quatro quadrantes para cada tratamento, em um total de 400 esporângios avaliados.

Os tratamentos consistiram dos produtos comerciais Bion (ASM), dose 8 g L<sup>-1</sup>; Famoxamona + Mancozebe (fungicida Midas<sup>®</sup>, recomendado para o controle de *P. viticola*), dose 1,2 g L<sup>-1</sup>; Ecotrich<sup>®</sup> (*T. harzianum*), dose 4 g L<sup>-1</sup>; Quality<sup>®</sup> (*T. asperellum*) dose 4 g L<sup>-1</sup>; Quitosana da empresa Polymar, dose 3,6 mL L<sup>-1</sup> e Serenade<sup>®</sup> (*B. subtilis*) dose 2 mL L<sup>-1</sup>. O tratamento controle (Ctrl) foi constituído de água Mili-Q.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições (quadrantes). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

#### 3.2 Progresso de míldio em plantas expostas a agentes de controle biológico e quitosana

Para os ensaios de controle do progresso de míldio em plantas de videira foram, utilizados clones da cultivar Cabernet Sauvignon, obtidos a partir do setor de Cultura de

Tecidos da Embrapa Uva e Vinho. As plantas foram cultivadas em sacos plásticos (4 kg) com substrato 2:0,5:1 (areia/argila/húmus) em casa de vegetação situada na Unidade Embrapa Uva e Vinho de Bento Gonçalves (latitude 29,1°S e longitude 51,5°O).

O pseudofungo *P. viticola* utilizado na inoculação das plantas de videira foi obtido de amostras vegetais do campo, principalmente de vinhedos orgânicos localizados no município de Bento Gonçalves.

Plantas de videira com rebrotas de 60 dias foram inoculadas com o auxílio de pulverizadores manuais até o ponto de escorrimento. Os tratamentos e as concentrações consistiram de *T. harzianum* e *T. asperellum* nas concentrações 2 e 4 g L<sup>-1</sup>, quitosana nas concentrações 600 e 3600 µL L<sup>-1</sup>, *Bacillus subtilis* nas concentrações 1 e 2 mL L<sup>-1</sup> e Acibenzolar-S-metil na concentração 8 g L<sup>-1</sup>. Plantas controle (Ctrl) receberam apenas água como tratamento.

Dois dias após a pulverização dos tratamentos, as plantas foram submetidas à inoculação com o fungo *P. viticola*. O inóculo foi preparado a partir de folhas de videira coletadas no campo. As folhas com os sintomas da doença foram levadas para o laboratório e através da lavagem da parte inferior das folhas, contendo as lesões recém esporuladas, com água destilada fria foi feita uma suspensão do inóculo a uma concentração de 10<sup>5</sup> esporângios mL<sup>-1</sup>, a qual foi ajustada com o auxílio de hemacitômetro e microscópio ótico.

O ensaio foi delineado em blocos inteiramente casualizados (DBC) com três repetições por tratamento, sendo que uma unidade experimental foi constituída de quatro plantas por repetição. Cada bloco foi estruturado sobre uma bancada, a qual recebeu uma estrutura plástica transparente, designada como gaiola (2,5 m x 1,0 m x 1,8 m). No interior de cada bloco foi acondicionado um umidificador ultrasom, garantindo umidade relativa acima de 80 % e 12 h de fotoperíodo.

As avaliações de severidade da doença (área da folha que apresenta o sintoma mancha óleo; área da folha que apresenta pulverulência do pseudofungo) foram realizadas aos 7, 10, 12, 14, 17, 20 e 26 dias após a inoculação (DAI), sempre pelo mesmo avaliador. A quantificação da severidade foi realizada pela inspeção visual de sinais e sintomas nas folhas, causadas por *P. viticola*, por uma escala gráfica adaptada (AZEVEDO, 1997) e dividida em seis classes (notas) de doença, englobando de zero a 100% de severidade. As leituras foram submetidas à transformação angular  $\omega = \arcsen (ID^{1/2})$ , sendo então realizados testes de normalidade, ANOVA e probabilidade de 5% sobre os dados avaliados, considerando ID (%) como a intensidade de doença (CZERMAINSKY, 1999). Áreas abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) foram calculadas a partir da equação AACPD =  $\sum [(Y_{i+1} + Y_i)/2](t_{i+1} - t_i)$ ,

onde 'Y' corresponde à ID (%) e 't' a dias após a inoculação (DAI) (CAMPBELL; MADDEN, 1990). Percentagens de proteção de planta foram estimadas pelo fator  $[1 - (x/y)]$ , onde 'x' corresponde à AACPD das plantas tratadas e 'y' à AACPD dos controles pulverizados com água destilada (LI et al., 1996).

### **3.3 Respostas metabólicas associadas à indução de resistência promovida por agentes de controle biológico e quitosana**

O ensaio para determinação de respostas metabólicas associadas à indução de resistência foi realizado em plantas da cv. Cabernet Sauvignon de população clonal obtidas do Setor de Cultura e Tecidos da Embrapa Uva e Vinho. As plantas, com rebrotas de 45 dias, cultivadas em sacos plásticos com substrato 2:0,5:1 (areia/argila/húmus), foram mantidas em casa de vegetação situada na Unidade Embrapa Uva e Vinho.

Folhas de plantas de videira foram coletadas às 12, 24, 48 e 72 h após a aplicação dos tratamentos (HAT) que consistiram de *Trichoderma harzianum*, ( $4 \text{ g L}^{-1}$ ), quitosana ( $3600 \mu\text{L L}^{-1}$ ), *Bacillus subtilis*, ( $2 \text{ mL L}^{-1}$ ), ASM, ( $0,8 \text{ g L}^{-1}$ ) e o controle que recebeu apenas água destilada, todos os tratamentos foram aplicados com pulverizadores manuais.

Cada tratamento foi constituído de três plantas de videira e cada repetição foi constituída de três folhas, num total de três repetições por tratamento. Após destacadas da planta com auxílio de uma lâmina, removendo-se o pecíolo, as folhas foram lavadas em água mili-Q e secadas delicadamente com papel toalha. Posteriormente, as folhas foram pesadas, acondicionadas em papel alumínio e mergulhadas em nitrogênio líquido para o rápido congelamento. Por fim, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **3.3.1 Extração e dosagem de proteínas solúveis totais**

A extração de proteínas solúveis totais foi realizada por maceração do tecido fresco em tampão fosfato de potássio (PBS 100 mM pH 7,2), em uma relação 1:3 m/v. O extrato filtrado foi centrifugado por 13 minutos a  $4^\circ\text{C}$  a  $13800 \times g$  e o sobrenadante recolhido. A dosagem de

proteínas solúveis seguiu o método de Bradford (1976), em alíquotas e diluições adequadas para a curva padrão BSA.

### 3.3.2 Determinação da atividade de peroxidases (GPX)

A determinação da atividade de peroxidases (GPX) seguiu a metodologia descrita por Urbanek et al. (1991), com modificações. A mistura de reação conteve guaiacol 60 mM e  $H_2O_2$  20 mM, uma alíquota de 100  $\mu$ L dos extratos de cada amostra e tampão de extração (PBS 100 mM pH7,2 + 0,5 mM NaCl) com diluições, as misturas foram incubadas a 30°C por 10 min e a atividade mensurada em espectrofotômetro a 480 nm.

### 3.3.3 Determinação da atividade de polifenoloxidasas (PPO)

A atividade difenolásica das polifenoloxidasas (PPO) em folhas de videira foi determinada pela oxidação do catecol em quinona, reação mediada pela enzima em estudo. O substrato utilizado foi catecol 50 mM, adicionado ao tampão fosfato de potássio 100 mM + NaCl 0,5M e uma alíquota de 100  $\mu$ L da amostra. A mistura foi incubada por 15 min a 32°C e as leituras realizadas em espectrofotômetro a 410 nm (GAUILLARD et al., 1993).

### 3.3.4 Determinação da atividade de quitinases (CHI)

A atividade de quitinases foi mensurada pela liberação de fragmentos solúveis de quitina, através de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (CM-Quitin-RBV), fornecida por Loewe Biochemica GmbH. Para tanto, 150  $\mu$ L do extrato proteico foram adicionados à solução contendo 130  $\mu$ L do tampão de extração PBS 100 mM + 0,5 M NaCl e 60  $\mu$ L de CM-Chitin-RBV 2 mg mL<sup>-1</sup> em microplacas de 96 poços. As microplacas foram incubadas por 80 min a 35 °C e a reação foi paralisada com a adição de 50  $\mu$ L de HCl 0,5 N, seguida de resfriamento e centrifugação a 1.450 x g por 10 min. Alíquotas

de 210  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra foram transferidas para uma nova microplaca e a absorbância foi mensura em um leitor de ELISA a 492 nm (WIRTH; WOLF, 1990).

### 3.3.5 Determinação da atividade de $\beta$ -1,3-glucanases (GLU)

Para a determinação da atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases nos extratos, utilizou-se como substrato uma solução de carboximetilcurdlan-remazol brilhante azul (CM-Curdlan-RBV). 150  $\mu\text{L}$  do extrato proteico foram adicionados à 130  $\mu\text{L}$  do tampão de extração PBS 100 mM + 0,5 M NaCl e 60  $\mu\text{L}$  de CM-Curdlan-RBV 4 mg  $\text{mL}^{-1}$  (Loewe Biochemica GmbH), em microplacas de 96 poços. Após a incubação, para promover a ação hidrolítica da GLU a 35 °C por 100 min, as amostras foram acidificadas com 50  $\mu\text{L}$  de HCl 0,5 N, resfriadas e centrifugadas por 10 min a 1.450 x g. A absorbância do sobrenadante a 620 nm foi determinada em leitor de ELISA (WIRTH; WOLF, 1990).

### 3.3.6 Determinação de fenóis solúveis totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados a partir do método de Spanos e Wrostad (1990), pipetando-se 100  $\mu\text{L}$  do extrato de cada amostra e misturando-se 900 mL de água Mili-Q + 5 mL 1:10 (v/v) do reagente Folin-Ciocalteau em 4 mL de 75 g  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . A mistura foi agitada por 1 h em temperatura ambiente. A absorbância foi lida a 765 nm e as concentrações foram aferidas por uma curva padrão de tirosina.

### 3.3.7 Determinação de lignina em folhas

Para quantificação de lignina foi adotado o ensaio de Monties (1989). Uma alíquota de 0,2 mg de tecido foliar fresco foi homogeneizada e incubada com acetona PA 85 % por 48 h, e centrifugada a 7500 x g por 15 min. O precipitado foi seco em temperatura ambiente e incubado com 5 mL de ácido tioglicólico em HCl 2 N 1:10 (v/v) durante 4 h. As amostras

foram centrifugadas duas vezes a 6.000 x g por 15 min, os sobrenadantes transferidos para novos tubos e adicionados 200 µL de HCl 10 N. Após um banho de gelo de 4 h e uma centrifugação de 6.000 x g por 30 min, o pellet obtido foi homogeneizado em 5 mL de NaOH 0,5 N e a absorbância a 280 nm foi medida. A quantidade de derivados TGA (lignina ácido-solúvel) formada foi medida pela comparação com uma curva padrão (0,01-0,1 mg éter 2-hidroxipropílico mL<sup>-1</sup>) e os valores convertidos e expressos em µg mg<sup>-1</sup> de massa fresca.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ação *in vitro* de agentes de controle biológico e quitosana sobre estruturas de *Plasmopara viticola*

No ensaio para avaliação da atividade de esporângios na viabilidade de zoósporos, foi verificado após contagem de 400 esporângios por tratamento 15 HAP (horas após preparo), que o fungicida à base de Famoxamona + Mancozebe, na concentração 1,2 g L<sup>-1</sup> foi o tratamento que obteve apenas 9,76 % de esporângios viáveis de *P. viticola* (Figura 4) enquanto a testemunha (Ctrl) atingiu 100% de esporângios viáveis e/ou ativos. Foram observadas reduções na viabilidade do esporângio por ASM (0,8 g L<sup>-1</sup>) e quitosana (3600 µL mL<sup>-1</sup>), que diferiram estatisticamente da testemunha, com percentuais de viabilidade de 40,9 e 42,7%, respectivamente. Os esporângios que receberam os tratamentos dos agentes de controle biológico *B. subtilis*, *T. harzianum* e *T. asperellum*, não diferiram estatisticamente da testemunha e mostraram percentuais de 76,7, 95,8 e 66% na viabilidade de esporângios de *P. viticola*. De acordo com o observado, os agentes de controle biológico não mostraram efeitos marcantes na inibição da viabilidade de esporângio, em meio aquoso *in vitro*. Paralelamente, o ensaio pôde evidenciar a capacidade de quitosana e ASM, nas doses estudadas, em reduzir significativamente ( $P < 0,05$ ) a atividade de esporângios, em comparação com a testemunha (Ctrl).

Da mesma maneira, Perazzolli et al. (2008) estudaram o efeito na inibição direta de *T. harzianum* T39 e ASM sobre a viabilidade de esporângios de *P. viticola*. Em seus ensaios, utilizaram 500 µL da suspensão de esporângios misturados a 500 µL da suspensão de

conídios de T39 ( $10^5$  ufc  $\text{mL}^{-1}$ ) ou 500  $\mu\text{L}$  de ASM ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) e verificaram que ambos tratamentos não diferiram estatisticamente do controle. T39 obteve porcentagem de esporângios viáveis de 86,7%, ASM de 84% e a testemunha de 89,3%.

Afim de, avaliar o efeito de diferentes doses de quitosana sobre a germinação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum*, 20  $\mu\text{L}$  da suspensão de esporos do patógeno ( $2 \times 10^5$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ ) e 20  $\mu\text{L}$  de quitosana (0, 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram misturados e incubados em lâminas escavadas e, após 60 h de incubação, a porcentagem de germinação de esporos foi avaliada em microscópio ótico. A dose 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  reduziu a germinação em 85%, enquanto a dose 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  inibiu totalmente o processo germinativo do fungo (DI PIERO; GARDA, 2008).

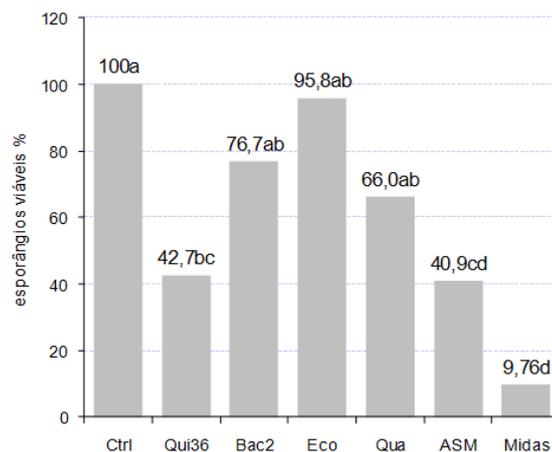


Figura 4 - Viabilidade (%) de esporângios de *P. viticola* no lançamento de zoósporos em meio aquoso. Ensaio para % de esporângios ( $10^5$  esporângios  $\text{mL}^{-1}$ ) que lançaram zoósporos para o meio (esporângios ativos/viáveis) sobre o número total de esporângios contados por tratamento ( $n = 400$ ), após 15 HAP. Os tratamentos avaliados foram: 'Qui36' (Quitosana  $3600\mu\text{L L}^{-1}$ ), 'Bac2' (*Bacillus subtilis*, Serenade®,  $2\text{mL L}^{-1}$ ), 'Eco' (*T. harzianum*, Ecotrich,  $4\text{g L}^{-1}$ ), 'Qua' (*T. asperellum*, Quality,  $4\text{g L}^{-1}$ ); 'ASM' (acibenzolar S-metil, Bion®,  $0,8 \text{ g L}^{-1}$ ); 'Midas' (Midas®,  $3,6\text{g L}^{-1}$ ), sendo 'Ctrl', o controle em água destilada. Valores seguidos com as mesmas letras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

Maia et al. (2010) também estudaram o efeito de quitosana porém, com de diferentes doses (0, 20, 40, 80 e 160  $\text{mg L}^{-1}$ ) sobre a germinação de *P. viticola* e *Elsinoe ampelina*. Utilizaram-se 40  $\mu\text{L}$  de suspensão de esporos nas concentrações  $2,2 \times 10^6$  esporângios  $\text{mL}^{-1}$  e  $5,8 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  e 40  $\mu\text{L}$  de quitosana nas diferentes doses. As avaliações foram realizadas 6, 12 e 24 h para *P. viticola* e 12 e 24 h para *E. ampelina*, através da observação em microscópio ótico. As doses 160  $\text{mg L}^{-1}$  reduziu a germinação de *E. ampelina* em 98% após

12 e 24 h de incubação e não diferiram estatisticamente do tratamento padrão mancozeb e calda bordalesa. As doses 80 e 160 mg L<sup>-1</sup> não diferiu estatisticamente dos tratamentos mancozeb e calda bordalesa, exceto na última avaliação em que a calda bordalesa apresentou maior redução na germinação de esporângios em relação aos tratamentos com quitosana.

Para avaliar o efeito de *Pseudomonas putida* (A68), *Bacillus* sp. (CO2) e *B. alcalophilus* (C12) na germinação de *Colletotrichum acutatum* (Col 01), uma alíquota de 40 µL de Col 01 na concentração 1 x 10<sup>4</sup> conídios mL<sup>-1</sup> foi colocada no centro de uma placa de Petri e então adicionaram-se 40 µL de C02, A68 e C12 nas concentrações 1 x 10<sup>4</sup>, 5 x 10<sup>4</sup> e 2,5 x 10<sup>5</sup> ufc mL<sup>-1</sup>. Após 24 h, foi avaliada a germinação de conídios de *C. acutatum*, verificando que C02 foi o único antagonista capaz de inibi-la, sendo as concentrações 5 x 10<sup>4</sup> e 2,5 x 10<sup>5</sup> ufc mL<sup>-1</sup> as mais eficientes, inibindo 67,5 e 66,5% a germinação (MOREIRA, et al. 2014).

Afim de, avaliar o efeito tóxico de dois produtos comerciais a base de fosfito e Bion sobre a germinação de esporângios de *P. viticola in vitro*, Pereira (2009) depositou, em placas de Petri contendo 10 mL de meio ágar-água, 50 µL da suspensão de inóculo e 100 µL dos produtos, sendo o controle definido por 50 µL de suspensão e 100 µL de água destilada. Após 24 h, observou-se que todos os tratamentos apresentaram porcentagem de germinação de esporângios estatisticamente diferente do controle, sendo a maior porcentagem de inibição, 57,7%, ocasionada pelo produto Pepfós (6 mL L<sup>-1</sup>). ASM na concentração 0,4 g L<sup>-1</sup> inibiu a germinação em 33,6%.

Dessa maneira, pode-se evidenciar que Quitosana, ASM e Famoxamona + Mancozebe, nas doses testadas, promoveram uma redução sobre a atividade associada à dispersão de *P. viticola*, uma vez que foi verificado uma redução na viabilidade de esporângios. Assim, considera-se um efeito direto dos produtos, principalmente ASM e quitosana, nas doses testadas, sobre estruturas de dispersão do patógeno, com potencial impacto sobre a taxa de progresso do míldio e possível redução de danos causados pela doença, em folhas de videira. Tal efeito direto sobre estruturas de dispersão do patógeno pode explicar, em parte, possíveis reduções no progresso da epidemia.

## **4.2 Controle de míldio por agentes de controle biológico e quitosana**

Os tratamentos *T. harzianum* e *T. asperellum* nas diferentes doses foram comparados com a testemunha (Ctrl-) que recebeu apenas água e com o tratamento ASM (Ctrl+), produto comercial Bion<sup>®</sup>. As plantas de videira pulverizadas com *T. asperellum*, nas doses 2 e 4 g L<sup>-1</sup>, e *T. harzianum* nas mesmas doses, não diferiram significativamente da testemunha e atingiram níveis de proteção de 24,5, 23,8, 30,9 e 28,6%, respectivamente (Figura 5 A, B, C e D). Nenhum tratamento baseado em *Trichoderma* spp. produziu diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) quando comparadas a plantas tratadas com ASM (25% de proteção).

De forma contrária, plantas de videira, cv. Pinot Noir, cultivadas em casa de vegetação tiveram suas folhas pulverizadas um, dois e três dias antes da inoculação com o patógeno *P. viticola*, com *T. harzianum* T39 (produto comercial Trichodex<sup>®</sup>) em uma concentração 8 g L<sup>-1</sup>, correspondendo a uma suspensão conidial de 10<sup>5</sup> ufc mL<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos demonstraram que T39 reduziu significativamente a severidade da doença quando comparado com a testemunha (PERAZZOLLI et al., 2012).

Folhas de plantas de videira, que receberam o tratamento quitosana na dose 0,6 mL L<sup>-1</sup> e 3,6 mL L<sup>-1</sup> não diferiram estatisticamente da testemunha. A dose 3,6 mL L<sup>-1</sup> obteve proteção da área foliar contra a doença de 29,1% (Figura 6 B). Já para as folhas de videira tratadas com a menor dose (0,6 mL L<sup>-1</sup>), observou-se uma porcentagem de proteção de apenas 19,5%, inferior à porcentagem de proteção ocasionada por ASM (25%) (Figura 6 A).

O redução da doença das plantas pulverizadas com o tratamento *B. subtilis*, na dose 1 mL L<sup>-1</sup> não diferiu significativamente ( $P < 0,05$ ) com relação ao controle (Ctrl-), apresentando uma porcentagem de proteção de 30,1% (Figura 6 C). A dose 2 mL L<sup>-1</sup> diferiu estatisticamente do controle, com uma porcentagem de proteção de 44,7% e não diferiu estatisticamente do tratamento ASM (porcentagem de proteção 25%) (Figura 6 D).

Da mesma forma, porém em um patossistema diferente, Kehlenbeck e Schönbeck (1995) pulverizaram, em condições de campo, *Bacillus subtilis* (B50) em plantas de cevada, na concentração 4 L ha<sup>-1</sup> contra o fungo *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* inoculado naturalmente. Houve uma redução de 40% na área foliar de plantas de cevada infectadas pelo fungo quando tratadas com *B. subtilis* e 93% para o fungicida (propiconazole), na dose 0,5 L ha<sup>-1</sup>.

Outro trabalho envolvendo controle de *P. viticola* foi conduzido por Aziz et al. (2003) os quais, estudaram o efeito de  $\beta$ -1,3-glucana laminarina derivado da alga marrom *Laminarina digitata*, na redução de *P. viticola* em plantas de videira cv. Gamay, as quais foram inoculadas com o patógeno 10 dias após a aplicação de diferentes concentrações de laminarina. Os resultados obtidos 8 dias após a inoculação, indicaram que 0,5 e 1 g L<sup>-1</sup> de

laminarina reduziram a severidade da doença de plantas de videria em 75%. O efeito de sulfato de laminarina (PS3) também foi verificado na redução da severidade do fungo *P. viticola* em plantas de videira, cv. Marselan, a qual obteve uma redução de 57% na severidade da doença em uma concentração de 1,25 mg mL<sup>-1</sup> e redução de severidade da doença de 85% para a dose 5 mg mL<sup>-1</sup> (TROUVELOT, et al., 2008).

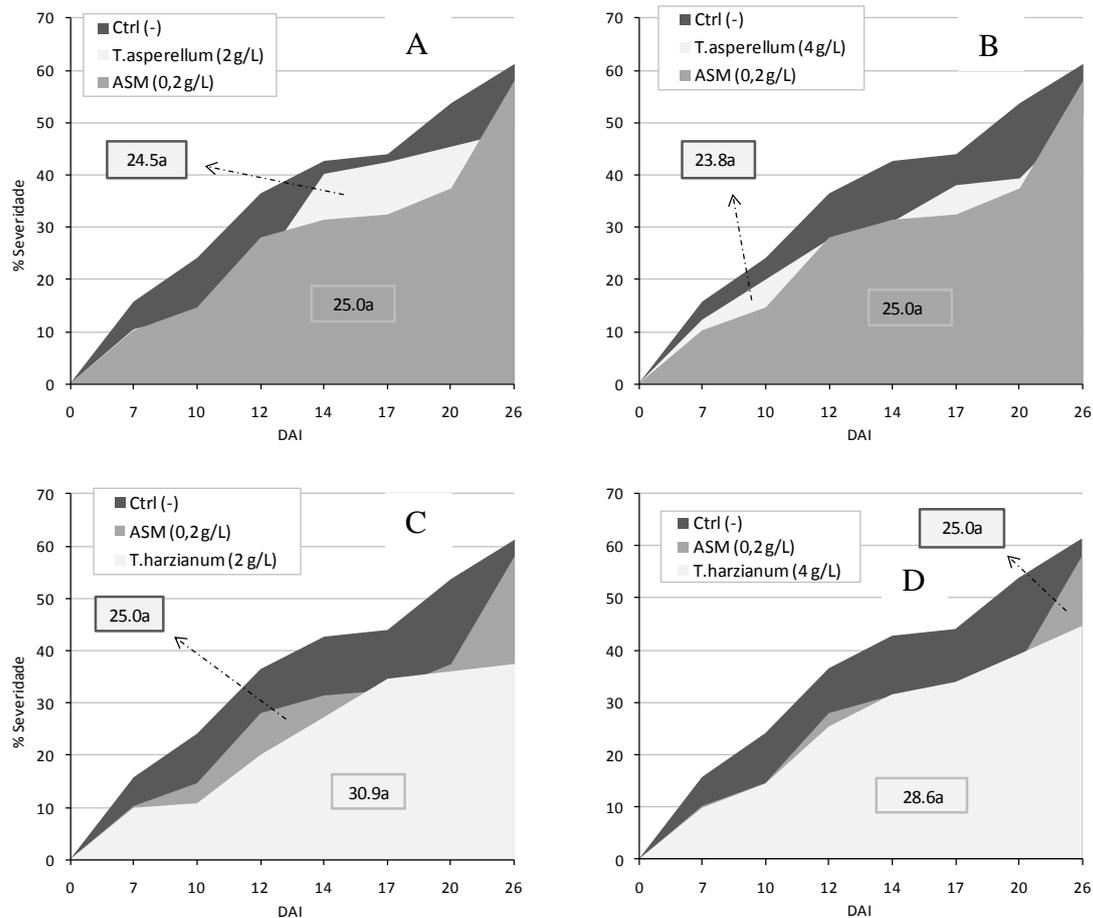


Figura 5 - Curvas de progresso de doença em plantas clonais de ‘Cabernet Sauvignon’, expostas a agentes de controle biológico e inoculadas com *P. viticola*. Em todos os gráficos, foram plotadas curvas de progresso de plantas pulverizadas com água destilada (Ctrl-) e acibenzolar S-metil (ASM Bion® 50% 0,4 g L<sup>-1</sup>), respectivamente como controles negativos e positivos. A. Progresso de míldio em plantas tratadas com *T. asperellum* (Quality® 2 g L<sup>-1</sup>). B. Progresso de míldio em plantas tratadas com *T. asperellum* (Quality® 4 g L<sup>-1</sup>); C. Progresso de míldio em plantas tratadas com *T. harzianum* (Ecotrich® 2 g L<sup>-1</sup>); D. Progresso de míldio em plantas tratadas com *T. harzianum* (Ecotrich® 4 g L<sup>-1</sup>). Dentro dos dias de avaliação, não foram observadas diferenças significativas, de acordo com o teste t (Student) a um nível de significância de 5%.

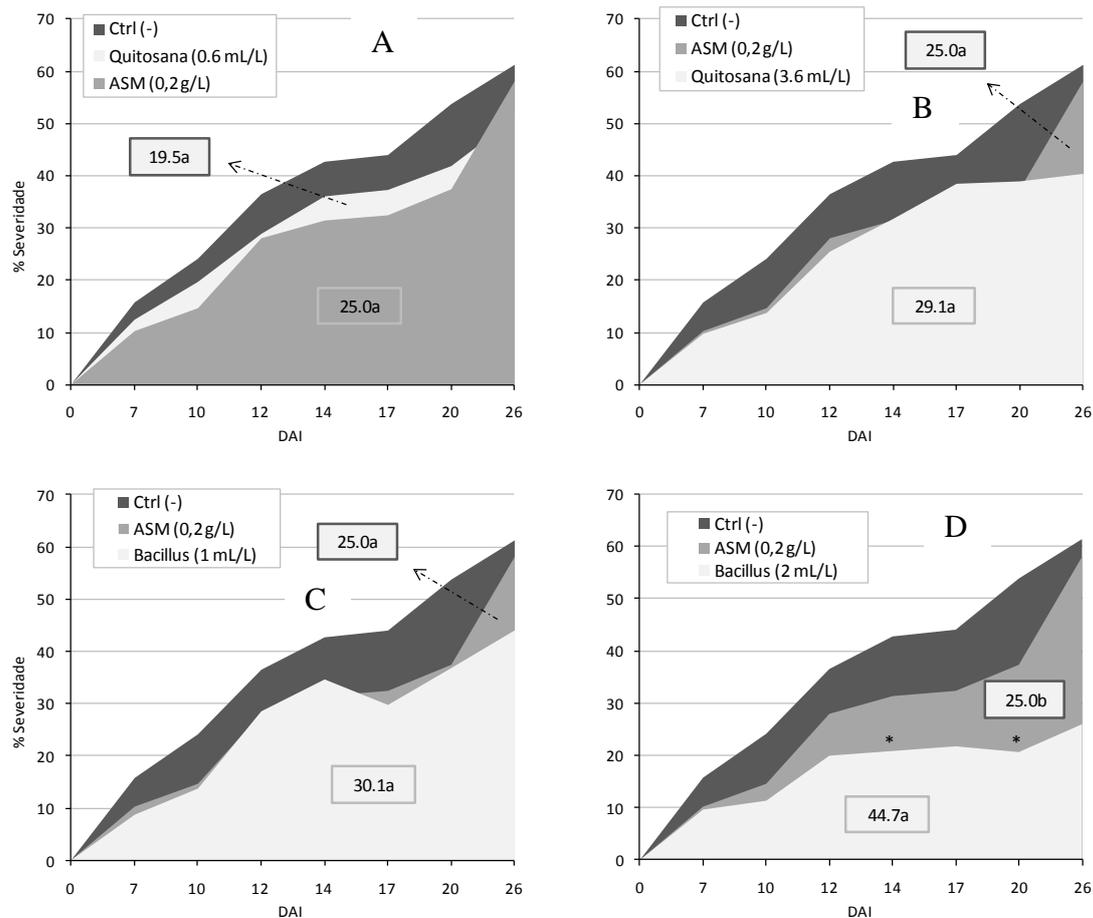


Figura 6 - Curvas de progresso de doença em plantas clonais de ‘Cabernet-Sauvignon’, expostas a quitosana e *B. subtilis*, e inoculadas com *P. viticola*. Em todos os gráficos, foram plotadas curvas de progresso de plantas pulverizadas com água destilada (Ctrl-) e acibenzolar S-metil (ASM, Bion® 50% 0,4 g L<sup>-1</sup>). A. Progresso de míldio em plantas tratadas com quitosana (Quitosana Polymar, 600 µL L<sup>-1</sup>); B. Progresso de míldio em plantas tratadas com quitosana (Quitosana Polymar, 3600 µL L<sup>-1</sup>); C. Progresso de míldio em plantas tratadas com *Bacillus subtilis* (Serenade®, 1 mL L<sup>-1</sup>); D. Progresso de míldio em plantas tratadas com *B. subtilis* (Serenade®, 2 mL L<sup>-1</sup>). Asteriscos dentro do dia de avaliação representam diferenças significativas entre o tratamento e Ctrl-, de acordo com o teste t (Student) a um nível de significância de 5%.

Quitosana também foi testada em folhas destacadas de plantas de videira, incubadas e tratadas com diferentes concentrações de quitosana durante 20 h. A partir de, ferimentos utilizando agulha foi inoculado o patógeno *B. cinerea* ( $2,5 \times 10^5$  conídios mL<sup>-1</sup>) nas folhas e o desenvolvimento da doença foi medido através do diâmetro médio das lesões. A dose 150 mg L<sup>-1</sup> suprimiu completamente as lesões, mas quando a mesma excedeu 200 mg L<sup>-1</sup>, o tecido foliar demonstrou-se danificado, com aumento da propagação dos sintomas causados por *B. cinerea* (TROTEL-AZIZ, 2006).

Nojosa et al. (2009) observaram o efeito de ASM, fosfito e fertilizante foliar em diferentes concentrações, assim como o fungicida tebuconazole na severidade de *Phoma costarricensis* em mudas de cafeeiro cv. Acaia Cerradoe averiguaram que os tratamentos ASM na dose 0,1 g L<sup>-1</sup>, fosfito 2,5 mL L<sup>-1</sup>, fosfito 5,0 mL L<sup>-1</sup> e o fertilizante 4,0 mL L<sup>-1</sup>, reduziram a severidade da doença em 80, 60,06, 63,18 e 63,40%, respectivamente, sendo esses valores superiores ao observado em plantas tratadas com o fungicida.

### **4.3 Atividade de enzimas relacionadas com a indução de resistência vegetal**

#### **4.3.1 Extração e dosagem de proteínas solúveis totais**

Com relação aos teores de proteínas solúveis totais em células de folhas de videira, os mesmos responderam com aumento 24 horas após as folhas receberem tratamento com *T. harzianum*. Os teores aumentaram gradativamente, com pico máximo 72 HAT, obtendo valores superiores ao controle 24, 48 e 72 HAT (Figura 7 A). Folhas de videira tratadas com ASM e *B. subtilis* obtiveram resultados semelhantes para teores de proteínas totais (Figura 7 B e D), entre 12 e 24 HAT houve uma diminuição dos teores, menores quando comparados com a testemunha, havendo pico máximo para ambos os tratamentos 48 HAT e diminuindo após 72 HAT.

Folhas de plantas de videira tratadas com quitosana apresentaram teores de proteínas solúveis totais menores, quando comparados com a testemunha, que obteve teores significativamente mais elevados (Figura 7 B).

Kuhn (2007) avaliou os teores de proteínas solúveis totais em folhas de feijoeiro tratadas com os indutores ASM e *Bacillus cereus*, em diferentes épocas e números de aplicações durante o ciclo da cultura. Houve redução no teor de proteínas para o tratamento com quatro aplicações durante o ciclo da cultura para o indutor *B. cereus*. Já para o indutor ASM em todas as épocas e diferentes números de aplicações, foi constatado um aparente aumento na concentração de proteínas.

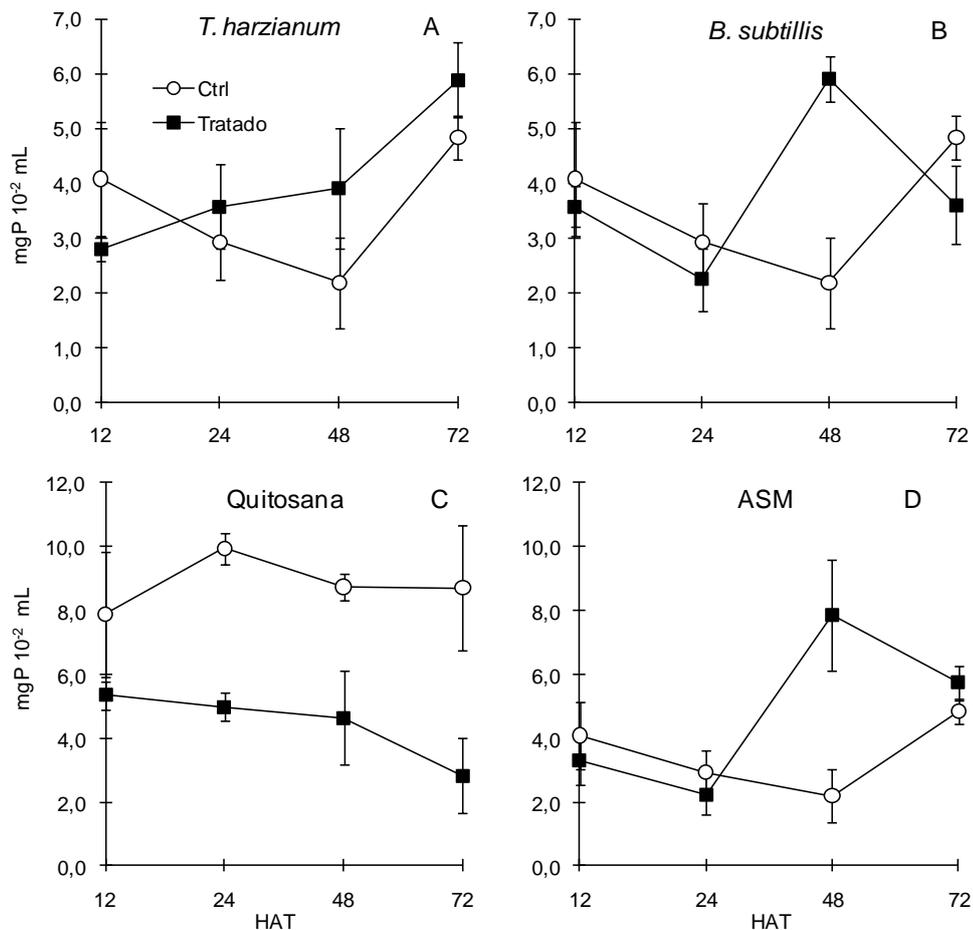


Figura 7 - Proteínas solúveis totais em folhas de videira ‘Cabernet Sauvignon’ em rebrotas de 45 dias. Coletas de material fresco para a extração salina foram realizadas 12, 24, 48 e 72 horas após o tratamento (HAT) das substâncias estudadas (-■-): A. *T. harzianum* (Ecotrich, 4 g L<sup>-1</sup>), B. *B. subtilis* (Serenade®, 2 mL L<sup>-1</sup>), C. Quitosana (Polymar®, 3600 µL L<sup>-1</sup>), D. Acibenzolar S-metil (ASM, Bion® 50%, 0,8 g L<sup>-1</sup>), sendo ‘Ctrl’ (-○-), o controle em água destilada. Barras de erros indicam desvio-padrão da média.

#### 4.3.2 Determinação da atividade de peroxidases (GPX)

Ao longo do período escolhido para monitoramento dos parâmetros metabólicos associados à indução de resistência, plantas pulverizadas com todos os tratamentos (*T. harzianum*, *Bacillus subtilis*, quitosana e ASM) mostraram intrigantes respostas, sustentadas no intervalo de estudo, de atividade de peroxidases de guaiacol (GPX) inferiores quando comparadas com o controle (Ctrl).

A atividade de GPX permaneceu praticamente constante entre 12 e 24 HAT, quando folhas de videira foram pulverizadas com *T. harzianum*, decaindo após 48 HAT e obtendo um

pequeno acréscimo 72 HAT. Houve uma diminuição significativa da atividade de GPX no Ctrl, 72 HAT, e um aumento discreto da atividade em folhas tratadas com o agente biótico (Figura 8 A).

As folhas de videira pulverizadas com *B. subtilis* apresentaram atividades de GPX menores que as verificadas em folhas de plantas pulverizadas com água (Ctrl). O pico máximo de atividade ocorreu 24 HAT, decaindo significativamente e permanecendo constante entre 48 e 72 HAT (Figura 8 B). Embora em outro intervalo de monitoramento e outra espécie, Araújo et al. (2009) estudaram o efeito de *B. subtilis* estirpe PRBS-1, pulverizado semanalmente em folhas de tomateiro, na dosagem 1 g L<sup>-1</sup>, o qual demonstrou, após 8 semanas, um aumento na atividade de GPX.

Folhas de videira pulverizadas com o tratamento quitosana, obtiveram atividade semelhante ao Ctrl, 12 HAT, aumentando 24 HAT e, entre 48 e 72 HAT, a atividade de peroxidases se manteve constante e inferior à testemunha (Figura 8 C).

Como mostrado na Figura 8 D, folhas de videira tratadas com ASM, apresentaram aumento na atividade de GPX, o qual foi pouco perceptível 12 HAT, mas ficou evidenciado 24 HAT quando foi detectado pico máximo, decaindo 48 e 72 HAT. Cavalcanti et al. (2011) observaram resultados semelhantes em atividades de GPX de folhas de videira da variedade 'Merlot', quando, após aplicação de ASM na concentração 0,2 g L<sup>-1</sup>, foi verificada a redução nas atividades dessa enzima, às 6 e 12 horas após a pulverização (HAP).

De modo contrário, Garcia (2014) observaram, em folhas de videira cv. Isabel Precoce, pulverizadas com ASM na concentração 0,005% e, após 24 h, inoculadas com o fungo *Plasmopara viticola*, uma maior atividade de peroxidase 6 e 24 horas após a aplicação do tratamento (HAT), mantendo valores superiores à testemunha, mas não diferindo estatisticamente da mesma.

Folhas de videira da cultivar Chasselas (*V. vinífera*) tratadas com dois extratos provenientes da casca de *Frangula alnus* (FABE) e da raiz de *Rheum almatum* (RPRE) e posteriormente inoculadas com o fungo *Plasmopara viticola*, apresentaram atividade de peroxidases inicialmente maior 3 horas após a inoculação (HPI) para FABE e 6 HPI para RPRE, comparadas com a testemunha (GODARD et al., 2009).

Afim de verificar o controle de doença a partir de agentes biológicos, plântulas de tomate cv. Arka vikas, tratadas com *T. harzianum* e *B. subtilis* na concentração 10<sup>8</sup> ufc mL<sup>-1</sup>, apresentaram atividades de GPX 30 dias após o tratamento, os quais proporcionaram um aumento de 59,93% e 43,72 % na atividade de peroxidases, para plântulas tratadas com *T.*

*harzianum* e *B. subtilis*, respectivamente, em relação à testemunha (CHOWDAPPA et al., 2013).

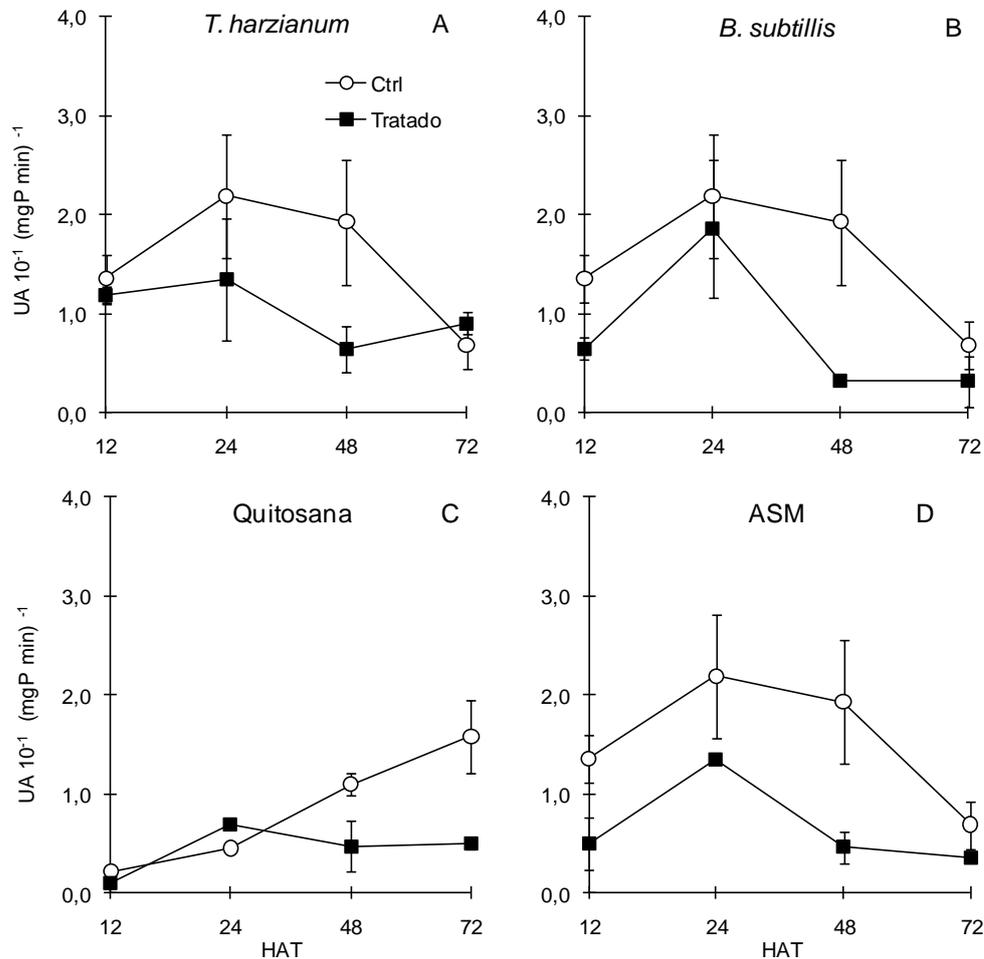


Figura 8 – Atividade ( $\text{mgP min}^{-1}$ ) de peroxidases de guaiacol (GPX) em folhas de videira ‘Cabernet Sauvignon’. Amostras de tecido foliar fresco foram obtidas de rebrotas de 45 dias e respostas enzimáticas foram monitoradas em 12, 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos tratamentos (HAT) das substâncias estudadas. As substâncias testadas (-■-) foram: A. *T. harzianum* (Ecotrich, 4 g L<sup>-1</sup>), B. *B. subtilis* (Serenade®, 2 mL L<sup>-1</sup>), C. Quitosana (Polymar, 3600  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), D. Acibenzolar S-metil (ASM, Bion® 50%, 0,8 g L<sup>-1</sup>), sendo ‘Ctrl’ (-○-), o controle em água destilada. Barras de erros indicam desvio-padrão da média.

#### 4.3.3 Determinação da atividade de polifenoloxidasas (PPO)

Folhas de videira tratadas com *T. harzianum* apresentaram comportamento decrescente para as atividades de PPO, ao longo do intervalo, muito semelhante à testemunha. A enzima

obteve maior atividade 12 h após a aplicação do tratamento (HAT), decrescendo e se mantendo estável entre 24 e 48 HAT, diminuindo ainda mais sua atividade 72 HAT (Figura 9 A).

As atividades de PPOs em folhas de videira tratadas com *Bacillus subtilis* obtiveram comportamento semelhante à testemunha 12 HAT, sendo o pico máximo da atividade enzimática registrado às 24 HAT, havendo uma diminuição significativa 48 HAT, a qual foi inferior à testemunha e logo após (72 HAT), um aumento discreto da atividade (Figura 9 B), em um padrão de oscilação.

Quitosana pulverizada sobre folhas de videira, na concentração  $3600 \mu\text{L L}^{-1}$ , praticamente não induziu, em tecido foliar, respostas enzimáticas diferentes das do controle (Figura 9 C). Em 12 HAT, pôde-se observar que a quitosana promoveu inferiores aos observados nas plantas controle. Verificou-se um aumento a 24 HAT, mantendo-se em patamares iguais ao da testemunha às 48 e 72 HAT.

Acibenzolar-S-metil (ASM) aplicado sobre plantas de videira promoveu aumento de atividade de PPOs quando comparado à plantas controle. Vinte e quatro HAT, observou-se, um pico maior, diminuindo sua atividade entre 48 e 72 HAT (Figura 9 D).

Kuhn (2007) estudou a atividade de PPO em folhas de feijoeiro tratadas com o indutor biótico *B. cereus* e o indutor abiótico ASM, nas concentrações  $10^8 \text{ ufc mL}^{-1}$  e  $50 \text{ mg i.a L}^{-1}$ , respectivamente. O experimento foi composto por quatro tratamentos, que diferiram quanto ao número de dias de aplicação, incluindo a testemunha, sendo que a atividade de polifenoloxidas não foi alterada em função dos indutores e nem do número de aplicações ao longo do ciclo da cultura.

Para verificar a atividade de PPO Iurkv (2009) estudou o efeito do extrato bruto do basidiocarpo *Pycnoporus sanguineus*, conhecido como orelha-de-pau, na indução de resistência em cotilédones de soja, verificando que o extrato bruto do cogumelo na concentração 20% reduziu a atividade de polifenoloxidas em 56,9% em relação ao controle que recebeu apenas água como tratamento.

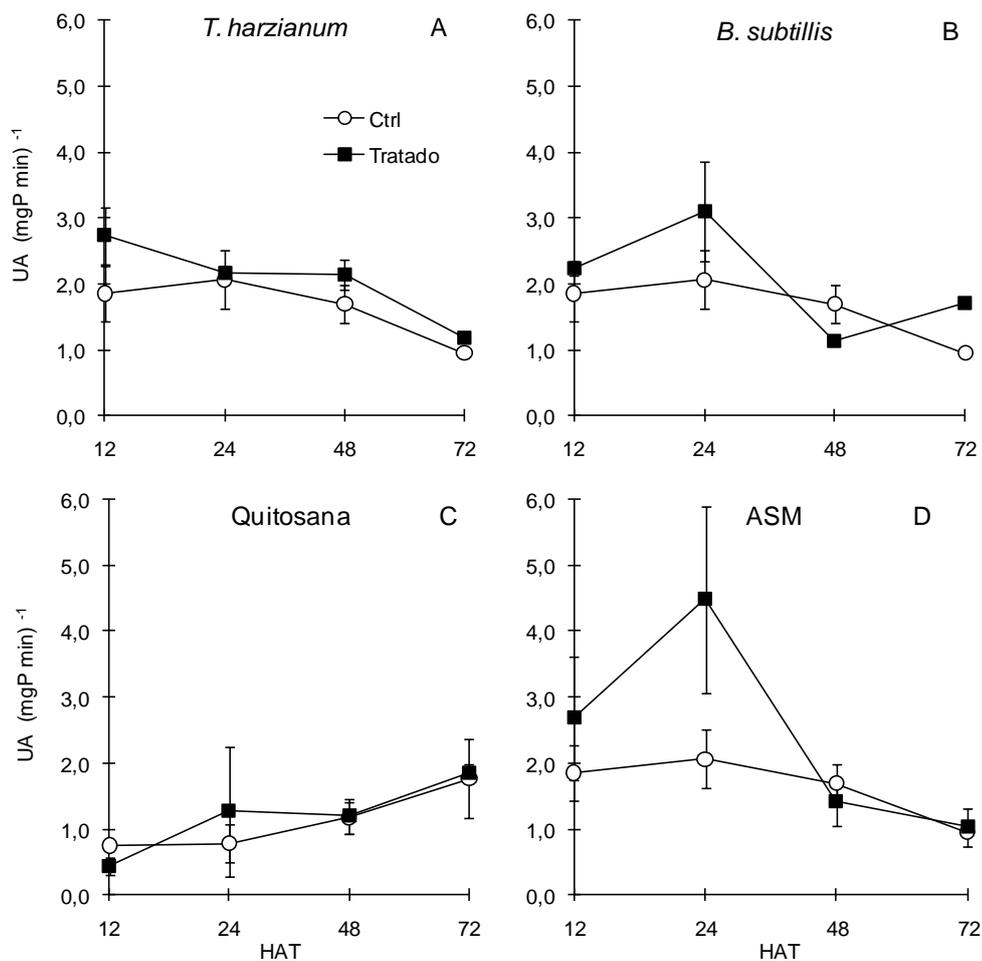


Figura 9 – Atividade ( $\text{mgP min}^{-1}$ ) de polifenoloxidasas (PPO) na oxidação de orto-difenóis em folhas de videira ‘Cabernet Sauvignon’. Amostras de tecido foliar fresco foram obtidas de rebrotas de 45 dias e respostas enzimáticas foram monitoradas em 12, 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos tratamentos (HAT) das substâncias estudadas. As substâncias testadas (-■-), foram: A. *T. harzianum* (Ecotrich,  $4 \text{ g L}^{-1}$ ), B. *B. subtilis* (Serenade®,  $2 \text{ mL L}^{-1}$ ), C. Quitosana (Polymar,  $3600 \mu\text{L L}^{-1}$ ), D. Acibenzolar S-metil (ASM, Bion® 50%,  $0,8 \text{ g L}^{-1}$ ), sendo ‘Ctrl’ (-○-), o controle em água destilada. Barras de erros indicam desvio-padrão da média.

Neste ponto, é interessante comentar que as respostas enzimáticas são, por vezes, contrastantes e parecem ser altamente características da espécie de planta estudada e específicas ao tipo de estresse, ou tipo de parasitismo a que a planta está sendo submetida. Das observações feitas sobre os diferentes casos de interação planta-patógeno revisados, vislumbra-se a importância de monitorar a atividade de enzimas ao longo do tempo, em vários pontos do intervalo experimental. Ao mesmo tempo, verifica-se também a importância de estudar alguns pontos do metabolismo de defesa, em uma dada situação de pesquisa sobre indução de resistência em uma determinada planta hospedeira.

#### 4.3.4 Determinação da atividade de $\beta$ -1,3-glucanases (GLU)

O monitoramento das atividades de  $\beta$ -1,3-glucanases foi realizado ao longo do mesmo tempo de coleta do material foliar usado para a determinação da atividade das outras enzimas. Para o agente de controle biológico *T. harzianum* (Figura 10 A), foi verificada atividade maior da enzima, quando comparada com a testemunha, que obteve comportamento semelhante e sustentado ao longo do intervalo de monitoramento. A maior atividade ocorreu nas primeiras 12 HAT, decaindo 24 HAT e obtendo pico máximo de atividade 48 HAT, voltando a cair significativamente 72 HAT.

Após a aplicação de *B. subtilis*, a atividade da enzima em folhas de Cabernet Sauvignon decresceu entre 12 e 24 HAT, igualando-se ao controle (Ctrl), e mantendo-se constante das 24 até às 48 HAT. A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases elevou-se em 72 HAT, sendo o aumento maior do que o mostrado pela testemunha (Figura 10 B).

Folhas de plantas de videira que receberam o tratamento quitosana apresentaram atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase menores que o Ctrl. A atividade enzimática decaiu significativamente entre 12 e 72 HAT (Figura 10 C).

A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase pareceu ter sido influenciada por ASM. Em 12 HAT, o comportamento da atividade era semelhante ao Ctrl. 24 HAT foi verificado um pico máximo de atividade, o qual diminuiu significativamente 48 HAT e manteve-se praticamente constante até 72 HAT (Figura 10 D).

Folhas de cafeeiro, cultivar Novo Mundo, pulverizadas com ASM a  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  induziram local e sistemicamente a atividade de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase (GUZZO et al., 2004). Xue et al. (1998) estudaram o efeito da inoculação de *Rhizoctonia* binucleada não patogênica em plântulas de feijoeiro 48 h antes da inoculação com os patógenos *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum lindemuthianum*, verificando um aumento significativo da atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase.

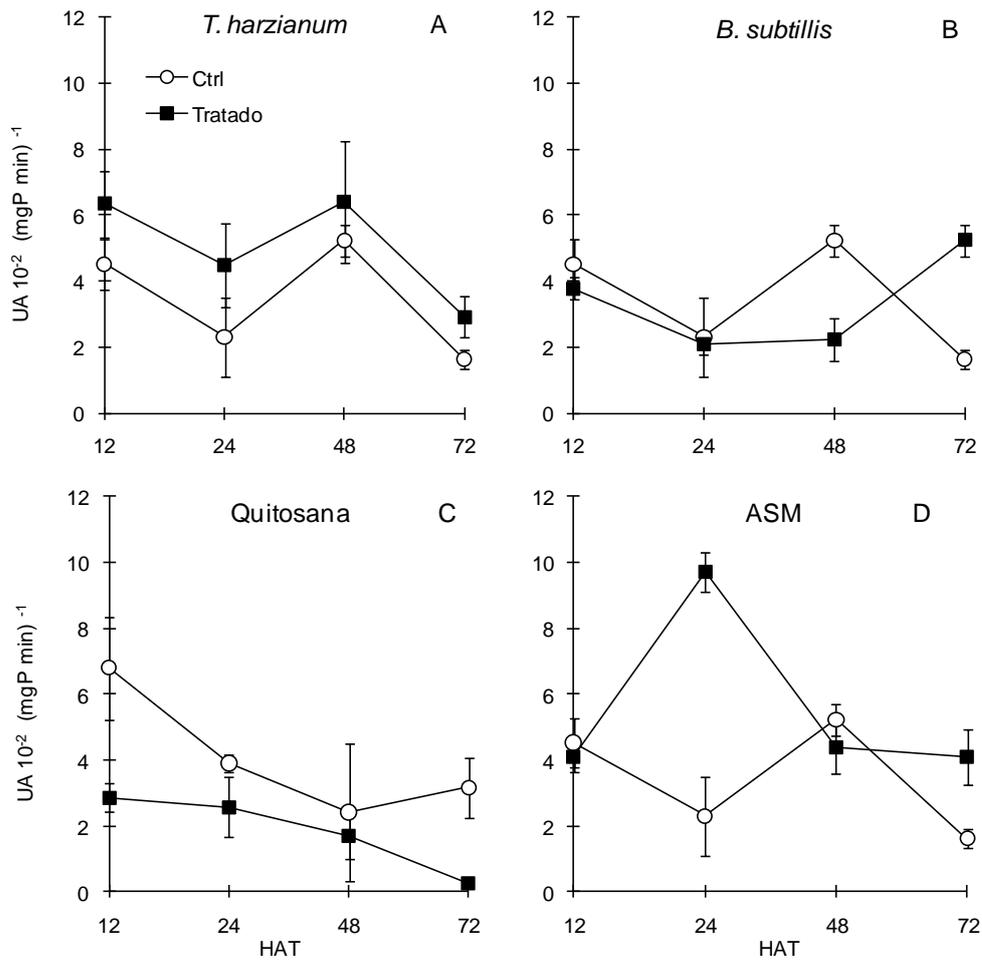


Figura 10 - Atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU) em folhas de videira ‘Cabernet Sauvignon’. Amostras de tecido foliar fresco foram obtidas de rebrotas de 45 dias e respostas enzimáticas foram monitoradas em 12, 24, 48 e 72 horas após a pulverização (HAT) das substâncias estudadas. As substâncias testadas (-■-) foram: A. *T. harzianum* (Ecotrich, 4 g L $^{-1}$ ), B. *B. subtilis* (Serenade<sup>®</sup>, 2 mL L $^{-1}$ ), C. Quitosana (Polymar, 3600  $\mu$ L L $^{-1}$ ), D. Acibenzolar S-metil (ASM, Bion<sup>®</sup> 50%, 0,8 g L $^{-1}$ ), sendo ‘Ctrl’ (-○-), o controle em água destilada. Barras de erros indicam desvio-padrão da média.

#### 4.3.5 Determinação da atividade de quitinases (QUI)

A pulverização de *T. harzianum* em folhas de videira cv. Cabernet Sauvignon promoveu um comportamento de queda prolongada para as atividades de quitinases (QUI) monitoradas ao longo do intervalo 12-72 HAT (Figura 11 A). No entanto, quando se comparou as atividades das plantas tratadas com o controle, foram verificados valores maiores nas atividades de quitinases, sustentadas ao longo do intervalo.

A atividade de quitinase se manteve baixa ao longo do tempo de coleta do material vegetal e semelhante ao comportamento da atividade de quitinase para o controle, quando plantas de videira foram submetidas ao tratamento com quitosana (Figura 11 C). Tanto folhas de plantas de videira tratadas com *B. subtilis*, como as tratadas com ASM tiveram comportamentos semelhantes (Figura 11 B e D), com pico máximo de atividade 24 HAT, diminuindo entre 24 e 72 HAT.

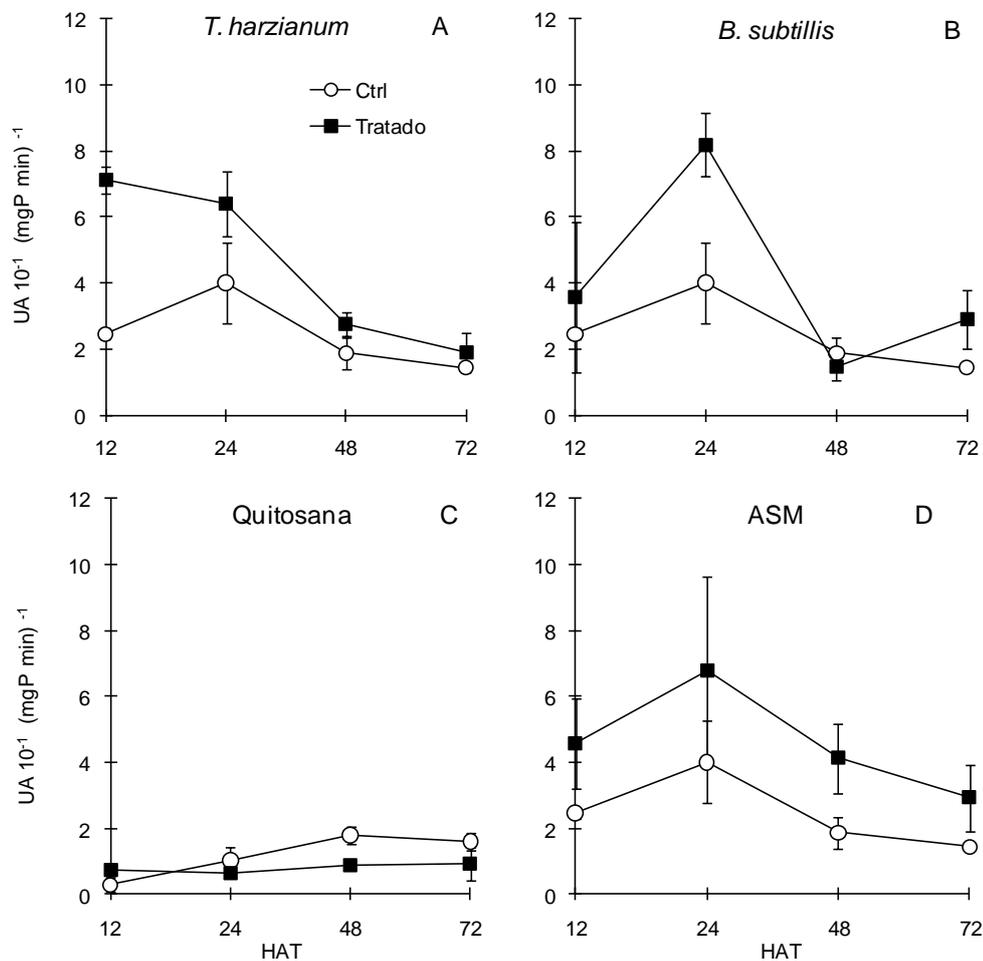


Figura 11 - Atividades de quitinases (CHI) em folhas de videira 'Cabernet Sauvignon'. Amostras de tecido foliar fresco foram obtidas de rebrotas de 45 dias e respostas enzimáticas foram monitoradas em 12, 24, 48 e 72 horas após a pulverização (HAT) das substâncias estudadas. As substâncias testadas (-■-) foram: A. *T. harzianum* (Ecotrich, 4g L<sup>-1</sup>), B. *B. subtilis* (Serenade®, 2 mL L<sup>-1</sup>), C. Quitosana (Polymar, 3600 µL L<sup>-1</sup>), D. Acibenzolar S-metil (ASM, Bion® 50%, 0,8 g L<sup>-1</sup>), sendo 'Ctrl' (-○-), o controle em água destilada. Barras de erros indicam desvio-padrão da média.

Procurando investigar o efeito de quitosana, Aziz (2006) submeteu folhas de videira a diferentes concentrações de quitosana 100, 200 e 300 µg mL<sup>-1</sup> e monitorou atividades

enzimáticas de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases. As mesmas aumentaram 10 h após o tratamento e obtiveram acúmulo máximo às 24 h, mantendo-se elevada durante 48 h, com máxima atividade nas concentrações de 200 e 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 4.3.6 Determinação de fenóis solúveis totais

*T. harzianum* obteve maiores teores de fenóis solúveis totais 12 horas após o tratamento (HAT) quando comparado com a testemunha, a qual demonstrou aumento da atividade 12 HAT igualando-se ao tratamento com *T. harzianum*, que se manteve praticamente constante até 48 HAT, decaindo posteriormente até 72 HAT (Figura 12 A).

Após a aplicação de *B. subtilis*, o teor de compostos fenólicos totais exibiu tendência de redução em praticamente todas as horas de coleta do material fresco. Assim como *T. harzianum*, o teor de fenóis 12 HAT foi superior à testemunha, diminuindo 24 HAT e 48 HAT e mantendo-se constante entre 48 e 72 HAT (Figura 12 B).

Como mostrado pela Figura 12 C, folhas de plantas de videira que receberam quitosana, apresentaram entre 12 e 24 HAT comportamento semelhante às plantas controle. Em 48 HAT, houve pico máximo dos teores de fenóis, maior que a testemunha e, posteriormente, um declínio acentuado.

Folhas de plantas de videira tratadas com ASM demonstraram teores de fenóis totais 12 HAT superior a testemunha, igualando-se a mesma 24 HAT e diminuindo 48 HAT tendo um pequeno aumento 72 HAT (Figura 12 D). Do que foi evidenciado no presente ensaio, considerando as respostas associadas a fenóis solúveis totais, pouco se pode concluir a respeito da ativação de metabolismos gerais de fenólicos, os quais fazem parte intermediária da biossíntese de fitoalexinas e compostos fenilpropanóides, precursores da lignina.

Kuhn (2007) estudou o efeito dos indutores *Bacillus cereus* ( $10^8$  ufc  $\text{mL}^{-1}$ ) e ASM (50 mg i.a.  $\text{L}^{-1}$ ) na indução de resistência em feijoeiro. As aplicações dos indutores diferiram quanto ao número. *B. cereus* não diferiu estatisticamente da testemunha e após a segunda aplicação, aos 28 dias, reduziu o teor de fenóis totais. ASM apresentou a mesma tendência, porém obteve diferença significativa após a segunda aplicação para os tratamentos com 4 aplicações (14, 28, 42 e 56 dias após a emergência (DAE)) e 3 aplicações (14, 28 e 42 DAE), diminuindo o teor significativamente após a segunda aplicação.

Ramamoorthy et al. (2002) observaram um aumento no teor de compostos fenólicos em plantas de tomate e pimenta, inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* na concentração  $10^8$  ufc  $\text{mL}^{-1}$  e posteriormente desafiadas com *Pseudomonas aphanidermatum*. Porém, o aumento no teor só foi possível após o desafio com o patógeno, pois a rizobactéria sozinha não alterou a composição fenólica.

Pereira (2009) determinou os teores de fenóis solúveis totais em tecidos foliares de videira tratadas com fosfitos e Bion<sup>®</sup> aos 4 e 13 dias após a aplicação dos tratamentos, verificando que os teores de fenóis solúveis totais não foram influenciados pelos mesmos.

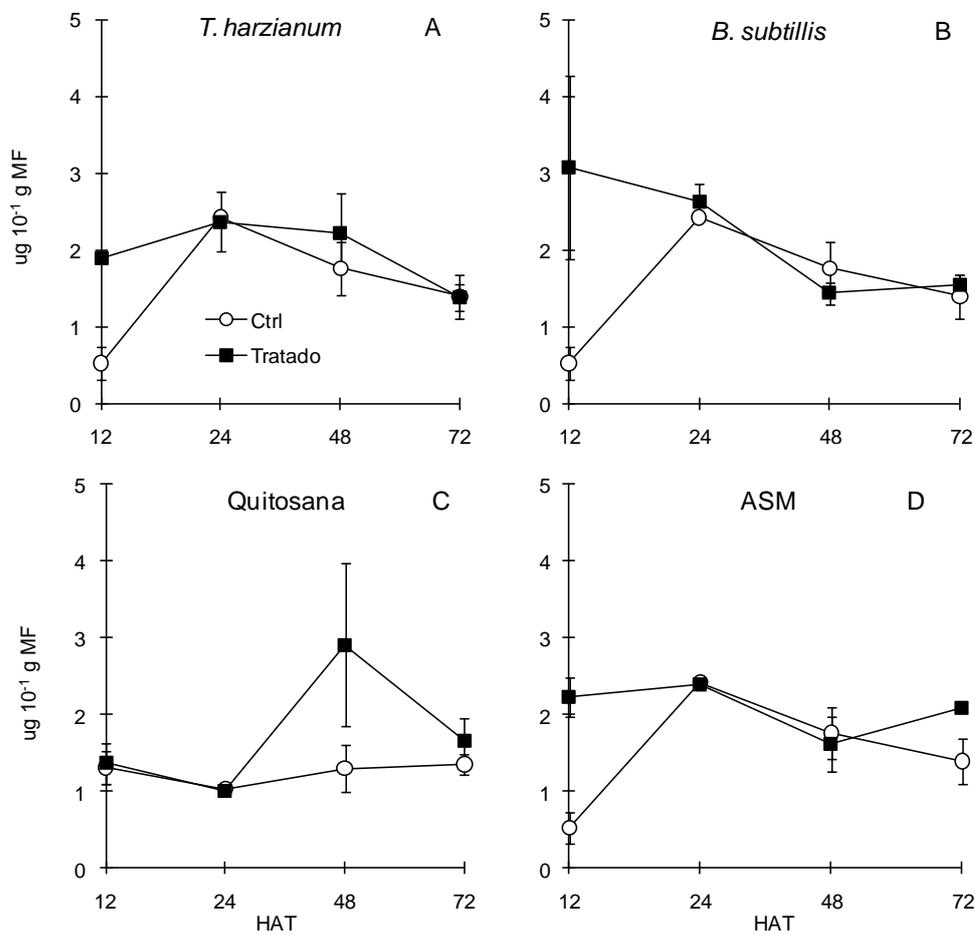


Figura 12 - Fenóis solúveis totais ( $\mu\text{g } 10^{-1}$  por grama de massa fresca) em folhas de videira ‘Cabernet Sauvignon’ em rebrotas de 45 dias. Coletas de material fresco para a extração salina foram realizadas 12, 24, 48 e 72 horas após a pulverização (HAT) das substâncias estudadas (-■-) foram: A. *T. harzianum* (Ectrich,  $4\text{g L}^{-1}$ ), B. *B. subtilis* (Serenade®,  $2\text{mL L}^{-1}$ ), C. Quitosana (Polymar,  $3600\mu\text{L L}^{-1}$ ), D. Acibenzolar S-metil (ASM, Bion® 50%,  $0,8\text{g L}^{-1}$ ), sendo ‘Ctrl’ (-○-), o controle em água destilada. Barras de erros indicam desvio-padrão da média.

Assim, os compostos fenólicos são substrato para a síntese de lignina (VANCE et al., 1980). Os teores de fenóis diminuíram, porém o processo de síntese de fenóis poderia ter sido implementado pelo aumento da atividade da fenilalanina-amônia-liase, o que não foi avaliado nesse experimento.

#### 4.3.7 Determinação de lignina em folhas

Os teores de lignina em folhas de videira pulverizadas com os diferentes tratamentos (Figura 13) não diferiram estatisticamente ( $P > 0,05$ ) com relação ao controle, 72 HAT. Porém, mesmo não havendo diferença significativa entre os tratamentos com relação à testemunha, foram verificados aumentos nos teores de derivados do ácido tioglicólico (lignina).

Cavalcanti et al. (2011) em trabalho semelhante testaram extrato de pé-preto na concentração 40% v/v e ASM na dose  $0,2 \text{ g L}^{-1}$ , na indução de teores de lignina em plantas de videira cv. Cabernet Sauvignon, os quais 72 HAT demonstraram uma pequena deposição de lignina em folhas de videira.

Kuhn (2007) verificou que o indutor biótico *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8 \text{ ufc mL}^{-1}$ ) não induziu a formação de lignina no tecido foliar de feijoeiro. Porém, verificou que ASM ( $50 \text{ mg i.a. L}^{-1}$ ), aplicado quatro vezes durante o ciclo do feijoeiro (0, 14, 28 e 48 dias), aumentou o teor de lignina e diferiu significativamente do controle (somente água) na última coleta (48 dias).

Teores de lignina foram investigados em folhas de plantas de videira tratadas com fosfitos, produtos comerciais Pepfós ( $6 \text{ mL L}^{-1}$ ) e Reforce ( $4,5$  e  $6 \text{ mL L}^{-1}$ ) e Bion ( $0,4 \text{ g L}^{-1}$ ), e inoculadas, sete dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), com o fungo *P. viticola*. As folhas foram coletadas aos quatro (sem inoculação) e aos 13 (com inoculação) DAT. Aos 4 DAT, não foi verificado efeito significativo dos tratamentos fosfitos e Bion® nos teores de lignina. Entretanto, 14 DAT, Bion® e Reforce® ( $6 \text{ mL L}^{-1}$ ) aumentaram os teores de lignina nas folhas de videira, diferindo estatisticamente da testemunha, que recebeu apenas água como tratamento (PEREIRA, 2009).

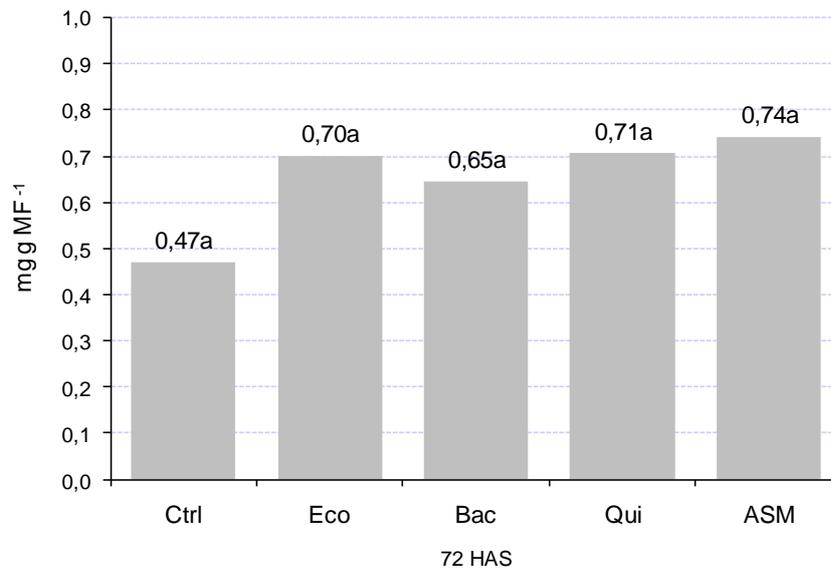


FIGURA 13 – Teor (mg g massa fresca<sup>-1</sup>) de lignina em folhas de videira ‘Cabernet Sauvignon’. Amostras de tecido foliar fresco foram obtidas de rebrotas de 45 dias e 72 horas após a pulverização (HAT) dos produtos estudadas. As substâncias foram: ‘Eco’ (*T. harzianum*, Ecotrich, 4g L<sup>-1</sup>), ‘Bac’ (*B. subtilis*, Serenade®, 2mL L<sup>-1</sup>), ‘Qui’ (Quitosana, Polymar, 3600µL L<sup>-1</sup>), ‘ASM’ (acibenzolar S-metil, ASM, Bion® 50%, 0,8 g L<sup>-1</sup>), sendo ‘Ctrl’, o controle em água destilada. Não há diferenças significativas entre as médias, dentro de cada tratamento avaliado, de acordo com o teste de Tukey (P > 0,05).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Bacillus subtilis* na concentração 2 mL L<sup>-1</sup> promove proteção em folhas de videira contra míldio.

Os produtos estudados promovem alterações e perturbações nos indicadores enzimáticos do metabolismo de defesa vegetal.

Agentes de controle biológico e quitosana não diferiram significativamente da testemunha (P > 0,05) para deposição nos teores de lignina em folhas de videira.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends in Plant Science**, v.17, n. 2, p. 73-90, 2012.

AIT BARKA, E. et al. Chitosan improves development and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 22, n. 8, p. 608-614, 2004.

ALFANO, J. R.; COLLMER, A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. **Annual Review Phytopathology**, v. 42, p. 385-414, 2004.

AZEVEDO, L. A. S. **Manual de quantificação de doenças de plantas**. São Paulo: Luiz Antônio Siqueira de Azevedo, p. 114, 1997.

AZIZ, A. et al. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 12, p. 1118-1128, 2003.

BEDENDO, I. P. IN: AMORIM, L.; REZENDE, J.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. v. 1, 4. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p. 255-270, 2011.

BENHAMOU, N.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Springer Berlin**, Heidelberg, v. 204, p. 153-168, 1998.

BENT, A. F.; MACKEY, D. Elicitors, effectors and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. **Annual Review Phytopathology**, v. 45, p. 399-436, 2007.

BERGAMIN, F. A.; CAMARGO, L.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p. 736-757, 1997.

BETTIOL, W. Biopesticides use and research in Brazil. **Outlooks on Pest Management**, p. 280-283, 2011.

BETTIOL, W. et al. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2012. p. 155 (Documento 88).

BHUIYAN, H. N. et al. Role of lignification in plant defense. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. 2, p. 158-159, 2009.

BLAESER, M. Untersuchungen zur Epidemiologie des falschen Mehltaus an Weinrebe, *Plasmopara viticola* (Berk. et de Toni). PhD Thesis Universität Bonn Germany, p. 127, 1978.

BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review of Phytopathology**, v. 60, p. 379-406, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, F. A. Uva e vinho. **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina**, p. 83-88, 2011.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Wiley-Interscience, 1990.

CAVALCANTI, F. R. et al. Induced defence responses and protective effects on tomato against *Xanthomonas vesicatoria* by an aqueous extract from *Solanum lycocarpum* infected with *Crinipellis pernicioso*. **Biological Control**, v. 39, p. 408-417, 2006.

CAVALCANTI, F. R. et al. Induction of resistance against *Verticillium dahliae* in cacao by a *Crinipellis pernicioso* suspension. **Journal of Plant Pathology**, v. 90, p. 273-280, 2008.

CAVALCANTI, F. R. et al. Unbalance between peroxidase and polyphenol oxidase activities during an elicitor-induced lignification in 'Merlot' grapevine. In: XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2011, Bento Gonçalves. **Anais...Bento Gonçalves: Tropical Plant Pathology**, 2011. p. 502.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005, p. 81-124.

CAVALCANTI, R. F.; PEREIRA, F. V.; RIBEIRO JÚNIOR, M. P. **Aspectos da indução de resistência em plantas de videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014. (Documento 88).

CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, I. Fungal antagonists and mycoparasites. In: WICKLOW, D. T.; SODERSTROM, B. **The mycota IV: Environmental and microbial relationships**, Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 165-184.

CHOWDAPPA, S. P. et al. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. **Biological Control**, v. 65, p. 109–117, 2013.

CLIVE LO, S. C.; NICHOLSON, R. L. Compostos fenólicos e a importância nas doenças em plantas. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R. **Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba, Fealq. 2008. p. 285-303.

CONSTABEL, C. P.; BERGEY, D. R.; RYAN, C. A. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, Washington, v. 92, p. 407-411, 1995.

CUTT, J. R.; KLESSIG, D. F. Pathogenesis-related proteins. In: BOLLER, T.; MEINS J. f. **Plant gene research: Genes involved in plant defense**, Wien: Springer-Verlag, 1992. p. 209-243.

CZERMAINSKI, C. B. A. Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de avaliação de doenças em plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 9, p. 1545-1555, 1999.

DI PIERO, M. R.; GARDA, V. M. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 9, p. 1121-1128, 2008.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, p. 843-847, 2001.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. Compendium of soil fungi. **Academic Press**, v. 1, p. 860, 1980.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology**, v. 42, p. 185–209, 2004.

EDREVA, A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. **General and Applied Plant Physiology**, v. 31, p. 105-124, 2005.

ESPINOSA, A.; ALFANO, J. R. Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. **Cellular Microbiology**, v. 6, p. 1027–1040, 2004.

FANG, S. W.; LI, C. F.; SHIH, D. Y. C. Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 2, p. 136-140, 1994.

FLEURI, F. L.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 871-879, 2005.

FLURKEY, W. H. Polypeptide composition and amino-terminal sequence of broad bean polyphenoloxidase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, p. 481-483, 1989.

FORBES-SMITH, M. Induced resistance for the biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables. **Food Austrália**, North Sidney, v. 51, n. 8, p. 382-385, 1999.

FREEMAN, B. C.; BEATTIE, G. A. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. **The Plant Health Instructor**, 2008.

FREIRE, L. M. M.; FREIRE, J. M.; CALDART, V. Z. Transformação na estrutura produtiva dos viticultores da Serra Gaúcha: 1985-1991. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1992. p. 44 (Documento, 7).

FRY, S. C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell wall of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 37, p. 165-186, 1986.

GALET, P. **Les maladies et les parasites de la vigne**. Montpellier: Impr. du Paysan du Midi, 1982.

GALLOTTI, J. M. G.; GRIGOLETTI, J. A. **Doenças fúngicas da videira e seu controle no Estado de Santa Catarina**. Florianópolis: EMPASC, 1990. p. 46 (Boletim Técnico, 51).

GARCIA, C. **Óleo vegetal no controle do míldio e suspensão miceliana aquosa de *Agaricus brasiliensis* na indução de resistência de videiras cv. Isabel Precoce**. 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2014.

GARCION, C.; LAMOTTE, O.; MÉTRAUX, J. P. Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. **Induced**

**resistance for plant defence – a sustainable approach to crop protection.** Oxford: Blackwell, 2007. p. 109-132.

GAUILLARD, F., RICHARD-FORGET, F.; NICOLAS, J. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 215, p. 59-65, 1993.

GESSLER, C.; PERTOT, I.; PERAZZOLLI, M. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 50, p. 3-44, 2011.

GODARD, S. et al. Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin- and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 827–837, 2009.

GORJANOVIC, S. A review: biological and technological functions of barley seed Pathogenesis – Related Proteins (PRs). **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, n. 4, p. 334-360, 2009.

GOULD, L. J. The Quarterly Review of Biological. **Chicago Journals**, v. 51, n. 2, p. 211-244, 1976.

GRÜNZEL, H. Untersuchungen über die Oosporenbildung beim falschen Mehltau der Weinrebe (*Peronospora viticola* de Bary). **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten, Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz**, v. 68, p. 65–80, 1961.

GUEST, D. I.; BROWN, J. F. Plant defences against pathogens. In: BROWN, J. F.; OGLE, J. H. **Plant Pathogens and Plant Diseases**. New South Wales: Rockvale Publications, Armidale, , 1997. p. 263-286.

GUZZO, S. D. et al. Resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e indução local e sistêmica de quitinases e  $\beta$ -1, 3-glucanases por acibenzolar-S-metil. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 3, p. 376-381, 2004.

HAHN, M. G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 387-412, 1996.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 77-84, 1999.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. A review. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. *Trichoderma* and *Gliocladium*. **Taylor e Francis**, London, p. 278, 1998.

HIRAGA, S. et al. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.

HOAGLAND, R. E. Biochemical responses of plants to pathogens. In: HOAGLAND, R. E. **Microbes and microbial products as herbicides**. American Chemical Society: Washington, 1990. p. 87-113.

HOLUB, E. B.; COOPER, A. Matrix, reinvention in plants: how genetics is unveiling secrets of non-host disease resistance. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 211-214, 2004.

HOWELL, C. R. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 92, p. 177-180, 2002.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, p. 1- 83, 2013.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. **Produção Agrícola Municipal. Culturas Temporárias e Permanentes**, Rio de Janeiro, v. 37, p.1-91, 2010.

IBRAVIN. INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. **A Viticultura Brasileira**. Bento Gonçalves, 2010. Disponível em : <<http://www.ibravin.org.br/brasilvitivinicola.php>>. Acesso em: 30 jan. 2015.

ISHIGE, F. et al. Identification of a basic glycoprotein induced by ethylene in primary leaves of azuki bean as a cationic peroxidase. **Plant Physiology**, v. 101, p. 193-199, 1993.

IURKV, L. **Purificação parcial de compostos biologicamente ativos a partir de *Pycnoporus sanguineus* para o controle de ferrugem asiática em soja**, 2009, Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2009.

JACKSON, R. S. **Wine science: principles and applications**. 3. ed. Burlington (USA): Academic Press, 2008.

JEGER, J. M.; PAUTASSO, M. Comparative epidemiology of zoosporic plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v. 122, p. 111-126, 2008.

JUDELSON, H. S.; BLANCO, F. A. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 47–58, 2005.

KASHIF, A. et al. Metabolic constituents of grapevine and grape derived products. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 357-378, 2010.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases-regulation and function. **Cellular and Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 8, p. 809-824, 2003.

KAUFFMANN, S. et al. Biological function of ‘pathogenesis-related’ proteins: four PR-proteins of tobacco have 1,3-b-glucanase activity. **The EMBO Journal**, v. 6, p. 3209-3212, 1987.

KAUSS, H.; JEBLICK, W.; DOMARD, A. The degree of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Cathalanthus roseus*. **Planta**, v. 178, p. 385-392, 1989.

KEHLENBECK, H.; SCHÖNBECK, F. Effects of induced resistance on disease severity/yield relations in mildewed barley. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 143, p. 561-567, 1995.

KIEFER, B. et al. The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. **Planta**, v. 215, p. 387–393, 2002.

KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M.; ZHANGS, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, v. 94, p. 1259–1266, 2004.

KOMBRINK, E.; SOMSSICH, I. E. Pathogenesis-related proteins and plant defense. In: CARROLL, G.; TUDZYNSKI, P. **The Mycota V, Part A**. Plant Relationships, Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 107-128.

KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 27, p. 887-900, 1997.

KUHN, J. O. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007. 140 f. Tese (doutorado)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2007.

LABANCA, E. R. G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. 2002. 118 f. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

LAGRIMINI, L. M. et al. The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 33, p. 887-895, 1997.

LAM, S. T.; GAFFNEY, T. D. Biological activities of bacteria used in plant pathogen control. In: CHET, I. **Biotechnology in plant disease control**. Wiley-Liss, 1993. p. 291-320.

LANGE, B. M.; LAPIERRE, C.; SANDERMANN, H. Elicitor induced spruce stress lignin. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1277-1287, 1995.

LEÃO, S. C. P. Breve histórico da vitivinicultura e a sua evolução na região semiárida brasileira. In: ACADEMIA PERNAMBUCANA DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS, 7., 2010, Recife. **Anais...Recife**, 2010. p. 81-85.

LEGRAND, M. et al. Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 4, p. 6750-6754, 1987.

LI, J.; ZINGEN-SELL, I.; BUCHENAUER, H. Induction of resistance of cotton plants to *Verticillium* wilt and of tomato plants to *Fusarium* wilt by  $\beta$ -aminobutyric acid and methyl jasmonate. **Journal of Plant Diseases and Plant Protection**, v. 103, p. 288-299, 1996.

LIMA, F. F. ***Bacillus subtilis* e níveis de nitrogênio sobre o desenvolvimento e a produtividade do milho**. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Piauí – Piauí, 2010.

LO, T. C. General mechanisms of action of microbial biocontrol agents. **Plant Pathology Bulletin**, v. 7, p. 155-166, 1998.

LORITO, M. et al. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Phytopathology**, v. 83, p. 302-307, 1993.

MAIA, J. A. et al. Ação de quitosana sobre o desenvolvimento de *Plasmopara viticola* e *Elsinoe ampelina*, *in vitro* e em videiras cv. Isabel. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 36, n. 3, p. 203-209, 2010.

MALOY, O. C. Plant Disease Control: Principles and Practice. In: MARKOVICH, N. A.; KONONOVA, G. L. **Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review**. Applied Biochemistry and Microbiology, New York, v. 39, p. 341-351, 1993.

MARKOVICH, N. A.; KONONOVA, G. L. Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 39, p. 341-351, 2003.

MATASCI, C. L. et al. Selection for fungicide resistance throughout a growing season in populations of *Plasmopara viticola*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, p. 79–83, 2008.

MAYER, A. H.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, v. 18, p. 193-215, 1979.

MCDOWELL, J. M.; WOFFENDEN, B. J. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. **Trends Biotechnology**, v. 21, p. 178–83, 2003.

MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura brasileira: Panorama 2012**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013, 5 p. (Comunicado Técnico, 137).

MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura mundial: principais países e posição do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2012, 8 p. (Comunicado Técnico, 121).

MENDES, C. S. **Flutuação de inóculo no ar, desenvolvimento e validação de um sistema de previsão do míldio da videira**. 2002. 123f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2002.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidases activities in susceptible and resistance wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, Amsterdam, v. 162, p. 491-498, 2002.

MONTIES, B. Lignins. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. **Methods in plant biochemistry**, New York: Academic Press, 1989. p. 113-158.

MOREIRA, R. R.; NESI, N. C.; DE MIO, M. L. L. *Bacillus* spp. and *Pseudomonas putida* as inhibitors of the *Colletotrichum acutatum* group and potential to control Glomerella leaf spot. **Biological Control**, v. 72, p. 30-37, 2014.

MYSORE, K. S.; RYU, C. M. Nonhost resistance: how much do we know? **Trends Plant Science**, v. 9, p. 97-104, 2004.

NASEBY, D. C. et al. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* population, soil microbial communities and soil enzyme activities. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 161-169, 2000.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review Phytopathology**, v. 30, p. 369-389, 1992.

NO, H. K.; MEYERS, S. P. Preparation of chitin and chitosan. In: MUZZARELLI, R. A. A.; PETER, M. G. *Chitin Handbook*. Grottammare: European Chitin Society, 1997. p. 475.

NOJOSA, G. B. A. et al. Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra mancha de *Phoma*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 1, p. 60-62, 2009.

NÜRNBERGER, T.; LIPKA, V. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, p. 335-345, 2005.

OKOT-KOTBER, M. et al. Activation of polyphenol oxidase in extracts of bran from several wheat (*Triticum aestivum*) cultivars using organic solvents, detergents, and chaotropes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2410-2417, 2002.

OLIVEIRA, J. E. M.; LOPES, P. R. C.; MOREIRA, A. N. Produção integrada no Vale do São Francisco: situação e perspectivas – a produção integrada de uvas como caso de sucesso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOSSANIDADE, 1., 2011, Jaboticabal. **Resumos...**Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 6-53.

PANSTRUGA, R.; DODDS, P. N. Terrific protein traffic: the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. **Science**, v. 324, p. 748-750, 2009.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, M. A. J.; FILHO, B. E. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 2011. cap. 35, p. 593-636.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, v. 1, 1995. p. 193-217.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p. 1-51, 1994.

PERAZZOLLI, M. et al. Downy mildew resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 in susceptible grapevines partially mimics transcriptional changes of resistant genotypes. **BMC Genomics**, v. 13, p. 1471-2164, 2012.

PERAZZOLLI, M. et al. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadizole. **Biological Control**, v. 47, p. 228-234, 2008.

PEREIRA, F. V. **Fosfitos no manejo do míldio da videira: eficácia e modo de ação**. 2009. 69 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

PODILE, A. R.; LAXMI, V. D. V.; MANJULA, K.; SAILAJA, P. R. *Bacillus subtilis* AF1 as biocontrol PGPR: Towards understanding survival and mechanism of action. In: ADHOLEGA, S.; SINGH, S. (Eds). **Mycorrhizae: Biofertilizers for the Future**. TERI, New Delhi. India, 1995. p. 506-509.

PONSTEIN, S. A. et al. A novel pathogen – and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. **Plant Physiology**, v. 104, p. 109-118, 1994.

PRIEST, F. G.; HARWOOD, C. R. *Bacillus* species. In: HUI, Y. H.; KHACHATOURIANS, G. G. **Food Biotechnology: microorganisms**. New York, 1994. p. 377- 421.

PRIEST, F. G. Isolation and identification of aerobic endospore-forming bacteria. In: HARWOOD, C. R. **Biotechnology Handbooks 2**. New York: Plenum Publishing Corporation, 1989. p. 27-56.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A.; MELO, L. M. R. A viticultura brasileira: realidade e perspectivas In: SIMPÓSIO MINEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 2002, Caldas. **Anais...** Caldas: EPAMIG, p. 17-32, 2002.

RAFTOYANNIS, Y.; DIC, M. W. Effects of inoculum density, plant age and temperature on disease severity caused by pythiaceous fungi on several plants. **Phytoparasitica**, v. 30, p. 67–76, 2002.

RAMAMOORTHY, V.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 429-441, 2002.

RESENDE, M. L. V. et al. Perspectivas da indução de resistência em cacauzeiros contra *Crinipellis pernicioso* através do benzotriazolozole (BTH). **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 149-156, 2000.

RYALS, J. et al. Signal transduction in systemic acquired resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 92, p. 4202–4205, 1995.

SAILAJA, P. R.; PODILE, A. R.; REDDANNA, P. Biocontrol strain *Bacillus subtilis* AF1 rapidly induces lipoxygenase in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared to crown rot pathogen *Aspergillus niger*. **European Journal Plant Pathology**, v. 104, p. 125–132, 1997.

SAMUEL, N.; HADAVI, N. *Trichoderma*: review of biology and systematics of de genus. **Journal of General Microbiology**, v. 100, p. 923-935, 1996.

SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, S. K. Nonhost resistance against bacterial pathogens: retrospectives and prospects. **Annual Review Phytopathology**, v. 51, p. 19.1-19.21, 2013.

SEQUEIRA, L. Lectins and their role in host-pathogen specificity. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v. 16, p. 453-481, 1978.

SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agentes. **Annual Review Phytopathology**, v. 48, p. 21-43, 2010.

SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: KUBICEK, C. P., HARMAN, G. E. (Ed.). **Trichoderma and Gliocladium**. v. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. London: Taylor and Francis Ltd., 1998. p. 139-191.

SLAUGHTER, R. A. et al. Beta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: involvement of pterostilbene. **European Journal of Plant Pathology**, v. 122, p. 185-195, 2008.

SOBRINHO, C. A.; FERREIRA, P. T. O.; CAVALCANTI, L. S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L. S. et. al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R.; JÚNIOR, A. G. **Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil**. Bento Gonçalves – Embrapa Uva e Vinho, p. 32, 2005. (Documentos, 56).

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, v. 38, p. 1565–1571, 1990.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agrária Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology**, v. 35, p. 235–70, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

THIPYAPONG, P.; HUNT, M. D.; STEFFENS, J.C. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, Berlin, v. 220, p. 105-117, 2004.

TROTEL-AZIZ, P. et al. Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 114, p. 405-413, 2006.

TROUVELOT, S. et al. A  $\beta$ -1, 3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 2, p. 232-243, 2008.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiology Plant**, v. 13, p. 43–50, 1991.

VAN LOON, L. C.; GLICK, G. R. Increased plant fitness by rhizobacteria. **Molecular Ecotoxicology of Plants**, v. 170, p. 177-205, 2004.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 85-97, 1999.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review Phytopathology**, v. 18, p. 259-288, 1980.

VAUGHN, K. C.; DUKE, S. O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 60, p. 106-112, 1984.

VINALE, F. et al. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1-10, 2008.

WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Microbial metabolites with biological activity against plant pathogens. In: LUMSDEN, R. D.; VAUGHN, J. L. **Pest Management: Biologically Based Technologies**. Washington: American Chemical Society, 1993. p. 173-180.

WESTPHALEN, S. L. **Caracterização das áreas bioclimáticas para o cultivo de *Vitis vinifera* L. nas regiões da Serra do Noroeste e Planalto do estado do Rio Grande do Sul**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2000. p. 99.

WIRTH, S. J.; WOLF, G. A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 12, p. 197-205, 1990.

WOO, S. L. et al. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. **Phytopathology**, v. 96, p. 181-85, 2006.

WOO, S.; LORITO, M. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: **Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management**. Springer Netherlands, 2007. p. 107-130.

XUE, L.; CHAREST, P. M.; JABAJI-HARE, S.H. Systemic induction of peroxidase,  $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. **Phytopathology**, Lancaster, v. 88, p. 359-365, 1998.

YAN, Z.; REDDY, M. S.; KLOEPPER, J. W. Survival and colonization of rhizobacteria in a tomato transplant system. **Canadian Journal Microbiology**, v. 49, p. 383-389, 2003.

YEDIDIA, I. et al. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. **Plant Physiology Biochemical**, v. 38, p. 863–873, 2000.

YORUK, R.; MARSHALL, R. M. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, p. 361-422, 2003.