

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

**ETIOLOGIA E CONTROLE BIOLÓGICO DA
DOENÇA PÉ-PRETO DA VIDEIRA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ricardo Feliciano dos Santos

Santa Maria, RS, Brasil

2014

ETIOLOGIA E CONTROLE BIOLÓGICO DA DOENÇA PÉ-PRETO DA VIDEIRA

Ricardo Feliciano dos Santos

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.

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Santos, Ricardo Feliciano dos
Etiologia e controle biológico da doença pé-preto da
videira / Ricardo Feliciano dos Santos.-2014.
94 p. ; 30cm

Orientadora: Elena Blume
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, RS, 2014

1. Vitis spp 2. Ilyonectria 3. Diversidade genética
4. Bacillus subtilis 5. Trichoderma I. Blume, Elena II.
Título.

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo autor.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Ricardo Feliciano dos Santos.

Endereço eletrônico: ricardofelicianodossantos@gmail.com

**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

**ETIOLOGIA E CONTROLE BIOLÓGICO DA DOENÇA PÉ-PRETO DA
VIDEIRA**

elaborada por
Ricardo Feliciano dos Santos

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Elena Blume, PhD.
(Presidente/orientador)

Lucas da Ressurreição Garrido, Dr. (Embrapa Uva e Vinho)

Maria Cecilia Nunes Farinha Rego, PhD. (ISA-UTL)

Santa Maria, 24 de janeiro de 2014.

Aos meus pais Vicente e Kátia, pela educação, confiança, ensinamentos, apoio e por terem sido exemplo de honestidade e perseverança. E ao irmão Rodrigo, avó Adelina e avô Diogo Feliciano dos Santos (*in memoriam*).

Dedico-lhes este trabalho

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela formação adquirida ao longo da graduação e oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro através da concessão da bolsa de mestrado.

À minha orientadora, professora PhD. Elena Blume pela amizade, auxílio e conhecimento transmitido durante anos.

À professora Dra. Marlove Fátima Brião Muniz pela ajuda prestada sempre que solicitada.

À pesquisadora PhD. Maria Cecilia Nunes Farinha Rego pela oportunidade de realização de estágio junto ao seu grupo de pesquisa no Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa. Esse estágio foi o primeiro passo na trajetória de estudos referentes à doença pé-preto da videira.

À professora Dra. Lia Rejane Silveira Reiniger e o Dr. Lucas da Ressureição Garrido, pela co-orientação e ajuda na realização deste trabalho.

À Renata Gava e Léo Carollo da Embrapa Uva e Vinho que auxiliaram nas coletas de plantas, bem como estudos posteriores.

Aos técnicos agrícolas e engenheiros agrônomos da EMATER-RS e Secretarias Municipais de Agricultura, que acompanharam as coletas nos vinhedos distribuídos nos 13 municípios.

Aos produtores rurais que receberam a equipe de coleta em seus vinhedos.

À banca examinadora, Maria Cecilia Nunes Farinha Rego, Lucas da Ressureição Garrido e Elena Blume, muito obrigado.

A toda minha grande família “Feliciano”, tios, tias, primos, primas e, especialmente, aos meus pais, Vicente e Kátia, meu irmão Rodrigo e minha avó Adelina, pela confiança, estímulo e apoio durante todo esse período.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria pelo auxílio na realização dos experimentos e pelo companheirismo durante os últimos seis anos de convivência diária.

Aos funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária.

Às empresas Itaforte Bio Produtos, Novozymes BioAg, Grupo Farroupilha, Empresa Caxiense de Controle Biológico Ltda e Grupo Biosoja pela doação dos produtos utilizados nos ensaios de controle biológico.

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

Muito obrigado.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Universidade Federal de Santa Maria

ETIOLOGIA E CONTROLE BIOLÓGICO DA DOENÇA PÉ-PRETO DA VIDEIRA

Autor: Ricardo Feliciano dos Santos

Orientadora: Elena Blume

Local da defesa e data: Santa Maria, 24 de janeiro de 2014.

A videira é uma das principais frutíferas cultivadas no mundo, sendo que diversos fatores podem afetar seu potencial de rendimento e longevidade, incluindo o ataque de patógenos. A partir da década de 90, a doença pé-preto da videira começou a preocupar viticultores e técnicos em várias locais do planeta onde a cultura é cultivada. Desde 1999, vem sendo observadas plantas com sintomas da doença no Brasil. Porém, pouco se conhece sobre essa enfermidade na região sul do país. Assim, este trabalho objetivou: 1) caracterizar isolados de *Ilyonectria* spp. e *Campylocarpon pseudofasciculare* associados à doença pé-preto, bem como estudar sua patogenicidade e 2) avaliar *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. no controle *in vitro* e *in vivo* de *Ilyonectria macrodidyma*. Para isso, plantas sintomáticas foram coletadas em vinhedos georreferenciados do Rio Grande do Sul. Isolamento do patógeno se deu a partir de fragmentos necrosados de raízes e colo para posteriores estudos de etiologia e patogenicidade. Foram realizados testes *in vitro* (metabólitos voláteis e pareamento de culturas) e *in vivo* (*Vitis vinifera* cv. Merlot enxertada em Paulsen 1103) para avaliar a eficiência de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp., obtidos de diferentes produtos comerciais no controle de *Ilyonectria macrodidyma*. O estudo de caracterização morfológica e análise multi-gene de três regiões (ITS, β -tubulina e histona H3) confirmaram a existência de *Ilyonectria macrodidyma*, *Ilyonectria robusta*, "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* e *Campylocarpon pseudofasciculare* associados à doença pé-preto. Todos os 20 isolados foram patogênicos a *Vitis labrusca* cv. Bordô, resultando em redução de massa de raízes e parte aérea, necrose no colo e raízes, lesões vasculares, murchamento de parte aérea e morte de plantas. *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. foram eficazes na inibição do crescimento micelial de *I. macrodidyma* através de testes de metabólitos voláteis e pareamento de culturas.

Palavras-chave: *Vitis* spp. *Ilyonectria*. Diversidade genética. *Bacillus subtilis*. *Trichoderma*.

ABSTRACT

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

ETIOLOGY AND BIOLOGICAL CONTROL OF BLACK FOOT DISEASE OF GRAPEVINE

Author: Ricardo Feliciano dos Santos

Adviser: Elena Blume

Place of the defense and date: Santa Maria, January 24th, 2014

Grapevines are one of the most cultivated fruits in the world, and many factors can affect its potential income and longevity, including pathogens attack. In 1990, black foot disease of grapevine began to worry producers and agronomists in various places of the planet where the crop was grown. Since 1999, plants with disease symptoms have been observed in Brazil. However, little is known about this disease in the southern region of the country. Thus, this study aimed to: 1) characterize isolates of the *Ilyonectria* spp. and *Campylocarpon pseudofasciculare* associated with black foot disease and study their pathogenicity; 2) evaluate *Bacillus subtilis* and *Trichoderma* spp. on the control *in vitro* and *in vivo* of *Ilyonectria macrodidyma*. For that, symptomatic plants were collected in georeferenced vineyards of Rio Grande do Sul. Isolation of the pathogen occurred from necrotic fragments of roots and crown for further study of the etiology and pathogenicity. *In vitro* tests (volatile metabolites and pairing of cultures) and *in vivo* (*Vitis vinifera* cv. Merlot grafted on Paulsen 1103) were performed to evaluate the control efficiency of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma* spp., obtained from different commercial products, over *Ilyonectria macrodidyma*. Morphological characterization and multi-gene analysis of three regions (ITS, β -tubulin and histone H3) confirmed the existence of *Ilyonectria macrodidyma*, *Ilyonectria robusta*, "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* and *Campylocarpon pseudofasciculare* associated with black foot disease. All 20 isolates were pathogenic to *Vitis labrusca* cv. Bordô, resulting in reduced mass of roots and shoots, roots and crown necrosis, vascular lesions, wilting of shoots and plant death. *Bacillus subtilis* and *Trichoderma* spp. were effective in inhibiting the mycelial growth of *I. macrodidyma* through volatile metabolites and pairing of culture tests.

Key-words: *Vitis* spp. *Ilyonectria*. Genetic diversity. *Bacillus subtilis*. *Trichoderma*.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 5

Table 1. List of isolates studied with collection details.....	51
Table 2. Damage degree of isolates of <i>Ilyonectria</i> spp. and “ <i>Cylindrocarpon</i> ” <i>pauciseptatum</i> in <i>Vitis labrusca</i> cv. Bordô.....	54

CAPÍTULO 6

Table 1. Details of the <i>Campylocarpon pseudofasciculare</i> isolates studied.	61
Table 2. Characteristics of the colonies, macroconidia and chlamydospore of <i>Campylocarpon pseudofasciculare</i> isolates pathogenic to <i>Vitis labrusca</i> cv. Bordô grown in PDA and SNA medium.	68
Table 3. Virulence of <i>Campylocarpon pseudofasciculare</i> isolates in <i>Vitis labrusca</i> cv. Bordô after 4 months of incubation in a greenhouse.....	69

CAPÍTULO 7

Tabela 1. Isolados de <i>Ilyonectria macrodidyma</i> utilizados neste estudo.	78
Tabela 2. Características dos sete produtos estudados.	79
Tabela 3. Inibição de crescimento micelial (%) de isolados de <i>Ilyonectria macrodidyma</i> expostos a metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Bacillus subtilis</i> <i>in vitro</i>	83
Tabela 4. Inibição do crescimento micelial (%) de isolados de <i>Ilyonectria macrodidyma</i> em cultivo pareado com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Bacillus subtilis</i> <i>in vitro</i>	84

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Sintomas da doença pé-preto em videira: A) ausência de brotação; B) murchamento repentino de parte aérea; C) vigor reduzido de parte aérea; D) corte transversal de uma raiz infectada mostrando escurecimento nos vasos do xilema e floema; E) necrose na base da muda; F) plantas à esquerda, inoculadas com *Ilyonectria macrodidyma*, apresentando redução de massa radicular e raízes enegrecidas se comparadas a plantas à direita, sem inoculação. ..22

CAPÍTULO 2

Figure 1. A-C) Symptoms observed during pathogenicity tests: A) left: inoculated plant; right: uninoculated plant; B) crown necrosis; C) internal necrosis; D) colony morphology of *Ilyonectria macrodidyma* on PDA; E) macroconidia; F) complex of conidiophores and macroconidia.37

Figure 2. Phylogenetic tree based on Neighbor-Joining analysis of sequences derived from regions: A) ITSrDNA; B) β -tubulin; C) Histone H3. Based on 1000 replicates of bootstrap by *Ilyonectria macrodidyma* from grapevine and sequences of the same genus obtained from GenBank.38

CAPÍTULO 3

Figure 1. A) Colony morphology of “*Cylindrocarpon*” *pauciseptatum* on PDA; B) macroconidia; C) symptoms observed in pathogenicity tests (left: uninoculated plant; right: inoculated plant).42

Figure 2. Phylogenetic tree based on Neighbor-Joining analysis of sequences derived from regions: A) ITS rDNA; B) β -tubulin; C) Histone H3 based on 1000 replicates of bootstrap by “*Cylindrocarpon*” *pauciseptatum* from grapevine and sequences of the same genus obtained from GenBank.43

CAPÍTULO 4

Figure 1. *Ilyonectria robusta* (Cy9UFSM): A) Simple conidiophores on aerial mycelium; B-D) chlamydospores on mycelium; E, F) macroconidia and microconidia; G) two-septate macroconidia; H) one-septate macroconidia. Bars = 10 μ m.47

Figure 2. Phylogenetic tree based on Neighbor-Joining analysis of sequences derived from regions histone H3 based on 1000 replicates of bootstrap by *Ilyonectria robusta* from grapevine and sequences of the same genus obtained from GenBank.47

CAPÍTULO 5

Figure 1. Symptoms of black foot disease in *Vitis labrusca* cv. Bordô: A) drying of shoots after inoculation with Cy8UFSM versus control; B) Root mass reduction after inoculation with Cy12UFSM versus control; C) crown necrosis after inoculation with Cy4UFSM versus control; D) necrosis of the leaf ribs after inoculation with Cy5UFSM.55

CAPÍTULO 6

Figure 1. Phylogenetic dendrogram designed for the *Campylocarpon pseudofasciculare* isolates pathogenic to grapevine according to the “neighbor-joining” statistical method derived from sequences of the ITS rDNA (A), β -tubulin (B) and histone H3 (C) regions and

based on 1,000 bootstrap replicates. The evolutionary distances were calculated using the Kimura 2-parameter model. The numbers associated with the branches represent the "bootstrap" numbers. 66

Figure 2. *Campylocarpon pseudofasciculare* (isolate Cy6UFSM): (A, F) simple conidiophore in aerial mycelium; (B) fascicles of branched conidiophores; (C, G) macroconidia; (D, E) chlamydoconidia in mycelium. Bars = 10 μ m. 67

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Lista dos isolados estudados	94
--	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
O cultivo de videira no Rio Grande do Sul	16
Doença pé-preto da videira	17
Etiologia.....	17
Sintomatologia.....	20
Epidemiologia.....	23
Controle	25
Referências Bibliográficas	27
CAPÍTULO 2. FIRST REPORT OF <i>Ilyonectria macrodidyma</i> ASSOCIATED WITH BLACK FOOT DISEASE OF GRAPEVINE IN BRAZIL	36
First Report	36
References	39
CAPÍTULO 3. FIRST REPORT OF “<i>Cylindrocarpon</i>” <i>pauciseptatum</i> ASSOCIATED WITH BLACK FOOT DISEASE OF GRAPEVINE IN BRAZIL	40
First Report	40
References	43
CAPÍTULO 4. FIRST REPORT OF <i>Ilyonectria robusta</i> ASSOCIATED WITH BLACK FOOT DISEASE OF GRAPEVINE IN SOUTHERN BRAZIL	45
First Report	45
References	47
CAPÍTULO 5. DAMAGE LEVELS OF <i>Ilyonectria</i> spp. AND “<i>Cylindrocarpon</i>” <i>pauciseptatum</i> ASSOCIATED WITH BLACK FOOT DISEASE OF GRAPEVINE	49
Abstract	49
Short Communication	49
References	55

CAPÍTULO 6. CHARACTERIZATION OF <i>Campylocarpon pseudofasciculare</i> ASSOCIATED WITH BLACK FOOT DISEASE OF GRAPEVINE IN SOUTHERN BRAZIL	59
Abstract	59
Introduction	59
Material and Methods	60
Isolates.....	60
Molecular characterization.....	61
Morphological characterization.....	62
Pathogenicity test	63
Results	64
Molecular characterization.....	64
Morphological characterization.....	66
Pathogenicity test	69
Discussion	70
Acknowledgments	71
Literature Cited	72
CAPÍTULO 7. <i>Trichoderma</i> spp. E <i>Bacillus subtilis</i> NO CONTROLE DE <i>Ilyonectria macrodidyma</i> EM VIDEIRA	75
Resumo	75
Introdução	76
Material e Métodos	77
Isolados de <i>Ilyonectria macrodidyma</i>	77
Produtos testados.....	78
Testes <i>in vitro</i>	79
Teste <i>in vivo</i>	81
Delineamento experimental e análise estatística.....	82
Resultados	82
Testes <i>in vitro</i>	82
Teste <i>in vivo</i>	84
Discussão	85
Referências	86
CAPÍTULO 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	91

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da videira apresenta grande importância à fruticultura brasileira. Sobretudo, na Serra Gaúcha, a cultura recebe destaque devido a toda cadeia vitivinícola instalada na região. Fatores bióticos e abióticos podem limitar a produção de videiras. Dentre os fatores bióticos, destacam-se as doenças que estão presentes nos diferentes estádios fenológicos da cultura. Desde a década de 90, doenças do lenho da videira, incluindo o pé-preto, começaram a aumentar a incidência e severidade nos viveiros e vinhedos em diversos países, incluindo o Brasil. A doença pé-preto afeta principalmente videiras jovens, nas quais se manifestam sintomas como vigor reduzido, atraso de brotações, lesões vasculares, necrose no colo e raízes, redução de massa de raízes, murchamento de parte aérea e morte de plantas, necessitando a substituição dessas nos vinhedos.

Recentemente, em nível mundial, diversos trabalhos foram publicados, além de vários em fase de desenvolvimento, para esclarecer questões sobre etiologia, epidemiologia e controle dessa doença. No Brasil, pouco se sabe sobre a variabilidade genética, características morfológicas e virulência de espécies fúngicas envolvidas nesse patossistema. Somado a isso, estudos englobando o controle biológico da doença pé-preto ainda são incipientes.

Baseado nas considerações acima, esta dissertação está estruturada em capítulos denominados a seguir: **Capítulo 1:** Revisão bibliográfica; **Capítulo 2:** First report of *Ilyonectria macrodidyma* associated with black foot disease of grapevine in Brazil; **Capítulo 3:** First report of “*Cylindrocarpon*” *pauciseptatum* associated with black foot disease of grapevine in Brazil; **Capítulo 4:** First report of *Ilyonectria robusta* associated with black foot disease of grapevine in southern Brazil; **Capítulo 5:** Damage levels of *Ilyonectria* spp. and “*Cylindrocarpon*” *pauciseptatum* associated with black foot disease of grapevine; **Capítulo 6:** Characterization of *Campylocarpon pseudofasciculare* associated with black foot disease of grapevine in southern Brazil; **Capítulo 7:** *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* no controle de *Ilyonectria macrodidyma* em videira; e **Capítulo 8:** Considerações finais. Informações referentes aos locais de coleta e isolados utilizados neste trabalho estão contidas no Apêndice 1.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O cultivo de videira no Rio Grande do Sul

A história da viticultura brasileira teve início com a chegada dos colonizadores portugueses, no século XVI. O cultivo teria se espalhado pelo território, mas em 1789, um decreto protecionista promulgado por Portugal proibiu o plantio de videiras na então Colônia, inibindo completamente a produção e comercialização de vinho. Permaneceu como cultura doméstica até o final do século XIX. A partir de 1875, com a chegada dos imigrantes italianos, principalmente na Serra Gaúcha, tornou-se uma atividade comercial (IBRAVIN, 2010), condicionada pelo isolamento geográfico em relação às principais regiões vitivinícolas do mundo, especialmente Europa e pressionada pelas condições ambientais, por vezes inadequadas ao cultivo de videira, principalmente de cultivares europeias (*Vitis vinifera* L.). Essa vitivinicultura pioneira se manteve até meados da década de 70, sem investimentos externos significativos e produzindo, quase que exclusivamente, uvas e elaborando derivados a partir de variedades americanas (*Vitis labrusca* L.) e híbridas interespecíficas (PROTAS; CAMARGO, 2011) em pequenos vinhedos e vinícolas com mão-de-obra basicamente familiar para consumo regionalizado.

A partir da década de 80, o panorama do setor vitivinicultor começou a ser modificado devido ao investimento de capital externo por meio de grupos empresariais, inicialmente na Serra Gaúcha e mais tarde na região da Campanha, com finalidade de produção de vinhos finos e espumantes (IBRAVIN, 2010; PROTAS; CAMARGO, 2011) voltados para comércio nacional e internacional. Nesses novos vinhedos destacam-se o uso de áreas propícias à mecanização e contratação de mão-de-obra.

No Brasil, em 2011, a cultura da videira ocupou área de 84.338 ha com produtividade de 18.284 kg (FAOSTAT, 2013). O maior volume de produção está concentrado no Rio Grande do Sul, representando 57,71% da produção nacional (MELLO, 2013). Embora a produção de vinhos, suco e derivados também ocorra em outros

estados, a maior concentração está no Rio Grande do Sul, onde são elaborados, em média anual, 579.309.020 de litros, representando 90% da produção nacional (MELLO, 2013).

Doença pé-preto da videira

A doença pé-preto juntamente com a doença de Petri, esca, podridão descendente, eutipiose e escoriose constitui as doenças do lenho da videira. As duas primeiras doenças também são conhecidas como declínio de videiras jovens. Em nível mundial, o interesse sobre as doenças do lenho da videira, incluindo o declínio de videiras jovens, começou a surgir como uma prioridade em 1998, tendo sido constituído o “International Council on Grapevine Trunk Diseases (ICGTD)”, com o propósito de estudar um conjunto de doenças que vinham a reduzir a produtividade e a longevidade das videiras, comprometendo a sua viabilidade econômica (CHIARAPPA, 2000). A doença pé-preto da videira também é conhecida por outros nomes na literatura internacional, como “pied noir” em francês (BADOUR, 1969) e “black foot”, termo em inglês proposto por Scheck et al. (1998b).

O primeiro relato da ocorrência de *Cylindrocarpon destructans* (Zinns.) Scholten associado à videira ocorreu na França, em 1961 (MALUTA; LARIGNON; 1991). Porém, o declínio de videiras jovens começou a ter maior importância a partir dos anos 90, disseminando-se por diversos países, principalmente em áreas onde as videiras antigas foram substituídas por novas plantações (REGO, 1994). No Brasil, o pé-preto começou a ser observado a partir de 1999 em municípios da Serra Gaúcha, afetando principalmente videiras americanas (GARRIDO et al., 2004).

Etiologia

O gênero *Cylindrocarpon* foi proposto, em 1913, por Wollenweber para anamorfos pertencentes à *Nectria* Fr. seção Willkommiales Wollenw. *Cylindrocarpon destructans* (anamorfo de *Neonectria radicola*) (Gerlach; L. Nilsson) Mantiri & Samuels, foi a primeira espécie relatada do gênero atuando sobre videiras na França, em 1961 (MALUTA; LARIGNON, 1991). Esse fungo foi originalmente descrito como *Ramularia destructans*

Zinssm. em ginseng (*Panax quinquefolius* L.) coletado nos Estados Unidos (ZINSSMEISTER, 1918). Desde então, *Cylindrocarpon destructans* foi relatado em diversos locais como: Itália (GRASSO, 1984), Portugal (REGO et al., 2000), Argentina (GATICA et al., 2001), Alemanha (FISCHER; KASSEMAYER, 2003), Pensilvânia (GUGINO; TRAVIS, 2003), Nova Zelândia e África do Sul (HALLEEN et al., 2004), Brasil (GARRIDO et al., 2004), Califórnia (PETIT; GUBLER, 2005) e Canadá (PETIT et al., 2011). A segunda espécie associada à doença foi *Cylindrocarpon obtusisporum* (Cooke & Harkn.) Wollew na Itália (GRASSO; MAGNANO DI SAN LIO, 1975) e Estados Unidos (SCHECK et al., 1998a). Até o início de 2000, *C. destructans* e *C. obtusisporum* eram considerados os únicos responsáveis pelo pé-preto da videira.

A taxonomia dos agentes causais do pé-preto da videira foi revista nos últimos anos por Halleen et al. (2004, 2006b). Halleen et al. (2004), revisando estudos de taxonomia e caracteres morfológicos de isolados obtidos de videiras da França, África do Sul, Nova Zelândia e Austrália identificaram a presença de *Cylindrocarpon macrodidymum* Schroers, Halleen & Crous, *Campylocarpon fasciculare* Schroers, Halleen & Crous e *Campylocarpon pseudofasciculare* Halleen, Schroers & Crous associados à doença. *C. macrodidymum* foi relatado desde então na Austrália, França, Nova Zelândia e África do Sul (HALLEEN et al., 2004), Califórnia (PETIT; GUBLER, 2005), Chile (AUGER et al., 2007), Espanha (ALANIZ et al., 2007), Uruguai (ABREO et al., 2010), Estados Unidos e Canadá (PETIT et al., 2011), Portugal (REGO et al., 2005) e Turquia (ÖZBEN et al., 2012). *Campylocarpon fasciculare* Schroers, Halleen & Crous já foi relatado na África do Sul (HALLEEN et al., 2004), Brasil (CORREIA et al., 2012) e Espanha (ALANIZ et al., 2011), e *Campylocarpon pseudofasciculare* também relatado na África do Sul (HALLEEN et al., 2004), Uruguai (ABREO et al., 2010), Brasil (CORREIA et al., 2012) e Peru (ÁLVAREZ et al., 2012). Halleen et al. (2006b) mencionaram a possibilidade de que *C. macrodidymum* tenha sido anteriormente identificado incorretamente como *C. obtusisporum*.

Halleen et al. (2006b) compararam isolados de *C. destructans* obtidos de videiras doentes da França, Portugal e África do Sul com outras espécies do gênero *Cylindrocarpon* obtidas de vários hospedeiros herbáceos e lenhosos. Os resultados revelaram que *C. destructans* e *C. liriodendri* tinham caracteres morfológicos, ITS e sequências parciais de β -tubulina idênticos. Dessa forma, todos os isolados de *C. destructans* oriundos de videira incluídos no estudo, foram re-identificados como *Cylindrocarpon liriodendri* J. D. MacDon. & E. E. Butler e *C. destructans* foi associado somente com podridão radicular de outras plantas herbáceas e lenhosas. *C. liriodendri* desde então foi relatado na França, Nova

Zelândia, Portugal e África do Sul (HALLEEN et al., 2006b), Austrália (WHITELAW-WECKERT et al., 2007), Califórnia (PETIT; GUBLER, 2007), Espanha (ALANIZ et al., 2007), Brasil (RUSSI et al., 2010), Irã (MOHAMMADI et al., 2009), Suíça (CASIERI et al., 2009), Uruguai (ABREO et al., 2010), Estados Unidos e Canadá (PETIT et al., 2011). De acordo com Petit et al. (2011), as espécies mais comumente encontradas em vinhedos nos mais diversos países são *C. macrodidymum* e *C. lirioidendri*.

Schroers et al. (2008), analisando isolados da Eslovênia e Nova Zelândia descreveram *Cylindrocarpon pauciseptatum* associado à sintomas típicos da doença pé-preto. Desde então, foi relatado no Uruguai (ABREO et al., 2010), Canadá (O'GORMAN; HAAG, 2011), Espanha (MARTIN et al., 2011) e Portugal (CABRAL et al., 2012a). Ainda não se conhece a fase teleomórfica de *C. pauciseptatum* (SCHROERS et al., 2008).

Mantiri et al. (2001) e Brayford et al. (2004) transferiram todos os representantes de *Nectria* com anamorfos *Cylindrocarpon*, para o gênero *Neonectria* Wollenw. A partir de estudos filogenéticos, *Neonectria* foi dividido em cinco gêneros baseados na combinação de caracteres ligados à anatomia peritecial e septação conidial: *Neonectria/Cylindrocarpon sensu stricto*, *Ilyonectria* P. Chaverri & C. Salgado, *Rugonectria* P. Chaverri & Samuels, *Thelonectria* P. Chaverri & C. Salgado e o gênero anamorfo *Campylocarpon* Halleen, Schroers & Crous. De acordo com isso, somente *Neonectria* apresenta *Cylindrocarpon* como anamorfo, enquanto que os gêneros restantes têm anamorfos semelhantes a *Cylindrocarpon* e, desde então, são referidos como "*Cylindrocarpon*" (CHAVERRI et al., 2011). De acordo com o Index Fungorum (2013), existem 142 espécies do gênero *Cylindrocarpon* e oito espécies para o gênero *Ilyonectria*. Estes números são subestimados porque várias espécies do gênero *Neonectria* ainda não foram transferidas para a nova nomenclatura *Ilyonectria*, proposta por Chaverri et al. (2011), e porque houve a descrição recente de novas espécies do gênero *Ilyonectria* por Cabral et al. (2012a; 2012b).

Devido à diversidade entre isolados caracterizados como *Ilyonectria macrodidyma* em diversas plantas hospedeiras, Cabral et al. (2012b) utilizaram análises multigênicas avaliando quatro regiões do DNA (ITS, β -tubulina, histona H3 e fator de alongação 1- α) para estudos de filogenia. Assim, foram definidas além de *I. macrodidyma* mais seis espécies (*Ilyonectria* sp. 1, *I. sp. 2*, *I. estremocensis* A. Cabral, Nascimento & Crous, *I. alcacerensis* A. Cabral, Oliveira & Crous, *I. novozelandica* A. Cabral & Crous e *I. torresensis* A. Cabral, Rego & Crous) que são morfologicamente semelhantes, sendo agrupadas no complexo *I. macrodidyma*. Dessas, apenas *Ilyonectria* sp. 1 não foi relatada em videira. Em outro estudo feito por Cabral et al. (2012a), analisando isolados do complexo *Ilyonectria radicularis*

obtidos de diferentes hospedeiros, foram descritas 12 novas espécies sendo, cinco novas espécies associadas ao pé-preto da videira: *Ilyonectria europaea* A. Cabral, Rego & Crous, *I. lusitanica* A. Cabral, Rego & Crous, *I. pseudodestructans* A. Cabral, Rego & Crous, *I. robusta* (A.A. Hildebr.) A. Cabral, Rego & Crous e *I. vitis* A. Cabral, Rego & Crous.

Recentemente, outro gênero fúngico foi relacionado aos agentes causais da doença pé-preto, descrito como *Cylindrocladiella* Boesew. Foram descritas duas espécies desse gênero, *Cylindrocladiella parva* (P. J. Anderson) Boesew., relatada na África do Sul (VAN COLLER et al., 2005), Nova Zelândia (JONES et al., 2012) e Espanha (AGUSTÍ-BRISACH et al., 2012) e *Cylindrocladiella peruviana* (Bat., J. L. Bezerra & M.P. Herrera) Boesew., também relatada na África do Sul (VAN COLLER et al., 2005), Peru (ÁLVAREZ et al., 2012) e Espanha (AGUSTÍ-BRISACH et al., 2012).

Além das espécies anteriormente mencionadas, no Uruguai também se verificou a presença de “*Cylindrocarpon*” *destructans* var. *crassum* (Wollenw.) C. Booth e “*C.*” *olidum* var. *crassum* Gerlach (ABREO et al., 2010) e no Canadá as espécies “*C.*” *didymum* (Harting) Wollenw. e espécies de *Neonectria mammoidea*-like (PETIT et al., 2011) associadas à doença.

Sintomatologia

Atualmente fungos causadores de doenças do lenho em videira têm sido estudados por grupos de pesquisas de diferentes países, sendo considerados entre os patógenos mais destrutivos do material de propagação vitícola ou vinhedos recém-implantados (GRAMAJE; ARMENGOL, 2011; OLIVEIRA et al., 2004). Segundo Halleen et al. (2006a), existem dois cenários em que ocorre o pé-preto. O primeiro, afetando viveiros de produção de mudas de videiras ou videiras jovens logo após o transplante, nas quais típicos sintomas de estrias vasculares são evidentes. O segundo cenário relata infecção de videiras com 2-10 anos de idade. Quando videiras jovens são infectadas, a morte ocorre rapidamente, mas em videiras mais velhas, a infecção resulta em um declínio gradual e a morte pode demorar mais de um ano (GUBLER et al., 2004).

A doença afeta principalmente videiras jovens, surgindo sintomas na parte aérea e sistema radicular. Garrido et al. (2004) relatam que videiras americanas (*Vitis labrusca*) com menos de cinco anos de idade apresentavam escurecimento na região do colo, redução do

vigor e do número de brotações, murchamento de parte aérea, declínio e morte de plantas (Figura 1). Plantas afetadas pela doença também manifestam vegetação escassa e clorose foliar (REGO et al., 2000). Além desses sintomas de parte aérea, o patógeno causa necrose nas raízes e porta-enxerto, bem como redução da biomassa radicular (HALLEEN et al., 2006a). Sheck et al. (1998a) também descrevem escurecimento do tecido vascular de videiras jovens com 2-5 anos de idade, na Califórnia. Garrido et al. (2004) observaram na região do colo da planta completo escurecimento interno, de coloração marrom escura a preta, diferindo dos sintomas da fusariose da videira (*Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *herbemontis* Tocchetto), que é restrita a região do xilema.

Estudos de seções de tecido sintomático revelaram que a maioria dos vasos do xilema apresentavam tiloses de paredes espessas ou goma marrom, e elementos do floema funcionais obstruídos com goma. Além disso, os sintomas abaixo do nível do solo incluem o desenvolvimento anormal de raízes caracterizado pelo crescimento superficial paralelo à superfície do solo (HALLEEN et al., 2006a). A partir do colo podem se desenvolver raízes secundárias acima do porta-enxerto, para compensar a perda de raízes funcionais (FOURIE et al., 2000 apud HALLEEN et al., 2006a; LARIGNON, 1999). Em Portugal, a incidência de pé-preto é relatada tanto em videiras viníferas como para produção de uva de mesa, enxertadas sobre diversos porta-enxertos (REGO et al., 2000). Em diversos países, a doença tem aumentado a incidência e severidade com o passar dos anos, resultando frequentemente em morte de plantas e forçando produtores a arrancar e replantar áreas consideráveis (CABRAL et al., 2012b).



Figura 1. Sintomas da doença pé-preto em videira: A) ausência de brotação; B) murchamento repentino de parte aérea; C) vigor reduzido de parte aérea; D) corte transversal de raízes infectadas mostrando escurecimento nos vasos do xilema e floema; E) necrose na base da muda; F) plantas à esquerda, inoculadas com *Ilyonectria macrodidyma*, apresentando redução de massa radicular e raízes enegrecidas se comparadas com plantas à direita, sem inoculação.

Epidemiologia

Os fungos do gênero “*Cylindrocarpon*” são habitantes do solo, necrotróficos, colonizadores radiculares ou patógenos frequentemente associados com raízes de plantas herbáceas e lenhosas (BRAYFORD, 1993). Agustí-Brisach et al. (2011), avaliando a presença de “*Cylindrocarpon*” *macrodidymum* em plantas daninhas coletadas em vinhedos do centro leste da Espanha, verificaram a presença do patógeno nas raízes de 15 das 19 famílias e 26 das 52 espécies analisadas. *Ilyonectria* (anamorfo: “*Cylindrocarpon*”) também já foi relatado como patógeno em oliveira (ÚRBEZ- TORRES et al., 2012), kiwi (ERPER et al., 2011, 2013) abacate (VITALE et al., 2012), milho e colza (MOHAMEDI et al., 2011), macieira (TEWOLDEMEDHIN et al., 2011) e flores da família Proteaceae (LOMBARD et al., 2013). De acordo com Brayford (1993), patógenos associados ao pé-preto são frequentemente parte de um complexo de doenças com outros fungos e nematóides.

“*Cylindrocarpon*” é encontrado desde as camadas superficiais do solo até maiores profundidades, podendo se desenvolver em baixas concentrações de oxigênio. Além disso, apresenta rápida germinação de esporos, rápido crescimento micelial e certas características fisiológicas, como a utilização de nitrogênio orgânico e inorgânico, aumentando sua capacidade competitiva (BRAYFORD, 1993). *Cylindrocarpon* sp. em baixa concentração de O₂ apresentou esporulação superior a maioria dos fungos avaliados durante a decomposição de folhas de amieiro, *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. (MEDEIROS et al., 2009), demonstrando seu potencial competitivo em ambientes saturados por água. Sobrevivem no solo na forma de clamidósporos que asseguram a permanência do patógeno por longo período (CHAVERRI et al., 2011; HALLEEN et al., 2004). “*Cylindrocarpon*” spp. apresentam grande adaptação, podendo serem encontrados desde regiões tropicais até temperadas (BRAYFORD, 1993; CHAVERRI et al., 2011).

O material de propagação vegetativa (porta-enxertos e enxertos-prontos) tem sido amplamente citado como importante veículo de disseminação dos patógenos responsáveis pelo declínio de videiras jovens (GUBLER et al., 2004; REGO et al., 2001). O processo de propagação e o solo também são importantes fontes de contaminação (AGUSTÍ-BRISACH et al. 2013a; 2013b; CARDOSO, 2011). Esses fungos produzem esporos envolvidos por uma massa mucilagenosa que são dispersos em água livre. Depois que entram em contato com a superfície radicular, os esporos germinam, as hifas penetram nas raízes e decompõem as células do córtex, reduzindo a absorção e subsequente transporte de nutrientes e água para

brotos e folhas, e fotossintatos para as raízes (CABRAL, 2011; PETIT et al., 2011). O ataque também pode ocorrer no porta-enxerto, para o qual os conídios são disseminados por salpicos de chuva e partículas de solo (BOOTH, 1967).

Na década de 50, Peterson (1958) estudou a influência do tipo de solo na população de fungos da rizosfera de plantas de trevo vermelho e trigo, verificando que existia uma diferença significativa quanto à proporção dos gêneros *Fusarium* spp. e *Cylindrocarpon* spp. entre solos arenosos ácidos e solos calcários alcalinos. Nos solos ácidos, verificou que havia predominância de espécies de *Fusarium* na superfície das raízes, enquanto que as espécies de *Cylindrocarpon* estavam praticamente ausentes. Nos solos calcários alcalinos as espécies de *Cylindrocarpon* eram predominantes e as de *Fusarium* eram raras. Em solos argilosos neutros, os fungos encontravam-se em proporção idêntica. Hassan et al. (2013), avaliando o pH na supressividade de *Ilyonectria radicum*, encontraram valores de produção de massa micelial em meio líquido batata dextrose tamponado significativamente maiores para pH 5 (5 g), do que a pH 7 (2,9 g). Estes autores observaram que as lesões apareceram mais precocemente em raízes feridas, 5 dias após a inoculação para pH 5 e 7, se comparadas com raízes sem ferimentos, nas quais as lesões apareceram aos 11 e 14 dias para pH 5 e 7, respectivamente. O pH 5 do solo resultou em maior severidade da doença, 57%, se comparado a 46% em pH 7.

Segundo Oliveira et al. (2004), fatores como o manejo adequado do solo, água, nutrientes e outras pragas é recomendado, a fim de melhorar a sanidade da videira e retardar uma eventual infecção e colonização por fungos causadores de declínio. Videiras podem ser afetadas por fatores abióticos, incluindo nutrição inadequada, teor de umidade, aeração e estrutura do solo (SCHECK et al., 1998b). Na França, os principais fatores associados com a ocorrência do pé-preto são excessiva compactação do solo e problemas de drenagem do solo (MALUTA; LARIGNON, 1991). As infecções são mais severas quando as plantas se encontram em solos pesados (argilosos) e úmidos (GUBLER et al., 2004). Probst et al. (2012) também destacam outros fatores de estresse, como o armazenamento do material propagativo em baixas temperaturas e presença de *Phaeoconiella chlamydospora* W. Gams, Crous, M. J. Wingfield & L. Mugnai, contribuindo com o aumento da incidência e severidade da doença. Os elementos minerais também são fatores que predisõem a planta às doenças. Segundo Zambolim et al. (2001), dentro do triângulo que determina a ocorrência da doença, os nutrientes podem afetar o hospedeiro, predispondo as plantas ao ataque dos patógenos, induzindo resistência ou tolerância à planta hospedeira, interferindo no nível de severidade das doenças e afetando o ambiente que tanto pode favorecer como desfavorecer os patógenos.

A atual legislação portuguesa (Decreto-Lei n.º 194/2006) torna necessária a rotação de culturas em viveiros de videiras, onde são necessários no mínimo três anos sem cultivo da mesma, visando diminuir a pressão de inóculo e contribuindo para a redução de infecções por *Ilyonectria-complex*. Durante esse período geralmente são cultivadas olerícolas.

Controle

No Brasil, tanto videiras de pé-franco quanto enxertadas têm se mostrado suscetíveis ao patógeno, o que tem dificultado o direcionamento das pesquisas. Somado a isso, tem sido recomendada a utilização do porta-enxerto VR 043-43 para áreas contaminadas pela pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis* Hempel), por se mostrar mais resistente do que outras cultivares plantadas, como Paulsen 1103 e 101-14. Entretanto, o porta-enxerto VR 043-43 tem se mostrado extremamente suscetível à “*Cylindrocarpon*” *destructans*, morrendo em pouco tempo depois de transplantado em solos contaminados com o patógeno (RASERA, 2005).

Nos últimos anos, foram realizados trabalhos envolvendo diferentes formas de controle desses fungos. Resultados promissores foram encontrados por Gramaje et al. (2010) avaliando tratamentos com água quente no controle de *I. macrodidyma* e *I. liriodendri*. Para *Ilyonectria* spp., a germinação conidial foi inibida em tratamentos acima de 45 °C por 45 min, enquanto tratamentos acima de 48 °C por 45 min foram necessários para inibir o crescimento micelial. Resultados *in vitro* obtidos por Halleen et al. (2007) revelaram que os ingredientes ativos obtidos de fungicidas químicos “prochloraz manganese chloride” e benomyl foram eficazes na inibição do crescimento micelial de “*Cylindrocarpon*” e *Campylocarpon*, enquanto que fusilazol e imazalil foram altamente eficazes somente contra “*Cylindrocarpon*” spp.

Gubler et al. (2004) relataram que os porta-enxertos *Vitis riparia* Mchx “039-16” e Freedom apresentavam certo nível de resistência a “*C.*” *destructans*. No entanto, Alaniz et al. (2010) e Jaspers et al. (2007) avaliaram a suscetibilidade/resistência de diversos porta-enxertos na Espanha e Nova Zelândia, respectivamente. Os resultados de ambos os trabalhos mostraram a manifestação da doença em diferentes níveis nos materiais avaliados, porém foram observados sintomas da doença em todos os materiais.

Uma estratégia para o controle dessa doença é o uso do controle biológico, sendo espécies do gênero *Trichoderma* Persoon amplamente utilizadas na agricultura, uma vez que

são capazes de atuarem como agentes de biocontrole de doenças de várias plantas cultivadas, promotores de crescimento, promoverem tolerância ao estresse através do aumento de raiz e desenvolvimento da planta e indutores de resistência de plantas a doenças (HARMAN, 2000). *Trichoderma harzianum* Rifai, tem sido relatado com agente potencial de biocontrole de fungos causadores de doenças do lenho em videira, incluindo *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium* W. Gams, Crous & M. J. Wingfield, “*Cylindrocarpon*”, *Botryosphaeria* Ces. & De Not. e *Phomopsis* Sacc. (FOURIE et al., 2001; FOURIE; HALLEEN, 2006). Em videira, *Trichoderma* spp. foi estudado como agente protetor de feridas da poda contra patógenos do lenho (HALLEEN et al, 2010; KOTZE et al., 2011; MUTAWILA et al., 2011), indução de resistência sistêmica contra *Plasmopara viticola* (Berk. & M. A. Curtis) Berl. & De Toni (PERAZZOLLI et al., 2008). Além de *Trichoderma*, *Gliocladium* Corda, *Bacillus* Cohn, *Pseudomonas* Migula e *Streptomyces* Waksman & Henrici são os agentes de biocontrole mais efetivos (SUSI et al., 2011). Petit e Gubler (2006) indicaram que as videiras inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares, *Glomus intraradices* N. C. Schenck & G. S. Sm. eram menos suscetíveis à doença pé-preto, do que plantas sem a presença da micorriza.

O gênero *Bacillus* é formado por bactérias em forma de bastonete, gram positivas, móveis (LIMA, 2010), também denominadas bactérias esporulantes devido a produção de estruturas de resistência, denominadas endósporos. Karimi et al. (2012), avaliando isolados de *Bacillus* e *Pseudomonas* no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Padwick) Sato & Matuo em grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), encontraram valores que comprovam a promoção de crescimento das plantas e potencial de biocontrole do patógeno. Zongzheng et al. (2010), inoculando plântulas de berinjela com *Bacillus subtilis* Cohn, verificaram aumento na tendência de brotação (quantidade de plântulas no terceiro dia), porcentagem de germinação final, índice de germinação e índice de vigor de sementes na ordem de 24, 24, 35 e 64%, respectivamente, se comparadas ao tratamento sem inoculação. Fu et al. (2010), avaliando 836 cepas de bactérias isoladas da rizosfera de ginseng encontrou 10 cepas com forte atividade de antibiose a “*Cylindrocarpon*” *destructans*. Em videira, *Bacillus subtilis* apresentou resultados positivos no controle de *Fusarium oxysporum* Schlecht e *Rhizoctonia solani* Kühn, reduzindo a incidência de podridões radiculares e aumentando a atividade de enzimas oxidativas, peroxidase e polifenol oxidase sob condições de infestação do solo com fungo patogênico, se comparado aos outros tratamentos (ZIEDAN et al., 2005).

Referências Bibliográficas

ABREO, E. et al. Morphological and molecular characterisation of *Campylocarpon* and *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot disease of grapevines in Uruguay. **Australasian Plant Pathology**, v. 39, p. 446-452, 2010.

AGUSTÍ-BRISACH, C. et al. Evaluation of vineyard weeds as potential hosts of black-foot and Petri disease pathogens. **Plant Disease**, v. 95, n. 7, p. 803-810, 2011.

AGUSTÍ-BRISACH, C. et al. First Report of *Cylindrocladiella parva* and *C. peruviana* associated with black-foot disease of grapevine in Spain. **Plant Disease**, v. 96, n. 9, p. 1381-1381, 2012.

AGUSTÍ-BRISACH, C. et al. Detection of black-foot and Petri disease pathogens in soils of grapevine nurseries and vineyards using bait plants. **Plant and Soil**, v. 364, n. 12, p. 5-13, 2013a.

AGUSTÍ-BRISACH, C. et al. Detection of black-foot disease pathogens in the grapevine nursery propagation process in Spain. **European Journal of Plant Pathology**, v. 137, n. 1, p. 103-112, 2013b.

ALANIZ, S. et al. Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black foot disease of grapevine in Spain. **Plant Disease**, v. 91, n. 9, 1187-1193, 2007.

ALANIZ, S. et al. Susceptibility of grapevine rootstocks to *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum*. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 3, p. 305-308, 2010.

ALANIZ, S. et al. First report of *Campylocarpon fasciculare* causing black foot disease of grapevine in Spain. **Plant Disease**, v. 95, n. 8, p. 1028, 2011.

ÁLVAREZ, L. A. et al. Occurrence of grapevine trunk pathogens in nurseries and vineyards in the northern and southern coast of Peru. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 51, p. 425, 2012.

AUGER, J.; ESTERIO, M.; PEREZ, I. First report of black foot disease of grapevine caused by *Cylindrocarpon macrodidymum* in Chile. **Plant Disease**, v. 91, n. 4, p. 470, 2007.

BADOUR, C. Gangrène ou Pied noir. **Le Vigneron Champenois**, v. 5, p. 197-201, 1969.

BOOTH, C. *Nectria radicicola*. **IMI Descriptions of fungi and bacteria**, v.15, p. 148, 1967.

BRAYFORD, D. *Cylindrocarpon*. In: **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. APS Press, St. Paul, Minnesota. 1993, p. 103-106.

BRAYFORD, D. et al. *Neonectria* and *Cylindrocarpon*: the *Nectria mammoidea* group and species lacking microconidia. **Mycologia**, v. 96, n. 3, p. 572-597, 2004.

CABRAL, A. C. G. P. **New insights in *Ilyonectria* black foot disease of grapevine**. 2011. 252 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agronómica)- Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

CABRAL, A. et al. *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicicola* species complex. **Mycological Progress**, v. 11, n. 3, p. 655-688, 2012a.

CABRAL, A. et al. Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. **Fungal Biology**, v. 116, n. 1, p. 62-80, 2012b.

CARDOSO, M. N. **Detecção de fungos do género *Ilyonectria* em viveiro vitícola**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agronómica)- Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

CASIERI, L. et al. Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 48, n. 1, p.73-83, 2009.

CHAVERRI, P. et al. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. **Studies in Mycology**, v. 68, p. 57-78, 2011.

CHIARAPPA, L. Esca (black measles) of grapevine. An overview. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 39, n. 1, p. 11-15, 2000.

CORREIA, K. C. et al. Fungal species associated with trunk diseases of table grapes in Northeastern Brazil. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 51, p. 427, 2012

DECRETO-LEI n.º 194/2006 de 27 de Setembro. 2006. Diário da República I Série - n.º 187. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

ERPER, I. et al. First report of *Cylindrocarpon liriodendri* on kiwifruit in Turkey. **Plant Disease**, v. 95, n. 1, p. 76, 2011.

ERPER, I. et al. Characterization of root rot disease of kiwifruit in the Black Sea region of Turkey. **European Journal of Plant Pathology**, v. 136, n. 2, p. 291–300, 2013.

FAOSTAT. STATISTIC DIVISION OF FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>>. Acesso em: 16 ago. 2013.

FISCHER, M.; KASSEMEYER, H. H. Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. **Vitis**, v. 42, n. 3, p. 109-116, 2003.

FOURIE, P. H. et al. Effect of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery grapevines. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 40, n. 3, p. 473-78, 2001.

FOURIE, P. H.; HALLEEN, F. Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v. 116, n.4, p. 255-265, 2006.

FU, J. et al. Isolation screening and identification of antagonistic bacteria against ginseng rusted root disease. **Journal of Jilin Agricultural University**, v. 32, n. 2, p. 136-139, 2010.

GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R.; URBEN, A. F. *Cylindrocarpon destructans* causador do “pé-preto” da videira no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 548-550, 2004.

GATICA, M. et al. *Phaeoacremonium* species and *Phaeomoniella chlamydospora* in vines showing “hoja de malvón” and young vine decline symptoms in Argentina. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 40, n.3, p. 317–324, 2001.

GRAMAJE, D. et al. Effect of hot-water treatments *in vitro* on conidial germination and mycelial growth of grapevine trunk pathogens. **Annals of Applied Biology**, v. 156, n. 2, p. 231-241, 2010.

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

GRASSO, S.; MAGNANO DI SAN LIO, G. Infezioni di *Cylindrocarpon obtusisporum* su piante di vite in Sicilia. **Vitis**, v. 14, p. 38-39, 1975.

GRASSO, S. Infezioni di *Fusarium oxysporum* e di *Cylindrocarpon destructans* associate a una moria di giovani piante di vite in Sicilia. **Informatore Fitopatologico**, v. 1, p. 59-63, 1984.

GUBLER, W. D. et al. Root diseases of grapevines in California and their control. **Australasian Plant Pathology**, v. 33, n. 2, p. 157-165, 2004.

GUGINO, B. K.; TRAVIS, J. W. Suppression of *Cylindrocarpon destructans* utilising composted soil amendments. **Phytopathology**, 93 (Supplement): 31, 2003.

HALLEEN, F. et al. Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). **Studies in Mycology**, v. 50, p. 431-455, 2004.

HALLEEN, F.; FOURIE, P. H.; CROUS, P. W. A review of black foot disease of grapevine. **Phytopatologia Mediterranea**, v. 45, p. 55-67, 2006a.

HALLEEN, F. et al. *Neonectria liriondendri* sp. nov., the main causal agent of black foot diseases of grapevines. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 227-234, 2006b.

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

HALLEEN, F.; FOURIE, P. H.; LOMBARD, P. J. Protection of Grapevine Pruning Wounds against *Eutypa lata* by Biological and Chemical Methods. **South African Journal for Enology and Viticulture**, v. 31, n. 2, p. 125-132, 2010.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, n. 4, p. 377-393, 2000.

HASSAN, W. A.; HALEEM, R. A.; SAIDO, K. A. Development and suppression of grapevine black foot caused by *Ilyonectria radicola*. **eSci Journal of Plant Pathology**, v. 2, n. 1, p. 25-31, 2013.

IBRAVIN. INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. **A Viticultura Brasileira**. Bento Gonçalves, 2010. Disponível em : <<http://www.ibravin.org.br/brasilvitivinicola.php>>. Acesso em: 15 ago. 2013.

INDEX FUNGORUM. Disponível em : <<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>>. Acesso em: 12 ago. 2013.

JASPERS, M. V. et al. Susceptibility of grapevine rootstocks to *Cylindrocarpon* disease. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 46, p. 114, 2007.

JONES, E. E. et al. First report of *Cylindrocladiella parva* as a grapevine pathogen in New Zealand. **Plant Disease**, v. 96, n.1, p. 144, 2012.

KARIMI, K. et al. Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. against *Fusarium* wilt of chickpea. **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, n. 4, p. 695, 2012.

KOTZE, C. et al. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 50, p. 247-263, 2011.

LARIGNON, P. **Black foot disease in France**. In: MORTON, L. Black Goo: Symptoms and Occurrence of Grape Declines. Fort Valley: Ed International Ampelography Society, 1999. p. 89-90.

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 – PI, 2010.

MELLO, L. M. R. Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2012. **Comunicado Técnico Embrapa**, n. 137, 2013.

LOMBARD, L. et al. *Ilyonectria* black foot rot associated with Proteaceae. **Australasian Plant Pathology**, v. 42, n. 3, p. 337–349, 2013.

MALUTA, D. R.; LARIGNON, P. Pied-noir: mieux vaut prévenir. **Viticulture**, v. 11, p. 71-72, 1991.

MANTIRI, F. R. Phylogenetic relationships in *Neonectria* species having *Cylindrocarpon* anamorphs inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Canadian Journal of Botany**, v. 79, n. 3, p. 334-340, 2001.

MARTIN, M. T. et al. First report of *Cylindrocarpon pauciseptatum* associated with grapevine decline from Castilla y Leon, Spain. **Plant Disease**, v. 95, n. 3, p. 361, 2011.

MEDEIROS, A. O.; PASCOAL, C.; GRAÇA, M. A. S. Diversity and activity of aquatic fungi under low oxygen conditions. **Freshwater Biology**, v. 54, n. 1, p. 142-149, 2009.

MOHAMMADI, H. et al. Characterization of *Cylindrocarpon liriodendri* associated with black foot disease of grapevine in Iran. **Journal of Phytopathology**, v. 157, n. 10, p. 642-645, 2009.

MOHAMEDI, M. et al. Study of the *Cylindrocarpon* species associated with corn and canola crown and root rot in Khuzestan province. **Iranian Journal of Plant Pathology**; v. 47, n. 4, p. 113-115, 2011.

MUTAWILA, C. et al. Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 50, p. 264-276, 2011.

O'GORMAN, D. T.; HAAG, P. Trunk diseases of wine grapes in Okanagan Valley. Canadian plant disease survey. **The Canadian Phytopathological Society**, v. 91, p. 152-154, 2011.

OLIVEIRA, H.; REGO, C.; NASCIMENTO, T. Decline of young grapevines caused by fungi. **Acta Horticulturae**, v. 652, p. 295-304, 2004.

ÖZBEN, S. et al. First report of *Cylindrocarpon macrodidymum* associated with black foot disease of grapevine in Turkey. **Plant Disease**, v. 96, n. 5, p. 762, 2012.

PERAZZOLLI, M. et al. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. **Biological Control**, v. 47, n. 2, p. 228-234, 2008.

PETERSON, E. A. Observations of fungi associated with plant roots. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 4, p. 257-265, 1958.

PETIT, E.; GUBLER, W. D. Characterization of *Cylindrocarpon* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. **Plant Disease**, v. 89, n. 10, p. 1051-1059, 2005.

PETIT, E.; GUBLER, W. D. Influence of *Glomus intraradices* on black foot disease caused by *Cylindrocarpon macrodidymum* on *Vitis rupestris* under controlled conditions. **Plant Disease**, v. 90, n. 12, p. 1481–1484, 2006.

PETIT, E.; GUBLER, W. D. First report of *Cylindrocarpon liriiodendri* causing black foot disease in California. **Plant Disease**, v. 91, n. 8, p. 1060, 2007.

PETIT, E. et al. *Cylindrocarpon* species associated with black-foot of grapevine in northeastern United States and southeastern Canada. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 62, n. 2, p. 177–183, 2011.

PROBST, C. et al. *Cylindrocarpon* black foot in nurseries - two factors that can increase infection. **Australasian Plant Pathology**, v. 41, n. 2, p. 157-163, 2012.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. Vitivinicultura brasileira: panorama setorial de 2010. **IBRAVIN: Embrapa Uva e Vinho. Brasília-DF**, 2011. 110 p.

RASERA, N. G. **Análise da variabilidade genética de *Cylindrocarpon* spp., associados ao pé-preto da videira, com marcadores RAPD**. 2005. 25 f. Trabalho de estágio (Conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Viticultura e Enologia. Centro Federal de Educação)-Tecnológica de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, 2005.

REGO, C. **Nova e grave micose da videira em Portugal. Agente responsável: *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholten**. Lisboa: Laboratório de Patologia Vegetal “Veríssimo de Almeida”, 1994. 4 p. (Documentos, 67).

REGO, C. et al. Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 39, n. 1, p. 76-79, 2000.

REGO, C. et al. Fungi associated with young vine decline in Portugal: results of nine years surveys. **IOBC wprs Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 123, 2005.

REGO, C.; NASCIMENTO, T.; OLIVEIRA, H. Characterization of *Cylindrocarpon destructans* isolates from grapevine in Portugal. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 40: p. 343-350, 2001.

RUSSI, A. et al. Study of the genetic variability of Brazilian populations of *Cylindrocarpon* spp., causal agent of grapevine black foot. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 49, p. 111-112, 2010.

SCHECK, H. J.; VASQUEZ, S. J.; GUBLER, W. D. First report of black-foot disease, caused by *Cylindrocarpon obtusisporum*, of grapevine in California. **Plant Disease**, v. 82, p. 448, 1998a.

SCHECK, H. J. et al. Grape growers report losses to black-foot and grapevine decline. **California Agriculture**, v. 52, p. 19-23, 1998b.

SCHROERS, H. J. et al. *Cylindrocarpon pauciseptatum* sp. nov., with notes on *Cylindrocarpon* species with wide, predominantly 3-septate macroconidia. **Mycological Research**, v. 112, p. 82-92, 2008.

SUSI, P. et al. Biological control of wood decay against fungal infection. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 7, p. 1681-1689, 2011.

TEWOLDEMEDHIN, Y. T, et al. *Cylindrocarpon* species associated with apple tree roots in South Africa and their quantification using real-time PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v. 129, p. 637-651, 2011.

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; PEDUTO, F.; GUBLER, W. D. First report of *Ilyonectria macrodidyma* causing root rot of olive trees (*Olea europaea*) in California. **Plant Disease**, v. 96, n. 9, p. 1378, 2012.

VAN COLLER, G. J. et al. Characterisation and pathogenicity of *Cylindrocladiella* spp. associated with root and cutting rot symptoms of grapevines in nurseries. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, p. 489-498, 2005.

VITALE, A., et al. First report of root rot caused by *Ilyonectria* (= *Neonectria*) *macrodidyma* on Avocado (*Persea americana*) in Italy. **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 3, p. 156-159, 2012.

WHITELAW-WECKERD, M. A. et al. Root infection of *Vitis vinifera* by *Cylindrocarpon liriodendri* in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 36, p. 403-406, 2007.

WOLLENWEBER, H. W. *Ramularia*, *Mycosphaerella*, *Nectria*, *Calonectria*. **Phytopathology**, v. 3, p. 197-242, 1913.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; VALE, F. X. R. do. Efeito da nutrição mineral sobre doenças de plantas causadas por patógenos de solo. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo integrado fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Viçosa: UFV, 2001. p. 347-403.

ZIEDAN, E. H. et al. Biological control of grapevine root-rot by antagonistic microorganisms. **African Journal of Mycology and Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 19-36, 2005.

ZINSSMEISTER C. L. *Ramularia* root-rots of ginseng. **Phytopathology**, v. 8, p.557, 1918.

ZONGZHENG, Y. et al. Effect of *Bacillus subtilis* SY1 on antifungal activity and plant growth. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 2, n. 4, p. 55-61, 2010.

CAPÍTULO 2

FIRST REPORT OF *Ilyonectria macrodidyma* ASSOCIATED WITH BLACK FOOT DISEASE OF GRAPEVINE IN BRAZIL

Plant Disease (2014): Publicado - doi.org/10.1094/PDIS-04-13-0424-PDN

FIRST REPORT

Cultivated grapevine (*Vitis labrusca* and *Vitis vinifera*) is of considerable economic importance to the Brazilian fruit industry for both fresh market consumption and for the production of wines, sparklings and juices. Black foot disease is caused by fungi of the genera *Ilyonectria* P. Chaverri & C. Salgado (anamorph: “*Cylindrocarpon*” Wollew.), *Campylocarpon* Halleen, Schroers & Crous and *Cylindrocladiella* Boesew. In 2012, 4 to 40-year-old grapevines (*Vitis* spp.) showing reduced vigor, vascular lesions, necrotic root lesions, delayed budding, vine decline and death were collected from seven locations at Rio Grande do Sul state, Brazil. Fungal isolations were made from root fragments and crown lesions (at least 2 cm above the bottom) on potato dextrose agar (PDA) medium added with 0.5 g L⁻¹ streptomycin sulfate. Eight isolates were obtained and identified on the basis of morphological features and multi-gene analysis (rDNA-ITS, β -tubulin and histone H3) as *Ilyonectria macrodidyma* (Halleen, Schroers & Crous) P. Chaverri & C. Salgado. One representative isolate (Cy5UFMSM) was used for more detailed morphological and molecular characterization, and pathogenicity confirmation. When incubated in the dark at 20 °C for 7-10 days, colonies of felty straw colored mycelium (5) and 4.79 cm diameter on average were observed. No sporodochia or other fruiting bodies were produced on carnation leaf agar (CLA) medium (2) after 30 days. Microconidia produced, after five weeks, on spezieller nährstoffarmer agar (SNA) medium with addition of two pieces of 1 cm² filter paper showed ovoid and ellipsoid shape (6.4 x 3.6 μ m) and one-septate macroconidia (17.3 x 4.1 μ m). To confirm the specie, primer pairs ITS1 and ITS4 (6); Bt2a and Bt2b; and H3-1a and H3-1b (4)

were used to amplify the ITS1-5.8S rRNA-ITS2, part of the β -tubulin and histone H3 genes, respectively. Sequences of these three regions showed 99, 100 and 100% of homology with *I. macrodidyma*, respectively. To confirm pathogenicity, four-month-old rooted cuttings of *Vitis labrusca* cv. Bordô, were inoculated by immersing them in a conidial suspension of the isolate (10^6 conidia mL^{-1}) for 60 min (3). Thirty days later inoculation was performed again by drenching the crown with 40 mL of 10^6 conidia mL^{-1} suspension to ensure infection of the roots (1). In the control treatment, the plants were inoculated with sterile distilled water. Plants inoculated with *I. macrodidyma* showed necrosis of the leaf ribs, reduction in root mass, roots and crown necrosis, browning of vessels, drying of shoots and death. *Ilyonectria macrodidyma* was re-isolated from the crown necrosis and vascular lesions confirming the Koch's postulates. To our knowledge this is the first report of *I. macrodidyma* associated with black foot disease of grapevine in Brazil, which poses considerable threat to the industry unless management options are realized.

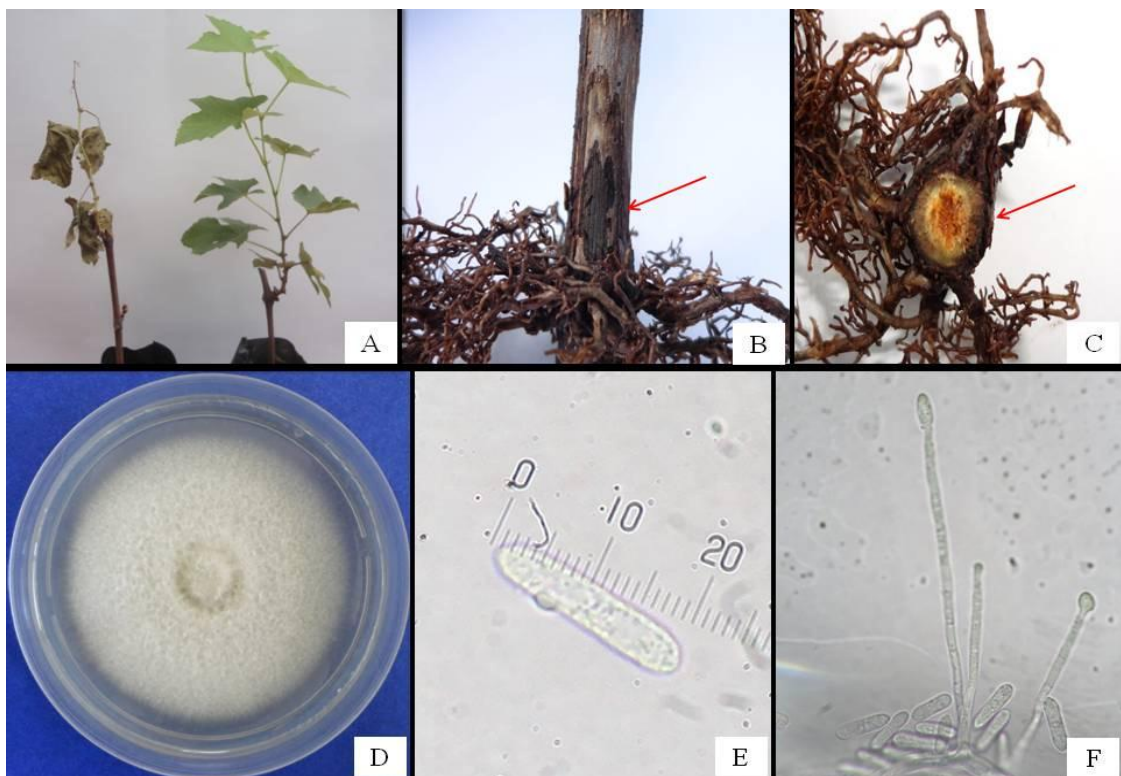


Figure 1. A-C) Symptoms observed during pathogenicity tests: A) left: inoculated plant; right: uninoculated plant; B) crown necrosis; C) internal necrosis; D) colony morphology of *Ilyonectria macrodidyma* on PDA; E) macroconidia; F) complex of conidiophores and macroconidia.

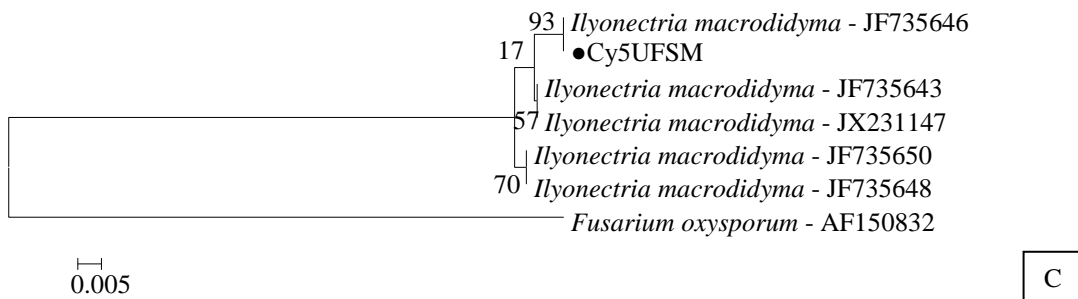
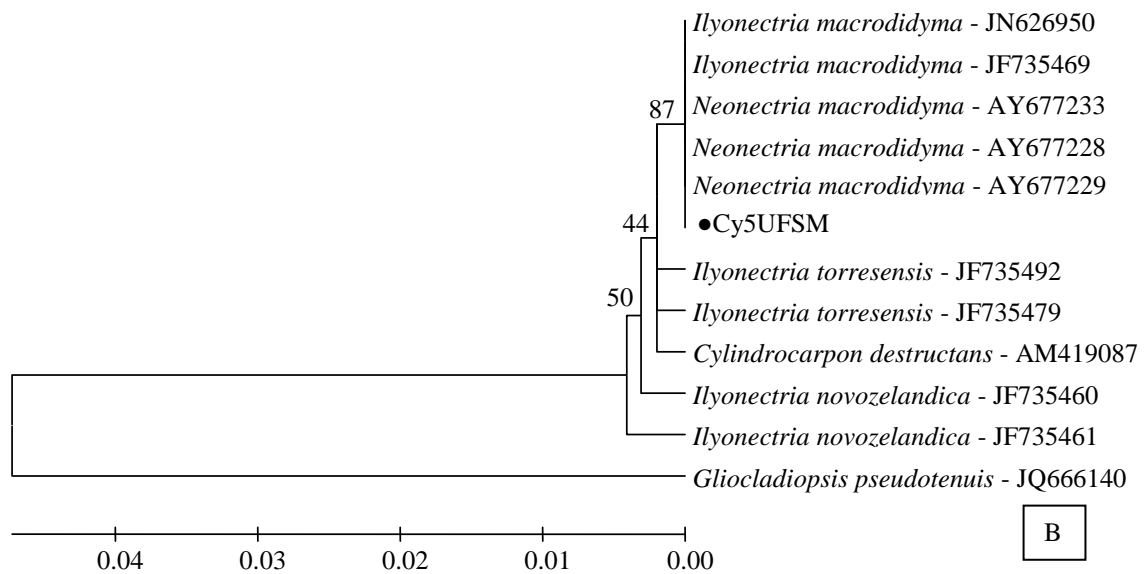
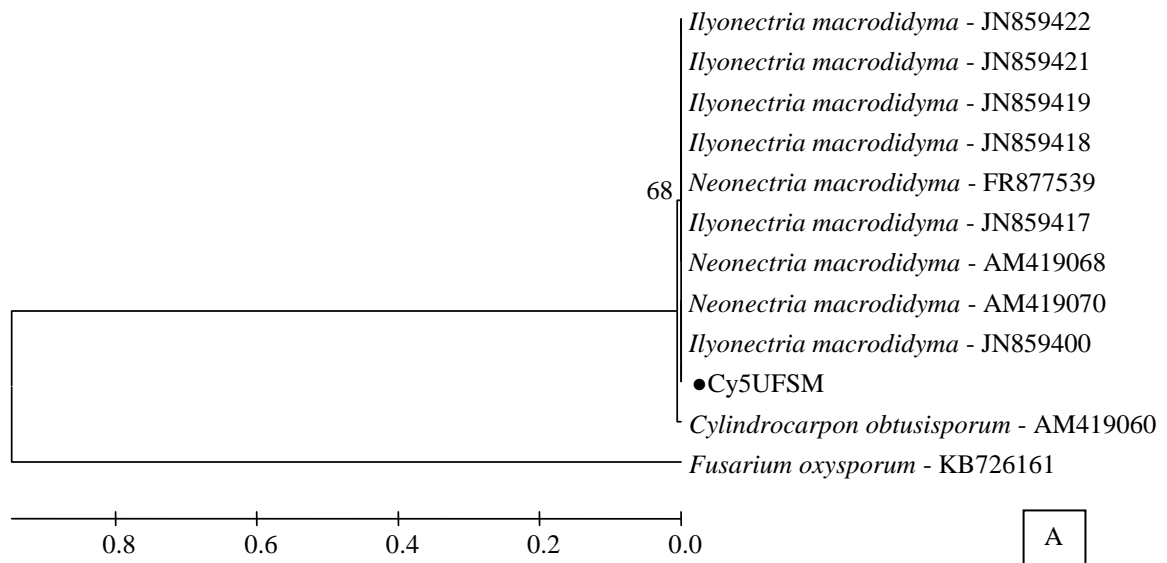


Figure 2. Phylogenetic tree based on Neighbor-Joining analysis of sequences derived from regions: A) ITS rDNA; B) β -tubulin; C) Histone H3 based on 1000 replicates of bootstrap by *Ilyonectria macrodidyma* from grapevine and sequences of the same genus obtained from GenBank.

REFERENCES

1. S. Alaniz et al. *Plant Disease*. 91: 1187-1193, 2007.
2. D. Brayford, 1992. *Cylindrocarpon*. In: *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. (L.L. Singleton, J.D. Mihail, C.M. Rush, ed.), American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA, 103–106.
3. A. Cabral et al. *Phytopathologia Mediterranea*. 51: 340–354, 2012.
4. N. L. Glass et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 1323-1330, 1995.
5. R. W. Rayner. *A mycological colour chart*. Commonwealth Mycological Institute and British Mycological Society, 1970. 34 p.
6. T. J. White et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 18: 315-322, 1990.

CAPÍTULO 3

FIRST REPORT OF “*Cylindrocarpon*” *pauciseptatum* ASSOCIATED WITH BLACK FOOT DISEASE OF GRAPEVINE IN BRAZIL

Plant Disease (2013): Aceito

FIRST REPORT

Since 1999, the decline of American grapevines (*Vitis labrusca* L.) is common in Rio Grande do Sul, Brazil (2). In August 2012, *V. labrusca* with black foot symptoms were collected in vineyards in the Serra Gaúcha Region. Symptomatic plants had low vigor, vascular lesions, delayed budding, decline and death of vines. Symptomatic roots had necrotic lesions and reduced biomass. Fungal isolations were made from necrotic root and crown fragments (own-rooted cultivar) on potato dextrose agar (PDA) medium amended with 0.5 g L⁻¹ streptomycin sulfate. Putative colonies of “*C.*” *pauciseptatum* were obtained from single macroconidia isolations. Two isolates were used to confirm the identity of isolated colonies: Cy12UFSM and Cy13UFSM. After incubation in the dark for 10 days at 20 °C, the isolated mycelial colonies, which were cottony white to felty in texture, became dark orange to brown in hue. Both isolates produced chlamydospores in chains at 40 days. Chlamydospores of Cy12UFSM and Cy13UFSM measured 9-12 µm and 5-11.5 µm in diameter. Sporodochia formation on carnation leaf agar (CLA) medium was observed after 30 days. To encourage development of conidia, the isolates were grown on spezieller nährstoffarmer agar (SNA) medium for five weeks at 20 °C with addition of two pieces of 1 cm² filter paper. Microconidia of Cy12UFSM measured 4-8.5 X 3.5-5 µm and those of Cy13UFSM measured 3.5-7.5 X 3-5 µm. Macroconidia were predominantly 3-septate (Cy12UFSM measured 36-45 X 7.5-9 µm and Cy13UFSM measured 30-38 X 7.5-8 µm), but 1-, 2- septate macroconidia were observed. The sizes of the three spore types and colony morphology for our isolates were similar to those described by Schroers et al. (4) for “*Cylindrocarpon*” *pauciseptatum*. To

further confirm the identity of Cy12UFSM and Cy13UFSM, multi-gene DNA sequence analysis (rDNA-ITS, β -tubulin and histone H3) was conducted using primer pairs ITS1 and ITS4 (5), Bt2a and Bt2b, and H3-1a and H3-1b (3) which amplify the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 gene, part of the β -tubulin gene, and the histone H3 gene, respectively. Sequences of these three regions had 99, 99 and 97% similarity with references sequences of "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* Schroers & Crous [isolate Cy238; accession NOS.: ITS (JF735307.1); β -tubulin (JF735435.1) and histone H3 (JF735582.1), respectively]. To evaluate pathogenicity, four-month-old rooted cuttings of *Vitis labrusca* cv. Bordô were inoculated with two isolates by immersing them in a conidial suspension (10^6 conidia mL⁻¹) for 60 min (1). Ten single-vine replicates were used for each isolate, and ten water-inoculated vines were included as controls. Thirty days after inoculation, vines were reinoculated with 40 mL of a 10^6 conidia mL⁻¹ suspension to ensure root infection. After four months, the inoculated plants had reduced root dry weight relative to controls (39.18% for Cy12UFSM and 18.27% for Cy13UFSM). Inoculated plants also had root and crown necrosis, vascular lesions, shoot decline, and vine mortality (60 and 80% mortality for Cy12UFSM and Cy13UFSM, respectively). All water-inoculated 'control' plants remained symptomless. The fungi Cy12UFSM and Cy13UFSM were re-isolated from infected woody tissues confirming Koch's postulates. To our knowledge this is the first report of "*C.*" *pauciseptatum* associated with black foot disease of grapevine in Brazil, which may potentially impact the sustainability of grapevine nurseries and vineyard productivity.

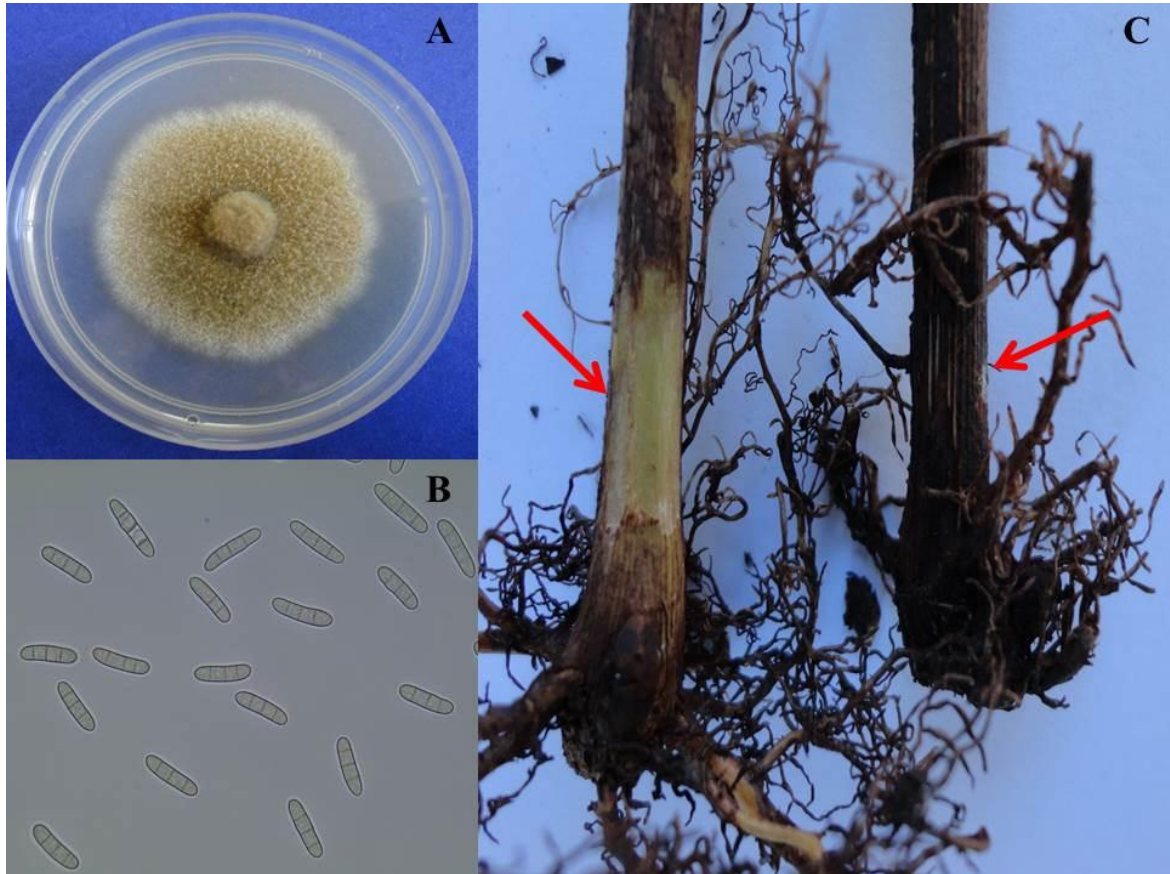


Figure 1. A) Colony morphology of “*Cylandrocarpon*” *pauciseptatum* on PDA; B) macroconidia; C) symptoms observed in pathogenicity tests (left: uninoculated plant; right: inoculated plant).

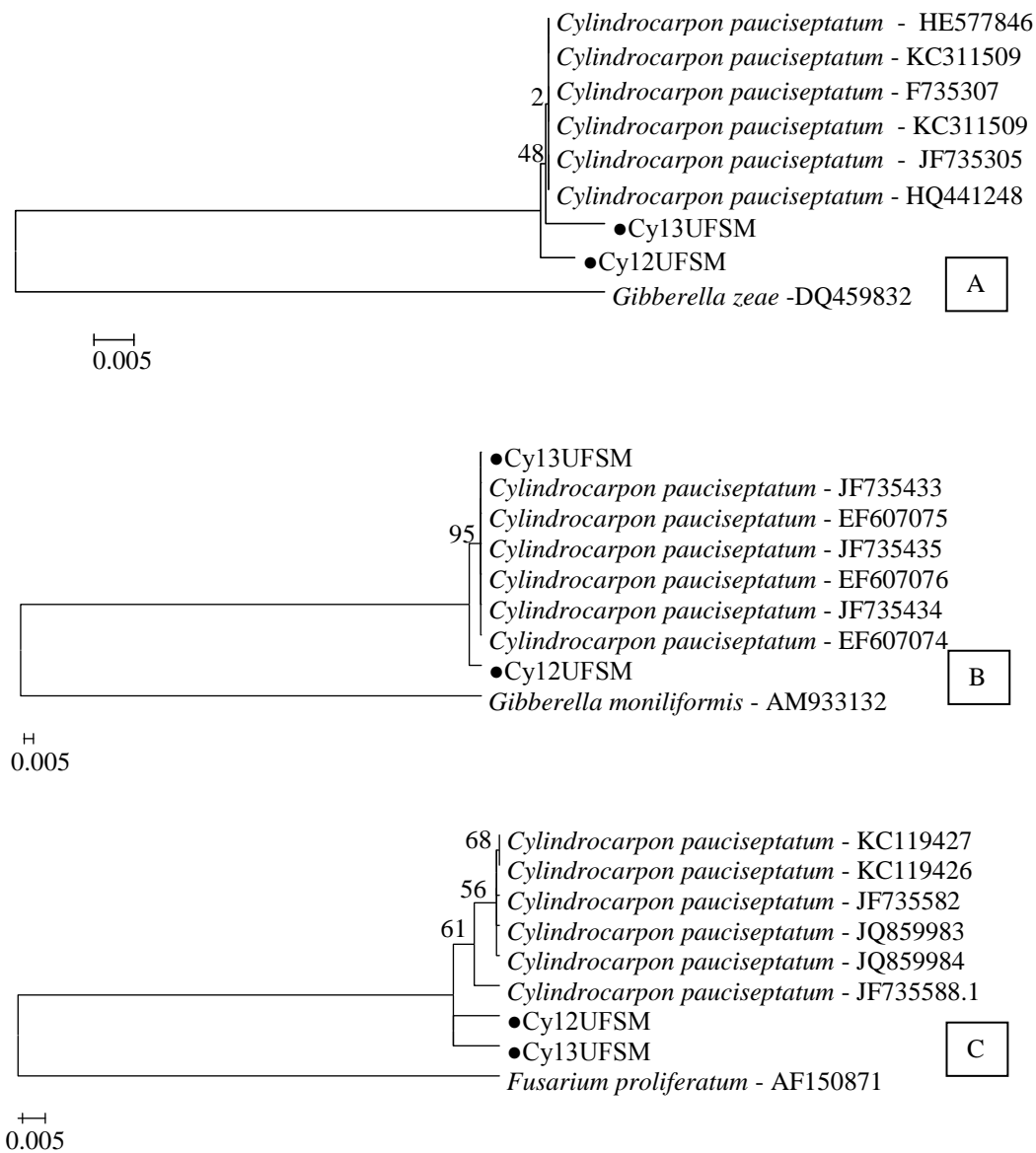


Figure 2. Phylogenetic tree based on Neighbor-Joining analysis of sequences derived from regions: A) ITS rDNA; B) β -tubulin; C) Histone H3 based on 1000 replicates of bootstrap by “*Cyindrocarpon*” *pauciseptatum* from grapevine and sequences of the same genus obtained from GenBank.

REFERENCES

1. A. Cabral et al. *Phytopathologia Mediterranea*. 51: 340–354, 2012.
2. L. R. Garrido et al. *Fitopatologia Brasileira*. 29:548-550, 2004.

3. N. L. Glass et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 1323-1330, 1995.
4. H. J. Schoers et al. *Mycological Research*. 112: 82-92, 2008.
5. T. J. White et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*.18: 315-322, 1990.

CAPÍTULO 4

FIRST REPORT OF *Ilyonectria robusta* ASSOCIATED WITH BLACK FOOT DISEASE OF GRAPEVINE IN SOUTHERN BRAZIL

Plant Disease (2013): Aceito

FIRST REPORT

In August 2012, symptoms of black foot disease were observed on 21-year-old grapevines (*Vitis labrusca* cv. Bordô; own-rooted cultivar) at Nova Pádua city, Rio Grande do Sul state, Brazil. Symptomatic plants showed reduced vigor, vascular lesions, decline and death of vines, and necrotic lesions on roots. Isolation of fungi associated with necrotic root tissue was made on potato dextrose agar (PDA) medium containing 0.5 g L⁻¹ streptomycin sulfate. Cultures were incubated at 25 °C for seven days in darkness, and single-spore cultures were obtained from the colonies emerging from the diseased tissue. For morphological characterization, cultures were transferred to PDA and spezieller Nährstoffarmer agar (SNA) medium with addition of two pieces of 1cm² filter paper. One representative isolate (Cy9UFSM) was used for morphological and molecular characterization and pathogenicity confirmation. After 10 days growth on PDA at 20 °C in the dark, colonies were umber to chestnut in color (3), appeared cottony to felty in texture, and sporulated profusely. After five weeks on SNA and under dark conditions at 20 °C, cultures formed macroconidia predominantly on simple conidiophores, 1 to 3 septate, with both ends slightly rounded. Macroconidia varied in size depending on the number of cells as follows: one-septate (23-) 27.7 (-31) X (4.5-) 5.8 (-7) µm; two-septate (26-) 30.1 (-34) X (5-) 5.6 (-6) µm; and three-septate (24-) 31.2 (-35) X (5-) 5.8 (-6.5) µm. Microconidia were observed and did not have a visible hilum (6-) 11.2 (-17) X (-3.5) 4.2 (-5) µm (n= 30 observations per structure). Brown, thick-walled globose to subglobose chlamydospores were produced

abundantly on PDA, (8.5-) 13.8 (-17) μm . To confirm the specie, primer pairs H3-1a and H3-1b (2) were used to amplify a portion the histone H3 gene. Sequence of this region showed 98% similarity with a reference sequence for *Ilyonectria robusta* (A.A. Hildebr.) A. Cabral & Crous (Genbank Accession No. JF735530). Thus, both morphological and molecular criteria supported identification of the strain as *I. robusta*. This isolate was deposited in Genbank as accession KF633172. To confirm pathogenicity, four-month-old rooted cuttings of *Vitis labrusca* cv. Bordô were inoculated by immersing roots in a conidial suspension (10^6 mL^{-1}) for 60 min. After inoculation the cuttings were planted in 1 L bags containing commercial substrate (Mec Plant). Thirty days later, each plant was reinoculated by applying 40 mL of a conidial suspension (10^6 mL^{-1}) to the commercial substrate. Ten single-vine replicates were used for isolate, and ten water-inoculated vines were included as controls. After four months, the inoculated plants showed a 22.5% reduction of root mass, with root and crown necrosis, browning of vessels and 20% mortality. Control plants treated with water remained symptomless. The fungus was reisolated from blackened tissue of wood from the basal end of rooted cuttings, thereby satisfying Koch's postulates. *I. robusta* was first associated with black foot disease of grapevine in Portugal in 2012 (1). To our knowledge this is the first report in southern Brazil of *I. robusta* associated with black foot disease of grapevine.

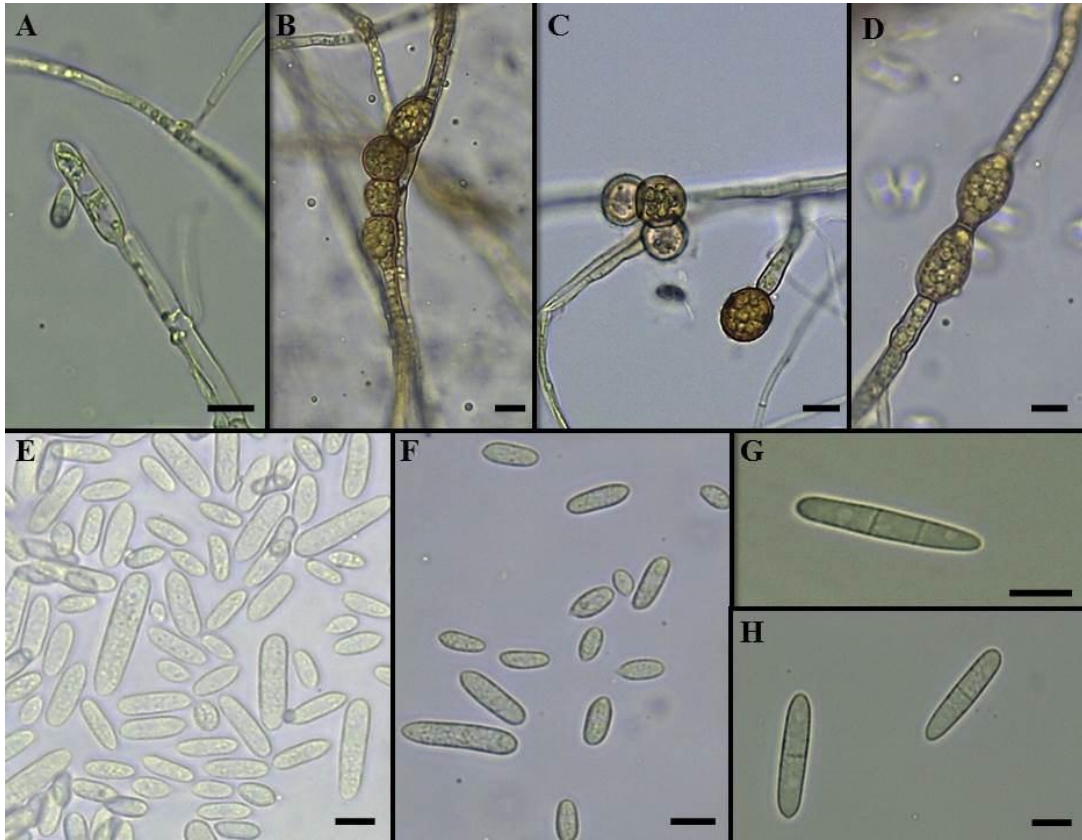


Figure 1. *Ilyonectria robusta* (Cy9UFM): A) simple conidiophores on aerial mycelium; B-D) chlamydospores on mycelium; E, F) macroconidia and microconidia; G) two-septate macroconidia; H) one-septate macroconidia. Bars = 10 μ m.

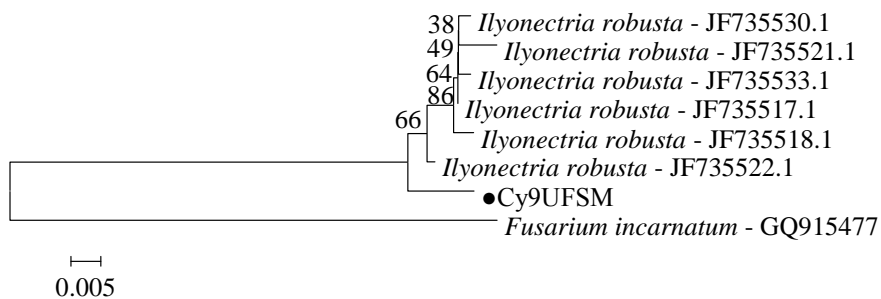


Figure 2. Phylogenetic tree based on Neighbor-Joining analysis of sequence derived from region histone H3 based on 1000 replicates of bootstrap by *Ilyonectria robusta* from grapevine and sequences of the same genus obtained from GenBank.

REFERENCES

1. A. Cabral et al. *Mycological Progress*. 11: 655-688, 2012.
2. N. L. Glass et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 1323-1330, 1995.
3. R. W. Rayner. *A mycological colour chart*. Commonwealth Mycological Institute and British Mycological Society, 1970. 34 p.

CAPÍTULO 5

DAMAGE LEVELS OF *Ilyonectria* spp. AND “*Cylindrocarpon*” *pauciseptatum* ASSOCIATED WITH BLACK FOOT DISEASE OF GRAPEVINE

Tropical Plant Pathology: submetido

ABSTRACT

Since the 90s, black foot disease threatens the production of grape in various countries. Recently, new species associated to this disease have been described, but there is a need for studies related to their potential damage. Isolates of *Ilyonectria macrodidyma*, *Ilyonectria robusta* and “*Cylindrocarpon*” *pauciseptatum* obtained from grapevines with black foot symptoms collected in Rio Grande do Sul, Brazil, were inoculated in rooted cuttings of *Vitis labrusca* cv. Bordô, and their root and aerial symptoms were evaluated. All isolates caused symptoms typical of the disease, including necrosis of the root and crown, as well as mass reduction of the canopy and of the root system. The isolates were reisolated from necrotic wood fragments, thus confirming their potential for damage on *Vitis labrusca*.

Key words: *Vitis* spp., grapevine decline, pathogenicity, soil pathogens.

SHORT COMMUNICATION

The cultivation of grapevines is of great importance at the global level due to its extension, occupying an area of 7.528 million ha (OIV, 2013). In Brazil, grapevines are one of the most important fruit trees in the agricultural sector. In 2012, they occupied an area of 91,000 ha vineyards, with an annual production of 291.7 million litres of wine (OIV, 2013). With regards to diseases in the grapevine’s trunk, the black foot disease has been gaining

notoriety in the winegrowing sector. It was first detected in vines in France in 1961 (Maluta & Larignon, 1991). Since 1999, the death of American grapevines (*Vitis labrusca* L.) has been observed in Rio Grande do Sul state, and after pathogenicity tests and morphological characterisation, the presence of "*Cylindrocarpon*" *destructans* (Zinssm.) Scholten was confirmed in vineyards of the Serra Gaúcha Region. This was considered the first account of black foot disease in Brazil (Garrido et al., 2004). The disease has already been described in other countries of South America such as Argentina (Gatica et al., 2001), Chile (Auger et al., 2007), Uruguay (Abreo et al., 2010) and Peru (Álvarez et al., 2012), as well as in other countries like the United States of America (Petit & Gubler, 2005), Portugal (Rego et al., 2000), South Africa, New Zealand (Halleen et al., 2004), Australia (Sweetingham, 1983), Turkey (Özben et al., 2012) and Canada (Petit et al., 2011).

Black foot disease in grapevines affects mostly young vines causing typical symptoms in the canopy and the root system. Garrido et al. (2004) report that three-year-old vines cv. Bordô presented darkening of the trunk. Other symptoms include the reduction of root system biomass, necrosis in the roots, vascular discolouration, slow grow and reduced vigour (Halleen et al., 2006a; Cabral et al., 2012). This disease is caused by species of *Ilyonectria* P. Chaverri & C. Salgado (anamorph: "*Cylindrocarpon*" Wollew.), *Campylocarpon* Halleen, Schroers & Crous and *Cylindrocladiella* Boesew. In Brazil, besides the "*C.*" *destructans* associated with the disease (Garrido et al., 2004), the presence of *Ilyonectria liriodendri* (Halleen, Rego & Crous) Chaverri & Salgado (Russi et al., 2010), *Ilyonectria macrodidyma* (Halleen, Schroers & Crous) P. Chaverri & C. Salgado (Santos et al., in press a), "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* Schroers & Crous (Santos et al., in press b), *Campylocarpon fasciculare* Schroers, Halleen & Crous and *C. pseudofasciculare* Halleen, Schroers & Crous (Correia et al., 2012) were also reported.

A recent study described *Ilyonectria lusitanica* A. Cabral, Rego & Crous, *Ilyonectria estremocensis* A. Cabral, Nascimento & Crous and *Ilyonectria europaea* A. Cabral, Rego & Crous as more virulent to the grapevine than other species previously accepted as the main causal agents of black foot disease, such as *I. liriodendri* e *I. macrodidyma* (Cabral et al., 2012). Alaniz et al. (2007) verified that *I. macrodidyma* and *I. liriodendri* isolates significantly reduced the dry root weight if compared to control treatment, however, there were no differences between species under evaluation of the disease severity in the root system. The objective of this work was to evaluate the damage level of isolates of *Ilyonectria* ssp. and "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* associated with black foot disease in *Vitis labrusca* cv. Bordô.

In this study, nine isolates of *Ilyonectria* spp. and two isolates of “*Cylindrocarpon*” *pauciseptatum* were used. They were obtained from grapevines with black foot disease symptoms, from georeferenced vineyards in the state of Rio Grande do Sul, Brazil (Table 1), in 2012. Symptomatic plants presented root mass reduction, necrosis in the roots and crown, delayed sprouting, reduced vigour, wilting of the canopy and death of the plant. Fungal cultures were isolated from the roots and basal region of the symptomatic plants. Fragments of the necrotic tissue (~3x3x3 mm) were washed with running water and disinfected with 70% alcohol and 1% sodium hypochlorite, followed by three baths in distilled and sterilised water for one minute each. After drying, these fragments were plated in Petri dishes with Potato-Dextrose-Agar (PDA, Difco, MI, USA) culture medium complemented with 0.5 g L⁻¹ of streptomycin sulphate and incubated for seven days at 25 °C, in the dark. After this period, morphological characteristics were observed according to Booth (1966), Garrido et al. (2004) and Halleen et al. (2004; 2006b). Single spore cultures were obtained and stored in the fungi collection of the Plant Pathology Laboratory at Federal University of Santa Maria (Universidade Federal de Santa Maria) in Santa Maria, Brazil and also at Embrapa Grape and Wine (Embrapa Uva e Vinho) in Bento Gonçalves, Brazil.

Table 1. List of isolates studied with collection details.

Isolate	Origin (Region)	Rootstock/Cultivar	GenBank accession Histon H3
<i>Ilyonectria macrodidyma</i>			
Cy4UFMSM	Erechim	VR 043-43/Isabel	KF633167
Cy5UFMSM	Garibaldi	Niágara Branca*	KF633168
Cy7UFMSM	Garibaldi	16149/ Isabel	KF633170
Cy8UFMSM	Garibaldi	16149/ Isabel	KF633171
Cy10UFMSM	Bento Gonçalves	Paulsen 1103/Burdin	KF633154
Cy11UFMSM	Bento Gonçalves	Gravesac/Merlot	KF633155
Cy15UFMSM	Flores da Cunha	Niágara Branca*	KF633159
Cy16UFMSM	Flores da Cunha	Bordô*	KF633160
<i>Ilyonectria robusta</i>			
Cy9UFMSM	Nova Pádua	Bordô*	KF633172
“ <i>Cylindrocarpon</i> ” <i>pauciseptatum</i>			
Cy12UFMSM	Dois Lajeados	Concord*	KF633156
Cy13UFMSM	Dois Lajeados	Bordô*	KF633157

* Own-rooted cultivar.

The isolates presented in Table 1 were used for the damage level assessments in *Vitis labrusca*. These were grown in PDA plates, incubated at 25 °C, in the dark for 30 days prior

to inoculation. The inocula were prepared through superficial scraping of the culture using 10 mL of distilled and sterilised water in each plate with the help of a Drigalski spatula. The resulting suspension was filtered in two layers of cheesecloth and conidial concentration were adjusted to 10^6 conidia mL^{-1} with distilled and sterilised water, using a Neubauer chamber.

Four-month-old rooted cuttings of *Vitis labrusca* cv. Bordô were used. Before inoculation, the cuttings were removed from bags, the root system was washed in running water and slightly trimmed with sterilised scissors. Roots of ten plants per isolate were immersed in a conidial suspension for 60 min (Cabral et al., 2012). After inoculation, the plants were transplanted to 1 L plastic bags containing a commercial substrate Mec Plant[®] and kept in a greenhouse at 25 ± 2 °C with a photoperiod of 12 h. After one month, a substrate re-inoculation was performed with a 40 mL (10^6 conidia mL^{-1}) of suspension in each plant, with the aim of ensuring infection of the roots (Alaniz et al., 2007). The control plants only received distilled and sterilised water during inoculation and re-inoculation.

After four months, the plants were removed from packaging, and root systems were washed in running water to eliminate the substrate. To evaluate the symptoms a grading scale used in the canopy, in which 0 = healthy plant (control treatment), 1 = 0 to 20% reduction of leaf mass, 2 = 20 to 40% reduction of leaf mass, 3 = 40 to 60% reduction of leaf mass, 4 = 60 to 80% reduction of leaf mass, 5 = reduction of leaf mass above 80%, dried out or dead canopy. Root system symptoms were evaluated according to the scale adapted from Alaniz et al. (2007), with grades from 0 to 5: 0 = healthy plant without necrotic lesions, 1 = 0 to 10% reduction of root mass, 2 = 10 to 25% reduction of root mass, 3 = 25 to 50% reduction of root mass, 4 = reduction of root mass by more than 50%, and 5 = plant death. The weight of dry mass in the aerial and root systems used for the symptom grading was obtained after drying the plant material in a hothouse with forced ventilation at 60 °C, until constant weight.

For the re-isolation of the pathogen, 10 fragments of wood tissue were extracted from the base region (2 cm above the inferior end of the cutting) of each plant and were superficially disinfected with a bath in alcohol (70%), sodium hypochlorite (1%) followed by three baths in distilled and sterilised water for one minute each. The fragments were dried up in sterilised filter paper and transferred to Petri dishes containing PDA medium complemented with 0.5 g L^{-1} of streptomycin sulphate. The plates were incubated in the dark at 20 °C for 14 days. After this period, the percentage of wood tissue fragments from which the pathogen was recovered in relation to the total number of fragments was recorded.

Trial design was entirely randomised. Statistical analysis was comprised of analysis of variance in the transformed data to $\sqrt{(x + I)}$, and when significant effects were found, a means comparison was performed through the Scott-Knott test at 5% probability. The software SISVAR 5.3 (System for the Analysis of Variance of Balanced Data) was used for the analyses (Ferreira, 2010).

Results for the potential damage of isolates under study are presented in the Table 2. The inoculated plants presented a reduction of root mass, roots and crown necrosis, darkened vessels, leaf ribs necrosis, mass reduction and drying of the canopy and, in some cases, plant death (Figure 1). All the isolates under study have shown to be pathogenic to *Vitis labrusca* cv. Bordô. Garrido et al. (2004) observed similar symptoms in grapevines cv. Bordô inoculated with "*Cylindrocarpon*" *destructans*.

All the isolates produced a negative effect on the inoculated plants canopy, differing statistically from the control plants. Isolate, Cy9UFSM (*Ilyonectria robusta*) presented the lowest value (3.2) for aerial symptoms. On the other hand, no significant differences were observed among the isolates of the three species evaluated (Table 2).

No differences among the three species were recorded concerning root system symptoms. Only control plants differed from the inoculated plants (Table 2). A similar result was obtained by Petit & Gubler (2005) when evaluating "*C.*" *destructans* and *I. macrodidyma* and also by Mohammadi et al. (2009) with *I. liriodendri* isolates, where no variation between the different isolates was found. The values attributed to the root system symptoms varied from 2.6 for isolate Cy9UFSM (*Ilyonectria robusta*) to 4.8 for isolate Cy10UFSM (*Ilyonectria macrodidyma*) (Table 2).

Oliveira et al. (1998) related typical symptoms of the black foot disease after 60 days in grapevines cv. Seara Nova inoculated with "*C.*" *destructans*. The variation in aggressiveness of isolates can be explained by differences in enzymatic activity and in the production of mycotoxins. Rahman & Punja (2005) verified that highly virulent isolates of "*Cylindrocarpon*" *destructans* obtained from ginseng (*Panax quinquefolius* L.) produced higher levels of enzymes, pectinase and polyphenoloxidase, than less virulent isolates. Histological studies carried out by the same authors in inoculated ginseng roots with highly virulent isolates showed the direct penetration of hyphae through the epidermis, followed by intracellular colonisation in the cortex, cellular disintegration and accumulation of phenolic compounds. Lyr & Kluge (1968) when evaluating pathogenic isolates of *Nectria radicularis* pathogenic to *Pinus sylvestris* L. concluded that these presented higher pectinase and cellulase

activity when compared to non-pathogenic isolates. Studies of sections diseased tissue revealed that the majority of xylem vessels showed tyloses with thick walls or brown gum and that functional elements of phloem were obstructed with gum (Halleen et al., 2006a) impeding the flux of sap, thus resulting in the decline and death of the plant. Similar symptoms were also observed in this work (data not shown). Garrido et al. (2004) observed complete internal darkening in the basal region of the plant, with dark-brown to black discolouring, differing from symptoms of grapevine fusariosis (*Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *herbemontis* Tocchetto) which are restricted to the xylem region. In pathogenicity studies using rootstock Paulsen 1103 and 60 *Ilyonectria* spp. isolates of grapevines and other hosts, isolates obtained from other hosts proved to be more virulent than those obtained from grapevine (Cabral et al., 2012).

Table 2. Damage degree of isolates of *Ilyonectria* spp. and “*Cylindrocarpon*” *pauciseptatum* in *Vitis labrusca* cv. Bordô.

Specie/Isolate	Shoot disease severity ^{1,3}	Root disease severity ^{2,3}	% Reisolation
Control	0.0 a ⁴	0.0 a ⁴	0.0 a ⁴
<i>Ilyonectria macrodidyma</i>			
Cy4UFSM	5.0 b	4.8 b	47.5 b
Cy5UFSM	4.8 b	4.0 b	45.0 b
Cy7UFSM	5.0 b	4.0 b	77.5 c
Cy8UFSM	5.0 b	3.8 b	55.0 b
Cy10UFSM	5.0 b	4.8 b	75.0 c
Cy11UFSM	4.6 b	3.6 b	87.5 c
Cy15UFSM	4.6 b	3.8 b	70.0 c
Cy16UFSM	4.2 b	4.6 b	70.0 c
<i>Ilyonectria robusta</i>			
Cy9UFSM	3.2 b	2.6 b	70.0 c
“ <i>Cylindrocarpon</i> ” <i>pauciseptatum</i>			
Cy12UFSM	4.8 b	4.4 b	72.5 c
Cy13UFSM	5.0 b	4.6 b	60.0 b

¹ Shoot symptoms were rated using the following scale: 0 = healthy (control treatment), 1 = 0 to 20% shoot mass reduction, 2 = 20 to 40% shoot mass reduction, 3 = 40 to 60% shoot mass reduction, 4 = 60 to 80% shoot mass reduction, 5 = > 80% shoot mass reduction or drying or plant death.

² Root symptoms were rated using the following scale: 0 = healthy with no lesions, 1 = 0 to 10% root mass reduction, 2 = 10 to 25% root mass reduction, 3 = 25 to 50% root mass reduction, 4 = > 50% root mass reduction, 5 = death: adapted from Alaniz et al. (2007).

³ Transformed means ($\sqrt{(x + 1)}$).

⁴ Means in the same column followed by the same letter are not significantly different (Scott-Knott, $p \leq 0,05$).

Inoculated pathogens were not recovered from the control plants. A percentage re-isolation higher than 45% was observed for all isolates. Isolates Cy4UFMS, Cy5UFMS, Cy8UFMS and Cy13UFMS presented the lowest percentage of re-isolation.

All isolates from the three species analysed caused a high damage degree in the aerial part and roots systems, demonstrating their virulence for *Vitis labrusca* cv. Bordô. This is the first work evaluating the severity of damage caused by, different species associated with black foot disease in Brazil.

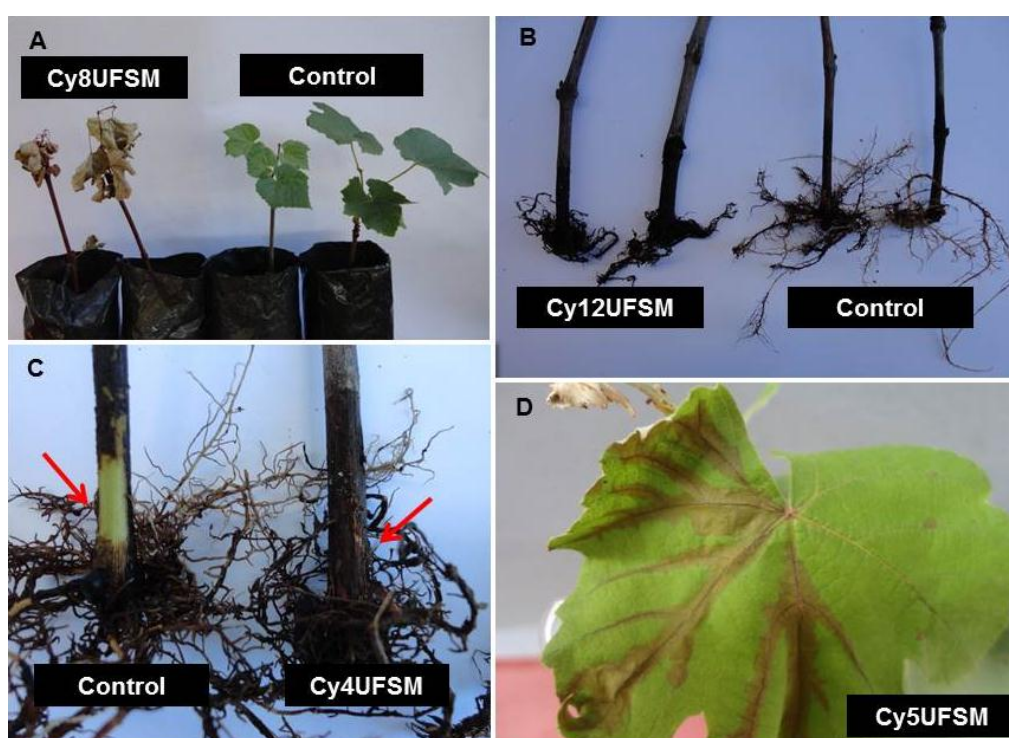


Figure 1. Symptoms of black foot disease in *Vitis labrusca* cv. Bordô: A) drying of shoots after inoculation with Cy8UFMS versus control; B) Root mass reduction after inoculation with Cy12UFMS versus control; C) crown necrosis after inoculation with Cy4UFMS versus control; D) necrosis of the leaf ribs after inoculation with Cy5UFMS.

REFERENCES

Abreo E, Martinez S, Bettucci L, Lupo S (2010) Morphological and molecular characterisation of *Campylocarpon* and *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot disease of grapevines in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 39: 446-452.

Alaniz S, León M, Vicent A, García-Jiménez J, Abad-Campos P, Armengol J (2007) Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black foot disease of grapevine in Spain. *Plant Disease* 91:1187-1193.

Álvarez LA, Tamayo D, Castilla C, Munive C, Agustí-Brisach C, Gramaje D, Armengol J (2012) Occurrence of grapevine trunk pathogens in nurseries and vineyards in the northern and southern coast of Peru. *Phytopathologia Mediterranea* 51:425.

Auger J, Esterio M, Perez I (2007) First report of black foot disease of grapevine caused by *Cylindrocarpon macrodidymum* in Chile. *Plant Disease* 91:470.

Booth C (1966) The genus *Cylindrocarpon*. *Mycological Papers* 104:1-56.

Cabral A, Rego C, Crous PW, Oliveira H (2012) Virulence and cross-infection potential of *Ilyonectria* spp. to grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 51:340-354.

Correia KC, Câmara MPS, Barbosa MAG, Sales Jr. R, Agustí-Brisach C, Gramaje D, García-Jiménez J, Abad-Campos P, Armengol J, Michereff SJ (2012) Fungal species associated with trunk diseases of table grapes in Northeastern Brazil. *Phytopathologia Mediterranea* 51:427.

Ferreira DF (2010). Sisvar versão 5.3 (Biud 75). Sistemas de análises de variância para dados balanceados: Programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Lavras, Universidade Federal de Lavras.

Garrido LR, Sônego OR, Urben AF (2004) *Cylindrocarpon destructans* causador do “pé-preto” da videira no Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira* 29:548-550.

Gatica M, Césari C, Magnin S, Dupont J (2001) *Phaeoacremonium* species and *Phaeomoniella chlamydospora* in vines showing “hoja de malvón” and young vine decline symptoms in Argentina. *Phytopathologia Mediterranea* 40:317-324.

Halleen F, Schroers HJ, Groenewald JZ, Crous PW (2004) Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology* 50:431-455.

Halleen F, Fourie PH, Crous PW (2006a) A review of black foot disease of grapevine. *Phytopatologia Mediterranea* 45:55-67.

Halleen F, Schroers HJ, Groenewald JZ, Rego C, Oliveira H, Crous PW (2006b). *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevines. *Studies in Mycology* 55:227-234.

Lyr H, Kluge E (1968) Relationship between pathogenicity, enzyme and toxin production in *Nectria radicola*. *Phytopathologische Zeitschrift* 62:220-231.

Maluta DR, Larignon P (1991) Pied-noir: mieux vaut prévenir. *Viticulture* 11:71-72.

Mohammadi H, Alaniz S, Banihashemi Z, Armengol J (2009) Characterization of *Cylindrocarpon liriodendri* associated with black foot disease of grapevine in Iran. *Journal of Phytopathology* 157:642-645.

OIV, Statistical report on world vitiviniculture 2013. Available at: www.oiv.int/oiv/files/2013%20Report.pdf. Accessed on october 05, 2013.

Oliveira H, Nascimento T, Rego C (1998). Crown gall and *Cylindrocarpon* black-foot diseases of grapevine in Portugal. In: Proceedings of the 19th International Geisenheim workshop on grapevine grafting. Geisenheim, Germany 2–4 July 1998: 23–34.

Özben S, Demirci F, Degirmenci K, Uzunok S (2012) First Report of *Cylindrocarpon macrodidymum* associated with black foot diseases of grapevine in Turkey. *Plant Disease* 96:762.

Petit E, Gubler WD (2005) Characterization of *Cylindrocarpon* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. *Plant Disease* 89:1051-1059.

Petit E, Barriault E, Baumgartner K, Wilcox WF, Rolshausen PE (2011) *Cylindrocarpon* species associated with black-foot of grapevine in northeastern United States and southeastern Canada. *American Journal of Enology and Viticulture* 62:177-183.

Rahman, M, Punja, ZK (2005) Factors influencing development of root rot on ginseng caused by *Cylindrocarpon destructans*. *Phytopathology* 95:1381-1390.

Rego C, Oliveira H, Carvalho A, Phillips A (2000) Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 39:76-79.

Russi A, Nalin R, Dequigiovanni G, Gava R, Quecini V, Garrido LR, Ritschel P (2010) Study of the genetic variability of Brazilian populations of *Cylindrocarpon* spp., causal agent of grapevine black foot. *Phytopathologia Mediterranea* 49:111-112.

Santos RF, Blume E, Muniz MFB, Heckler LI, Finger G, Maciel CG, Harakava R, Garrido LR (in press a) First report of *Ilyonectria macrodidyma* associated with black foot disease of grapevine in Brazil. Plant Disease <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-13-0424-PDN>.

Santos RF., Blume E, Muniz MFB, Steckling SM, Burtet GW, Harakava R, Garrido LR, Silveira LRR (in press b) First report of "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum* associated with black foot disease of grapevine in Brazil. Plant Disease <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-13-0635-PDN>.

Sweetingham M (1983) Studies on the nature and pathogenicity of soilborne *Cylindrocarpon* spp. Ph.D. Thesis, University of Tasmania, Australia.

CAPÍTULO 6

CHARACTERIZATION OF *Campylocarpon pseudofasciculare* ASSOCIATED WITH BLACK FOOT DISEASE OF GRAPEVINE IN SOUTHERN BRAZIL

Plant Disease: submetido

ABSTRACT

The incidence and severity of black foot disease has been recently increasing in nurseries and vineyards of southern Brazil. Thus, the goal of the present study was to characterize *Campylocarpon* isolates associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.) using multi-gene DNA analysis (internal transcribed spacers [ITS rDNA], β -tubulin and histone H3), morphological characteristics, and to test the pathogenicity of the isolates in grapevine (*Vitis labrusca* cv. Bordô). The three DNA regions analyzed indicated, with high bootstrap values, that all the isolates belonged to *Campylocarpon pseudofasciculare*. The isolates morphology was similar to descriptions published for the specie. Isolates exhibited umber- to chestnut-colored colonies and macroconidia predominantly with 3 septa (37.98 x 6.99 μ m). All the isolates inoculated in *V. labrusca* cv. Bordô caused typical symptoms of black foot disease. The present work is the first report of *Campylocarpon pseudofasciculare* in southern Brazil.

Key words: multi-gene analysis, morphology, pathogenicity, *Vitis labrusca*.

INTRODUCTION

Grapevines are an important crop in Brazil, occupying 84,338 ha, with 18,284 kg yield in 2011 (12). Black foot is one of the most important grapevine diseases, affecting vineyards

in several locations worldwide. This disease was first reported in France in 1961 (17). Black foot was described by Halleen et al. (20) affecting mainly young grapevines, between two and ten years of age. The disease is characterized by root and crown necrosis, reduction of root mass, darkening of the vessels, decreased vigor, drying of shoots and plant death (14, 25).

Ilyonectria P. Chaverri & C. Salgado and *Campylocarpon* Halleen, Schroers & Crous are important pathogens causing typical symptoms of black foot disease and thus grapevine decline (19, 20). Gramaje and Armengol (16) reported that decline symptoms in young grapevines and failure of planting material have been reducing the grape production for raisins, table use and wine since 1990. Among the genera responsible for the disease, *Campylocarpon* is especially relevant. This genus possesses curved macroconidia with (1–)3–5(–6) septa, and no microconidia (19). Mostly, the teleomorphic phase is unknown (9, 19). The genus includes two species: *Campylocarpon fasciculare* Schroers, Halleen & Crous, already reported in South Africa (19), Spain (3) and Northeast Brazil (10), and *Campylocarpon pseudofasciculare*, reported in South Africa (19), Uruguay (1), Peru (4) and Northeast Brazil (10). In addition, *Campylocarpon*-inoculated grapevines exhibited 22.5% mortality for *C. fasciculare* and 17.5% for *C. pseudofasciculare* (19). However, pathogens causing black foot disease of grapevine are still not well studied, both in Brazil and worldwide.

The goal of the present study was to characterize *Campylocarpon pseudofasciculare* isolates that cause black foot disease in grapevines of southern Brazil, using multi-gene DNA analysis (internal transcribed spacers [ITS rDNA], β -tubulin and histone H3 genes), morphological characteristics, and to test the isolates's pathogenicity in grapevine (*Vitis labrusca* cv. Bordô).

MATERIAL AND METHODS

Isolates. Nine *Campylocarpon pseudofasciculare* isolates were obtained from symptomatic grapevines from different georeferenced vineyards in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, in 2012 (Table 1). Fungal isolates were obtained from the roots and basal region of plants exhibiting symptoms characteristic of black foot disease. Symptomatic plants exhibited reduced root mass, necrosis in the roots and crown, delayed sprouting, decreased vigor, shoot wilting and death. Necrotic wood fragments (~3x3x3 mm) were washed in running water and

disinfected with 70% alcohol and 1% sodium hypochlorite, followed by three baths of sterile distilled water of one minute each. After drying, the fragments were plated onto Petri dishes containing potato-dextrose-agar (PDA) medium to which 0.5 g L⁻¹ streptomycin sulfate was added. The Petri dishes were incubated for seven days, at 25 °C, in the dark. Following this period, the cultures were checked for morphological characteristics described by Halleen et al. (19) and Abreo et al. (1). Monosporic isolates were obtained and stored at the mycological collections of the Laboratory of Phytopathology of the Federal University of Santa Maria (Universidade Federal de Santa Maria - UFSM), Santa Maria, Brazil, and of the Embrapa Grape and Wine (Embrapa Uva e Vinho), Bento Gonçalves, Brazil.

Table 1. Details of the *Campylocarpon pseudofasciculare* isolates studied.

Isolate	Origin (Region)	Rootstock/Cultivar	GenBank accession numbers		
			ITS	TUB	HIS
Cy1UFSM	Fagundes Varela	Bordô*	-	KF633144	KF633164
Cy2UFSM	Guaporé	VR 043-43/Violeta	KF447564	KF633145	KF633173
Cy3UFSM	Erechim	Rupestris du Lot/Niágara Rosada	KF447565	KF633146	KF633166
Cy6UFSM	Garibaldi	Niágara Branca*	KF447566	KF633147	KF633169
Cy14UFSM	Farroupilha	Bordô*	KF447567	KF633148	KF633158
Cy17UFSM	Nova Pádua	RR 10114/Isabel	KF656730	KF633149	KF633161
Cy18UFSM	Monte Belo do Sul	Paulsen 1103/Chardonnay	KF447568	KF633150	KF633162
Cy19UFSM	Farroupilha	Paulsen 1103/Isabel	KF447569	KF633151	KF633163
Cy20UFSM	Nova Roma do Sul	Isabel*	KF447570	KF633152	KF633165

* Own-rooted cultivar

Molecular characterization. Fungal mycelia and spores were collected from the cultures grown in PDA for two weeks, at 20 °C, in the dark. Pathogen DNA extraction was performed using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method (11). The ITS regions of rDNA (ITS), β -tubulin (TUB) and histone H3 (HIS) genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR), using genomic DNA samples and the primer pairs ITS1 and ITS4 (29), Bt2a and Bt2b, and H3-1a and H3-1b (15), respectively.

The PCR reactions were conducted in a final volume of 50 μ L containing approximately 1 μ L DNA, 10 μ L 5X GoTaq Reaction Buffer (Promega, USA), 1 μ L dNTPs mix, 1 μ L of each primer, 0.2 μ L GoTaq DNA polymerase (Promega, USA) and autoclaved Milli-Q water to reach the final volume. The reactions were performed using a GeneAmp PCR System 2400 thermocycler (Perkin Elmer, USA), under the following temperature

conditions: an initial step at 94 °C for 2 min, followed by 40 denaturation cycles of 94 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 2 min and elongation at 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 4 min. At the end of the reaction, the PCR products were kept at 4 °C. A negative control containing no DNA was included. The amplified fragments and the control were analyzed by electrophoresis in 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide ($1 \mu\text{g L}^{-1}$), in TAE 1X buffer (0.04 M Tris-acetate + 1 mM EDTA), and visualized under ultraviolet light. The 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA) was used as a molecular weight marker. The PCR products were purified according to Schmitz and Riesner (26), using polyethylene glycol 6000 (PEG 6000).

Sequencing was performed using a 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). The sequenced fragments were analyzed using the BioEdit software (18). The nucleotide sequences obtained from the isolates were compared with sequences deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). The GenBank sequences with the highest scores were selected and aligned with the sequences obtained from the sequencing, using the ClustalW algorithm. In addition, a phylogenetic analysis was conducted by applying the neighbor-joining method, with 1,000 replicates, using the MEGA software, version 4 (27). The obtained sequences were deposited in GenBank (Table 1).

Morphological characterization. *Campylocarpon pseudofasciculare* isolates were grown in PDA at 25 °C, in the dark, for 7-14 days, following which the macroscopic cultural characteristics (transparency, texture, density, color, growth and growth margin) were described. The Rayner (23) mycological color chart was used to determine the colony color (front and back). For growth measurements, 8-mm diameter mycelial discs were removed from the margin of the colonies, placed at the center of Petri dishes containing PDA (five replicates per isolate) and kept at 20 °C in the dark. Growth was measured at day 7, using a digital caliper in two perpendicular directions, and mean growth was obtained. Sporulation was quantified after 14 days, by adding 20 mL sterile distilled water to the surface of the colony. The surface was scraped using a Drigalski spatula, the obtained suspension was filtered through two layers of gauze, and the conidial concentration was estimated (conidia mL^{-1}) using a Neubauer chamber. The colonies grown in PDA for 40 days were checked for the presence or absence of chlamydospores, and their diameters were measured (21). To measure the biometric characteristics (width and length) of conidia, isolates were grown in Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) culture medium to which two 1-cm^2 pieces of filter

paper were added and kept at 20 °C for five weeks, in the dark. For each isolate, 30 measurements were performed of each structure (chlamydospore and macroconidia with one, two, three and four septa) using an Olympus BX41 microscope (1000x magnification). Images were captured using a Leica ICC50 digital video camera coupled to a Leica DM500 microscope. The sporodochium formation was observed in Carnation Leaf Agar (CLA) (5) at 30 days.

Pathogenicity test. The pathogenicity test was performed for all the isolates, which were grown in PDA and incubated at 25 °C in the dark for 30 days prior to inoculation (Table 1). The inoculum was prepared by superficial scraping of the colony using a Drigalski spatula, after adding 10 mL sterile distilled water to each dish. The obtained suspension was filtered through two layers of gauze and adjusted to 10^6 conidia mL⁻¹ with sterile distilled water using a Neubauer chamber. Four-month-old rooted cuttings of *Vitis labrusca* cv. Bordô were used. Prior to inoculation, the seedlings were removed from the packages, and the root was washed with running water and slightly pruned using a sterile scissor. The roots were dipped in the suspension obtained from each isolate for 60 min (7), with a total of ten plants per isolate. Following the inoculation, the plants were transplanted into 1 L plastic bags containing Mec Plant commercial substrate and maintained in a greenhouse at 25 ± 2 °C under a 12 h light/12 h dark photoperiod. A month after the beginning of the experiment, the plants were re-inoculated using 40 mL suspension (10^6 conidia mL⁻¹) per plant to guarantee the root infection (2). The control treatment received only sterile distilled water for both the inoculation and re-inoculation. Four months after the beginning of the experiment, the plants were removed from the packages, the root was washed in running water to eliminate the substrate, and the symptoms were evaluated. For the shoots, a 0 to 5 grading scale was used: 0 = healthy plant (control treatment), 1 = 0 to 20% reduction of leaf mass, 2 = 20 to 40% reduction of leaf mass, 3 = 40 to 60% reduction of leaf mass, 4 = 60 to 80% reduction of leaf mass, 5 = reduction of leaf mass by more than 80%, drying of the shoot or plant death. Root symptoms for each plant were evaluated according to a scale adapted from Alaniz et al. (2), with grades from 0 to 5: 0 = healthy plant without necrotic lesions, 1 = 0 to 10% reduction of root mass, 2 = 10 to 25% reduction of root mass, 3 = 25 to 50% reduction of root mass, 4 = reduction of root mass by more than 50%, and 5 = plant death. The shoot and root dry mass were measured following the drying of the plant material in a forced-air drying oven at 60 °C until a constant weight was reached. For the re-isolation of the pathogen, 10 wood fragments

from the basal region (2 cm above the cutting's lower end) of each plant were superficially disinfected with a bath in 70% alcohol and 1% sodium hypochlorite, followed by three sterile distilled water baths of one minute each. The fragments were dried on sterile filter paper and transferred to Petri dishes containing PDA culture medium to which 0.5 g L^{-1} streptomycin sulfate was added. The plates were incubated at $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 14 days in the dark. Following that period, the proportion of wood tissue fragments from which *Campyloccarpon pseudofasciculare* colonies were recovered in relation to the total fragments obtained from each plant was calculated. The experimental design was completely randomized. An analysis of variance was performed, followed by a Scott-Knott test at $p \leq 0.05$ whenever a significant effect was observed. The data were $\sqrt{(x + 1)}$ transformed prior to analysis. The SISVAR 5.3 (Sistema de Análise de Variância Para Dados Balanceados [Variance Analysis System for Balanced Data]) software was used for all tests (13).

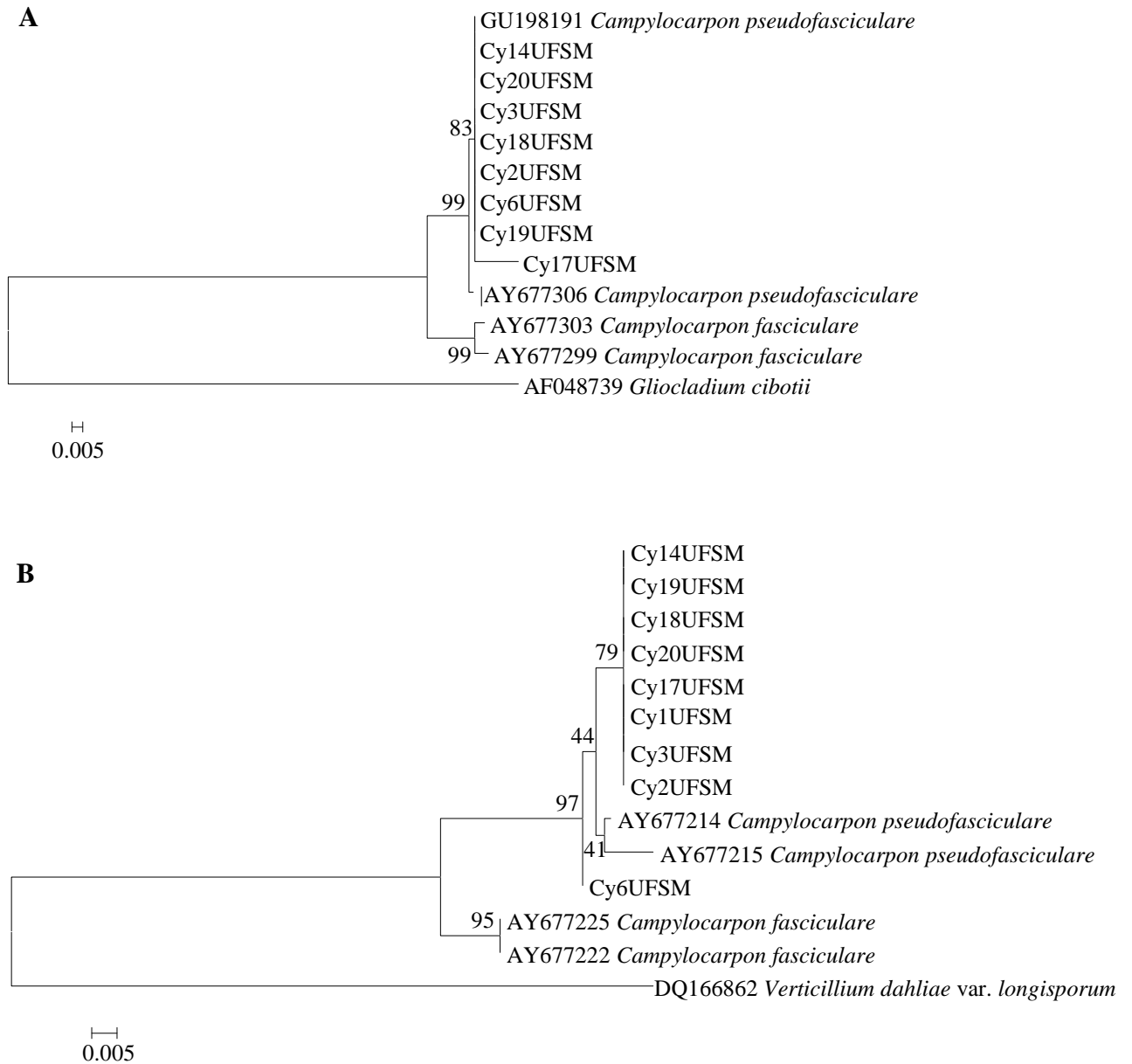
RESULTS

Molecular characterization. The primers used successfully amplified DNA from all the *Campyloccarpon pseudofasciculare* isolates. The sequences generated in the sequencing of the ITS1 and ITS4 oligonucleotides contained 508 to 639 bp. The size of the fragment corresponded 18S rRNA- ITS1-5.8S rRNA-ITS2-28S rRNA, partial sequence at the end. For the histone H3 and β -tubulin coding regions, fragments with approximately 515 bp and 287 bp were obtained, respectively.

Due to the genetic proximity of the two species, sequences of *C. pseudofasciculare* and *C. fasciculare* were used to construct the phylogenetic dendrograms. *Gliocladium cibotii*, *Verticillium dahliae* var. *longisporum* and *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* sequences were used as outgroups. The three analyzed regions (ITS, β -tubulin and histone H3) were efficient in classifying the studied isolates into the same clade as other *C. pseudofasciculare* sequences deposited in GenBank, with high bootstrap values.

The phylogenetic dendrograms, derived from sequences of the ITS rDNA, β -tubulin and histone H3 regions, confirmed that the studied isolates were *Campyloccarpon pseudofasciculare* (Figure 1). The dendrogram for the histone H3 region grouped all the

isolates in the same clade, with high bootstrap values (100%), and with 87% similarity to the *C. pseudofasciculare* isolate used as a reference (JF735503).



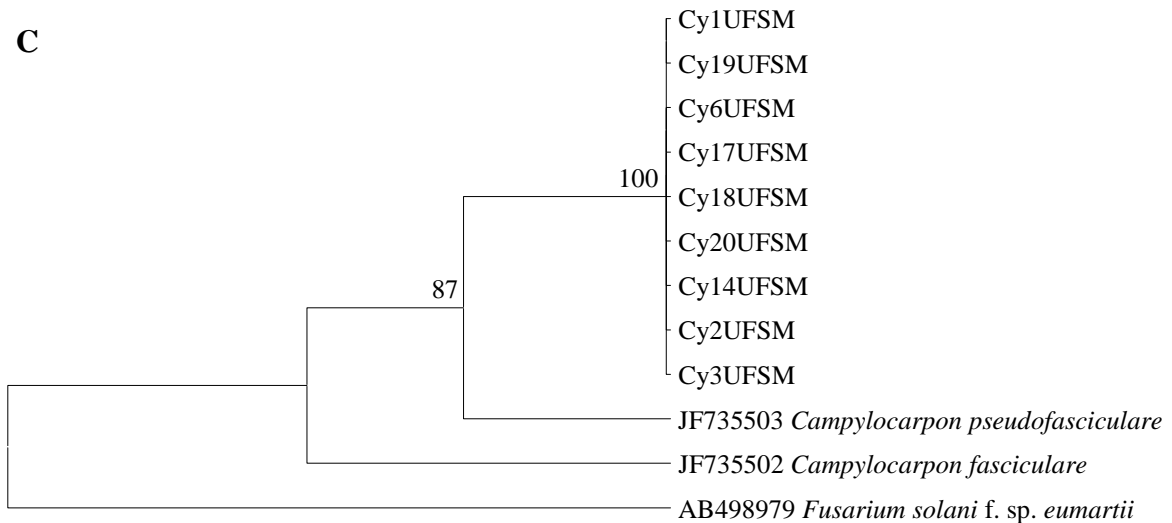


Figure 1. Phylogenetic dendrogram designed for the *Campylocarpon pseudofasciculare* isolates pathogenic to grapevine according to the “neighbor-joining” statistical method derived from sequences of the ITS rDNA (A), β -tubulin (B) and histone H3 (C) regions and based on 1,000 bootstrap replicates. The evolutionary distances were calculated using the Kimura 2-parameter model. The numbers associated with the branches represent the “bootstrap” numbers.

Morphological characterization. After 10 days of growth in PDA medium, all the studied isolates had homogeneous culture transparency, felty to cottony texture, medium density, absence of zoning, a smooth growth margin, umber to chestnut front color and sienna to chestnut back color, according to the Rayner (23) color chart. All the isolates formed a dark brown sporodochium in CLA growth medium.

The isolates exhibited slightly curved macroconidia with 1-5 septa, with predominance of 3 septa ($37.98 \times 6.99 \mu\text{m}$, mean of all isolates). Macroconidia with 5 septa were rare. Microconidia were not observed, and the chlamydospores were spherical and rare (Figure 2). The formation of chlamydospores was observed, which together with the previously described characteristics indicates that the nine isolates were *C. pseudofasciculare*, confirming the data of the multi-gene analysis. The sporulation varied from 5.91×10^5 (Cy3UFMSM) to 33.51×10^5 conidia mL^{-1} (Cy14UFMSM), showing different capacities for spore production by the different isolates. Larger colony sizes were observed for the Cy18UFMSM isolate, which measured 44.11 mm at day 7. The chlamydospore diameter varied from (3.5-) 4.4 (-6) to (7.5-) 11.4 (-12) μm for Cy17UFMSM and Cy20UFMSM, respectively (Table 2).

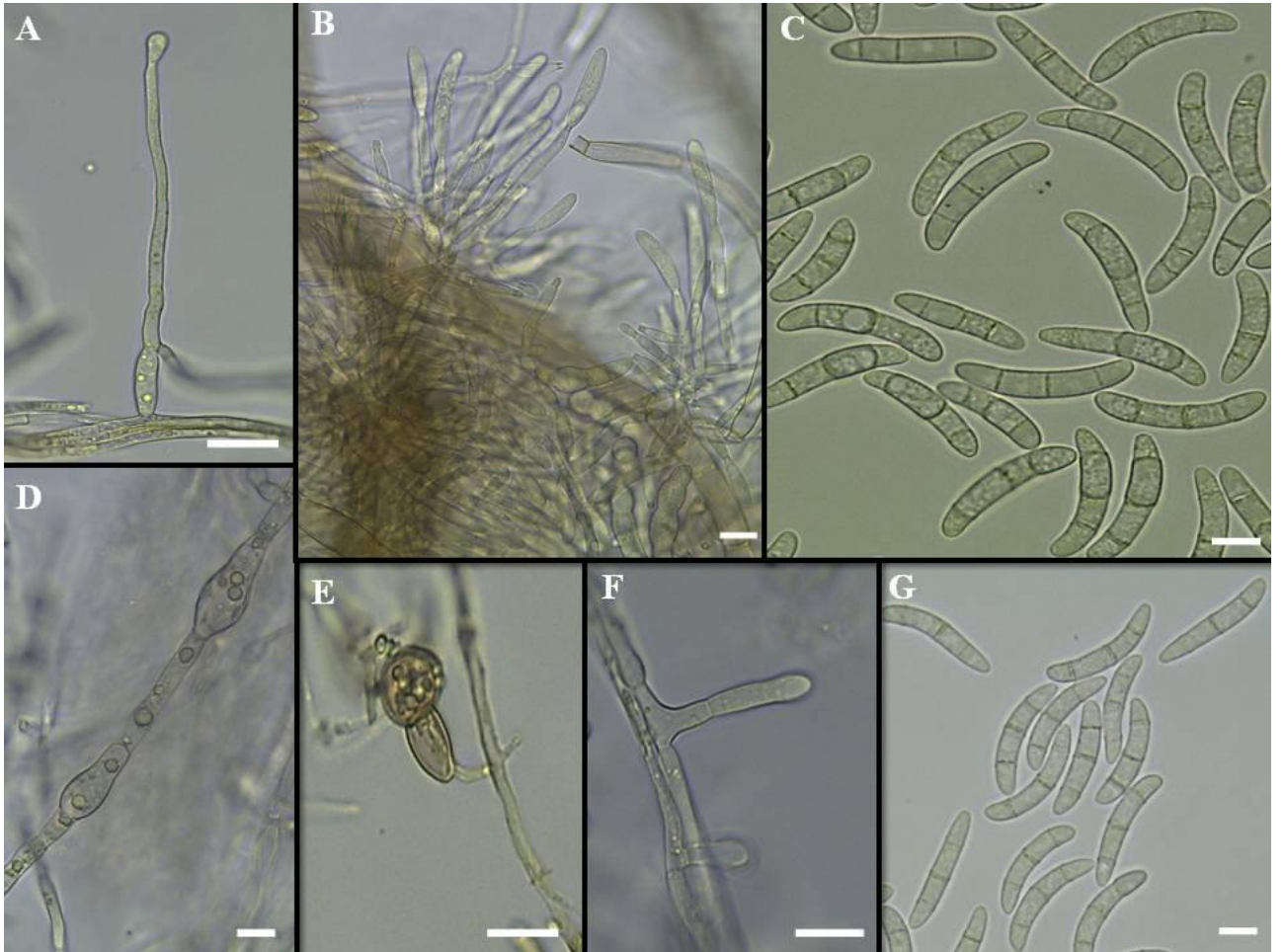


Figure 2. *Campylocarpon pseudofasciculare* (isolate Cy6UFSM): (A, F) simple conidiophore in aerial mycelium; (B) fascicles of branched conidiophores; (C, G) macroconidia; (D, E) chlamyospores in mycelium. Bars = 10 µm.

Table 2. Characteristics of the colonies, macroconidia and chlamyospore of *Campylocarpon pseudofasciculare* isolates pathogenic to *Vitis labrusca* cv. Bordô grown in PDA and SNA medium.

Isolate		Macroconidia (septum) ^{1,3}				Chlamyospore (μm) ^{2,4}	Sporulation ($\times 10^5$ spores mL^{-1}) ⁴	Diameter (mm) ⁴
		1 (μm)	2 (μm)	3 (μm)	4 (μm)			
Cy1UFSM	Length	-	-	(36-) 38.5 (-41)	(40-) 41.2 (-43)	(6-) 9.5 (-15.5)	15.61	41.34
	Width	-	-	(5-) 6.7 (-8)	(5-) 6.3 (-7)			
Cy2UFSM	Length	(15-) 17.7 (-21)	(16-) 19.5 (-24)	(34.5-) 36.3 (-40)	(34-) 38.3 (-42)	(6-) 7.4 (-8.5)	15.78	43.82
	Width	(5-) 5.4 (-6)	(5-) 5.4 (-7)	(6-) 7 (-8)	(6-) 6.8 (-8)			
Cy3UFSM	Length	-	-	(36-) 38.2 (-41)	(39-) 40.4 (-43)	(6-) 8.3 (-10)	5.91	39.39
	Width	-	-	(6.5-) 6.9 (-7)	(6.5-) 6.9 (-8)			
Cy6UFSM	Length	(20-) 27.2 (-34)	(27-) 32.8 (-38)	(32-) 37.8 (-41)	-	(7-) 7.6 (-8.5)	7.63	43.01
	Width	(5.5-) 5.9 (-7)	(6-) 6.5 (-7)	(7-) 7.5 (-8)	-			
Cy14UFSM	Length	-	-	(29-) 37.9 (-41)	(38-) 39.5 (-40.5)	(6.5-) 7.5 (-8.5)	33.51	41.79
	Width	-	-	(7-) 7.1 (-7.5)	(7-) 7.3 (-7.5)			
Cy17UFSM	Length	-	-	(36-) 37.6 (-41)	(37.5-) 40.4 (-43)	(3.5-) 4.4 (-6)	29.53	43.15
	Width	-	-	(5.5-) 6.6 (-7)	(6-) 6.9 (-7.5)			
Cy18UFSM	Length	(19-) 27.2 (-36)	(28-) 29.6 (-32)	(35-) 38.1 (-41)	-	(7-) 10 (-12.5)	24.28	44.11
	Width	(4.5-) 5.5 (-7)	(5-) 5.6 (-6)	(6-) 7 (-8)	-			
Cy19UFSM	Length	-	-	(35-) 38.8 (-42)	(37-) 39.5 (-42)	(7-) 8.5 (-10.5)	25.59	43.55
	Width	-	-	(6.5-) 6.8 (-7)	(6.5-) 6.9 (-7)			
Cy20UFSM	Length	(19-) 23.7 (-31)	(22-) 27.2 (-30)	(36-) 38.6 (-41)	(37-) 40.4 (-45)	(7.5-) 11.4 (-12)	6.68	41.03
	Width	(5-) 6.3 (-7)	(6-) 7 (-8)	(6.5-) 7.3 (-8)	(7-) 7.1 (-7.5)			

- Absent.

¹ Averages were derived from 30 conidia observations for each isolate (range minimum and maximum in parentheses). ² Averages were derived from 30 chlamyospore observations for each isolate (range - minimum and maximum - in parentheses). ³ SNA medium with the addition of two pieces of 1 cm^2 filter. ⁴ PDA medium.

Pathogenicity test. All the tested *C. pseudofasciculare* isolates were pathogenic for *V. labrusca* cv. Bordô. After four months, the inoculated plants exhibited decreased root mass, root and crown necrosis, vessel darkening, shoot mass reduction and drying and plant death. The severity of the leaf symptoms was evaluated using a grading scale from 0 to 5, where 0 are normal plants (control treatment) and 5 are plants with a shoot mass reduction of more than 80%, drying of the shoot or plant death. All the studied isolates had a negative effect on the plant shoots, being statistically significantly different from the control plants. The Cy18UFSM isolate had a significantly lower grade (2.0) than the remaining isolates and was therefore the least virulent. The severity of the disease in roots was evaluated using a scale adapted from Alaniz et al. (2) and varied from 2.2 to 4 for the inoculated plants, being statistically different from the control treatment. Higher grades indicate higher virulence of the microorganism. However, the isolates did not statistically differ from each other (Table 3). The lowest re-isolation percentage from wood fragments was observed for the Cy19UFSM isolate (60%), which was not statistically significantly different from the values for the Cy3UFSM, Cy14UFSM, Cy18UFSM and Cy20UFSM isolates, confirming Koch's postulates. The control plants exhibited 0% *C. pseudofasciculare* re-isolation.

Table 3. Virulence of *Campylocarpon pseudofasciculare* isolates in *Vitis labrusca* cv. Bordô after 4 months of incubation in a greenhouse.

Isolate	Shoot disease severity ^{1,3}	Root disease severity ^{2,3}	% Re-isolation
Control	0.0 a ⁴	0.0 a ⁴	0.0 a ⁴
Cy1UFSM	5.0 c	2.8 b	90.0 c
Cy2UFSM	3.8 c	3.8 b	90.0 c
Cy3UFSM	5.0 c	2.6 b	72.5 b
Cy6UFSM	5.0 c	4.0 b	90.0 c
Cy14UFSM	3.0 c	3.2 b	72.5 b
Cy17UFSM	4.4 c	3.4 b	90.0 c
Cy18UFSM	2.0 b	2.2 b	70.0 b
Cy19UFSM	4.0 c	3.8 b	60.0 b
Cy20UFSM	3.0 c	3.8 b	72.5 b

¹ Shoot symptoms were rated using following scale: 0 = healthy (control treatment), 1 = 0 to 20% shoot mass reduction, 2 = 20 to 40% shoot mass reduction, 3 = 40 to 60% shoot mass reduction, 4 = 60 to 80% shoot mass reduction, 5 = > 80% shoot mass reduction, drying or plant death.

² Root symptoms were rated using the following scale: 0 = healthy with no lesions, 1 = 0 to 10% root mass reduction, 2 = 10 to 25% root mass reduction, 3 = 25 to 50% root mass reduction, 4 = > 50% root mass reduction, 5 = death. Adapted from Alaniz et al. (2).

³ Transformed means ($\sqrt{x + 1}$).

⁴ Means in the same column followed by the same letter are not significantly different (Scott-Knott, $p \leq 0.05$).

DISCUSSION

The present work is the first study of *Campylocarpon pseudofasciculare* isolates obtained from vineyards from Rio Grande do Sul, Brazil. The multi-gene analysis of nine isolates led to the identification of *Campylocarpon pseudofasciculare* associated with black foot disease in different grapevine genetic materials from southern Brazil. The other species of the genus, *C. fasciculare*, has also been associated with grapevines from other locations (3, 10, 19). The isolates used in the present study were obtained from symptomatic grapevines, similarly to the study performed in Uruguay by Abreo et al. (1). Halleen et al. (19) obtained isolates from asymptomatic plants in South African vineyards.

Abreo et al. (1), using only ITS, separated isolates associated with the black foot disease into six species, including *C. pseudofasciculare*. High bootstrap values were also reported for the sequencing of the ITS rDNA region and β -tubulin, grouping the two *Campylocarpon* species in different clades (19). Alaniz et al. (2) reported little variation in partial sequences of β -tubulin obtained from several *Ilyonectria macrodidyma* isolates. There are few sequences deposited in GenBank for *Campylocarpon*, which makes it more difficult to perform phylogeny studies. Cabral et al. (6, 8) analyzed isolates of the *I. macrodidyma* and *I. radiculicola* complex and observed histone H3 as a more efficient region for differentiating the species. The combination of sequencing results from different DNA regions increases the reliability of the identification at the species level.

The use of molecular DNA analysis techniques has allowed the development of fast, sensitive and specific methods for phytopathogen diagnosis, as a complement of morphological analysis (28). The Rayner (23) color chart, used in the present study for the morphological analysis of the colony color, is widely used in studies of the causal agents of black foot disease of grapevine (6, 8, 24).

Halleen et al. (19) reported that *C. fasciculare* and *C. pseudofasciculare* are phylogenetically close. The authors expected to find conidiophore fascicles in *C. pseudofasciculare* but only observed isolated conidiophores, mostly branched. However, *C. pseudofasciculare* exhibited low sporulation and no conidiophore fascicles, which could be an artifact of culturing the fungus in sub-optimal conditions. In the present study, conidiophore fascicles were observed in *C. pseudofasciculare* isolates. The macroconidia biometric parameters obtained in the present study were similar to the ones observed by Halleen et al. (19) for two *C. pseudofasciculare* isolates, except for the presence of macroconidia with one-

sptate, observed this work. *C. fasciculare* has been reported to display macroconidia with 3 septa measuring (37.5-) 47.9 (-52.5) x (6.25-) 7.5 (-8.75) μm (3).

According to Abreo et al. (1), the presence of chlamydospores is the main characteristic that separates the two known *Campylocarpon* species. Species of the genus *Campylocarpon*, although similar to individuals of the *Neonectria mammoidea* complex in terms of macroconidia morphology, can be distinguished by the brownish color of the colony, as opposed to violet color, and by the production of brownish hyphae (19). *N. mammoidea* was also associated with grapevine black foot in USA and Canada (22).

The pathogenicity test showed that all the isolates studied resulted in symptoms typical of black foot disease in American grapevines cv. Bordô, affecting both roots and shoots. Grapevines cv. Bordô also exhibited symptoms typical of the disease when inoculated with “*C.*” *destructans* (14). Grapevines inoculated with *C. fasciculare* displayed symptoms after 20 days, consisting in decreased vigor, chlorosis and interveinal necrosis in leaves, necrotic lesions with decrease of root mass and plant death (3).

Alaniz et al. (2) tested the pathogenicity of *I. macrodidyma* and *I. lirioidendri* isolates, which also cause black foot disease, in 110 R (*V. rupestris* x *V. Berlandieri*) rootstocks and observed lower values of symptom severity in roots (between 0.93 and 2.15) than the values observed in the present study. This difference is possibly due to genetic diversity between the fungal species causing black foot disease and also to the plant material used in the assay, exhibiting different levels of susceptibility. Inoculation with *C. pseudofasciculare* obtained from roots of asymptomatic nursery grapevines from South Africa led to the death of approximately 17.5% of cv. Ramsey plants (19).

In summary, *Campylocarpon pseudofasciculare* is associated with grapevines exhibiting typical symptoms of black foot disease in southern Brazil. The isolates displayed different morphological characteristics, and less pronounced differences in the multi-gene analysis, and were pathogenic for *V. labrusca* cv. Bordô. The present study will serve as the base for future studies of black foot disease epidemiology and forms of pathogen control.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the master’s scholarship granted to the first author.

LITERATURE CITED

1. Abreo, E., Martínez, S. Betucci, L., and Lupo, S. 2010. Morphological and molecular characterization of *Campylocarpon* and *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot disease of grapevines in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 39: 446-452.
2. Alaniz, S., Leon, M., García-Jiménez, J., Abad, P., and Armengol, J. 2007. Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black-foot disease of grapevine in Spain. *Plant Disease* 91: 1187-1193.
3. Alaniz, S., Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., Aguilar, M. I., Pérez-Sierra, A., and Armengol, J. 2011. First report of *Campylocarpon fasciculare* causing black foot disease of grapevine in Spain. *Plant Disease* 95: 1028-1029.
4. Álvarez, L. A., Tamayo, D., Castilla, C., Munive, C., Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., and Armengol, J. 2012. Occurrence of grapevine trunk pathogens in nurseries and vineyards in the northern and southern coast of Peru. *Phytopathologia Mediterranea* 51: 425.
5. Brayford D., 1992. *Cylindrocarpon*. In: *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. (L.L. Singleton, J.D. Mihail, C.M. Rush, ed.), American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA. 103-106.
6. Cabral, A., Groenewald, J. Z., Rego, C., Oliveira, H., and Crous, P. W. 2012a. *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radiculicola* species complex. *Mycological Progress* 11: 655-688.
7. Cabral, A., Rego, C., Crous, P. W., and Oliveira, H. 2012b. Virulence and cross-infection potential of *Ilyonectria* spp. to grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 51: 340-354.
8. Cabral, A., Rego, C., Nascimento, T., Oliveira, H., Groenewald, J. Z., and Crous, P. W. 2012c. Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. *Fungal Biology* 116: 62-80.
9. Chaverri, P., Salgado, C., Hirooka, Y., Rossman, A. Y., and Samuels, G. J. 2011. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Studies in Mycology* 68: 57-78.

10. Correia, K. C., Câmara, M. P. S., Barbosa, M. A. G., Sales Jr., R., Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P., Armengol, J., and Michereff, S. J. 2012. Fungal species associated with trunk diseases of table grapes in Northeastern Brazil. *Phytopathologia Mediterranea* 51: 427.
11. Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant molecular biology reporter* 1: 19-21.
12. FAOSTAT. Statistic division of Food and Agricultural Organization of the United Nations. 2013. Available in: <<http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>>. Accessed: august 16th, 2013.
13. Ferreira, D. F. 2010. Sisvar versão 5.3 (Biud 75). Sistemas de análises de variância para dados balanceados: Programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos [Variance analysis system for balanced data: Statistical analysis and experimental design program]. Lavras, Universidade Federal de Lavras.
14. Garrido, L. R., Sônego, O. R., and Urben, A. F. 2004. *Cylindrocarpon destructans* causador do “pé-preto” da videira no Rio Grande do Sul [*Cylindrocarpon destructans* causal agent of grapevine black-foot in Rio Grande do Sul]. *Fitopatologia Brasileira* 29: 548-550.
15. Glass, N. L., and Donaldson, G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323-1330.
16. Gramaje, D., and Armengol, J. 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease* 95: 1040-1055.
17. Grasso, S., and Magnano Di San Lio, G. 1975. Infezioni di *Cylindrocarpon obtusisporum* su piante di vite in Sicilia. *Vitis* 14: 38-39.
18. Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series* 41: 95-98.
19. Halleen, F., Schroers, H. J., Groenewald, J. Z., and Crous, P. W. 2004. Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black-foot disease of grapevines (*Vitis* spp). *Studies in Mycology* 50: 431-455.

20. Halleen, F., Fourie, P. H., and Crous, P. W. 2006. A review of black foot disease of grapevine. *Phytopatologia Mediterranea* 45: 55-67.
21. Mohammadi, H., Alaniz, S., Banihashemi, Z., and Armengol, J. 2009. Characterization of *Cylindrocarpon liriodendri* associated with black foot disease of grapevine in Iran. *Journal of Phytopathology* 157: 642-645.
22. Petit, E., Barriault, E., Baumgartner, K., Wilcox, W. F., and Rolshausen, P. E. 2011. *Cylindrocarpon* species associated with black-foot of grapevine in northeastern United States and southeastern Canada. *American Journal of Enology and Viticulture* 62: 177-183.
23. Rayner, R. W. 1970. *A Mycological Colour Chart*. British Mycological Society and CAB International Mycological Institute, Kew.
24. Reis, P. 2010. Caracterização de fungos do género *Cylindrocarpon* obtidos numa vinha com sintomas de declínio. Master's Dissertation. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. 71 p.
25. Santos, R. F., Blume, E., Muniz, M. F. B., Heckler, L. I., Finger, G., Maciel, C. G., Harakava, R., and Garrido, L. R. 2013. First report of *Ilyonectria macrodidyma* associated with black foot disease of grapevine in Brazil. *Plant Disease* (in press).
26. Schmitz, A., and Riesner, D. 2006. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical Biochemistry* 354: 311–313.
27. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*. 24: 1596-1599.
28. Teixeira, H., Vieira, M., and Machado, J. C. 2004. Marcadores RAPD na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. *Fitopatologia Brasileira* 29: 651-655.
29. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18: 315-322.

CAPÍTULO 7

Trichoderma spp. E *Bacillus subtilis* NO CONTROLE DE *Ilyonectria macrodidyma* EM VIDEIRA

Journal of Agricultural Science: em preparação

RESUMO

A doença pé-preto, causada principalmente por espécies do gênero *Ilyonectria* e *Campylocarpon* afeta tanto videiras jovens quanto adultas, diminuindo a produtividade e longevidade dos vinhedos. Por se tratar de um patógeno de solo, a doença tem limitadas possibilidades de controle. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar diferentes produtos comerciais à base de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* no controle de *Ilyonectria macrodidyma*. Foram realizados ensaios *in vitro*, avaliando a inibição do crescimento micelial do patógeno por meio do teste de metabólitos voláteis e pareamento de culturas. Além disso, está sendo realizado experimento *in vivo* avaliando o potencial de biocontrole dos antagonistas sobre o patógeno em mudas de *Vitis vinifera* Merlot enxertada em Paulsen 1103. No ensaio de metabólitos voláteis, o valor médio de inibição do crescimento micelial nos tratamentos com uso de *Trichoderma* foi de 53,82%. No experimento de pareamento de culturas, utilizando dois isolados de *Bacillus subtilis*, o tratamento *B. subtilis* - Rizolyptus apresentou valores de inibição de 40,84% enquanto *B. subtilis* - Rizos reduziu 29,50%. Este estudo apresenta *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* como agentes potenciais de biocontrole de *Ilyonectria macrodidyma*.

Palavras-chave: *Vitis* spp., doença pé-preto, patógeno de solo, controle biológico.

INTRODUÇÃO

Desde 1990, o declínio de videiras jovens e falhas de material de plantio têm afetado a produção de uvas com a finalidade de passa, mesa e produção de vinho (Gramaje & Armengol, 2011). O pé-preto da videira é uma das principais doenças do lenho associada ao declínio de videiras, causado por um complexo de fungos habitantes de solo. Dentre as espécies associadas à doença, destacam-se *Ilyonectria liriodendri* (Halleen et al.) P. Chaverri & C. Salgado e *Ilyonectria macrodidyma* (Halleen, Schroers & Crous) P. Chaverri & C. Salgado, consideradas as mais virulentas e comumente encontradas nas principais regiões produtoras de uva do planeta (Petit et al., 2011).

Os fungos do gênero *Ilyonectria* (anamorfo: “*Cylindrocarpon*” Wollew.) são habitantes do solo, saprófitas, colonizadores radiculares ou patógenos frequentemente associados com raízes de plantas herbáceas e lenhosas (Brayford, 1993). Clamidósporos são geralmente presentes, possivelmente como uma adaptação para a sobrevivência no solo (Chaverri et al., 2011). Além disso, apresentam grande adaptação podendo ser encontrados desde regiões tropicais até temperadas (Chaverri et al., 2011).

No Brasil, desde 1999, vem sendo observada a morte de videiras devido a doença pé-preto (Garrido et al., 2004), necessitando a substituição de plantas no vinhedo e diminuindo a vida útil das videiras. Plantas infectadas pelo patógeno apresentam sintomas de escurecimento na região do colo, apodrecimento de raízes, escurecimento de vasos, redução do vigor, murchamento repentino de parte aérea, declínio e morte de plantas (Garrido et al., 2004). Adicionalmente a esses sintomas, Santos et al. (in press) relataram redução de massa de raízes e necrose nas nervuras foliares.

Devido à importância da doença em nível mundial nos últimos anos, algumas formas de controle vêm sendo estudadas para o controle da doença pé-preto. Uma estratégia para o controle envolve o uso do controle biológico, sendo espécies do gênero *Trichoderma* Persoon amplamente utilizadas na agricultura, uma vez que são capazes de atuar como agentes de biocontrole de doenças de várias plantas cultivadas, promotores de crescimento, promotores de tolerância ao estresse através do aumento de raiz e crescimento da planta e indutores de resistência de plantas a doenças (Harman, 2000). *Trichoderma harzianum* Rifai, tem sido relatado com agente potencial de biocontrole de fungos causadores de doenças do lenho em videira, incluindo *Phaeomoniella chlamydospora* Crous & W. Gams Crous & W. Gams, *Phaeoacremonium* W. Gams, Crous & M. J. Wingf., “*Cylindrocarpon*”, *Botryosphaeria* Ces.

& De Not. e *Phomopsis* Sacc. (Fourie et al., 2001; Fourie & Halleen, 2006). Em videira, *Trichoderma* spp. foi estudado como agente protetor de feridas da poda contra patógenos do lenho (Halleen et al., 2010; Kotze et al., 2011; Mutawila et al., 2011), indução de resistência sistêmica contra *Plasmopara viticola* (Berk. & M. A. Curtis) Berl. & De Toni (Perazzoli et al., 2008). Além de *Trichoderma*, *Gliocladium* Corda, *Bacillus* Cohn, *Pseudomonas* Migula e *Streptomyces* Waksman & Henrici são os agentes de biocontrole de doenças mais efetivos (Susi et al., 2011). Em videira, *Bacillus subtilis* suprimiu o crescimento de *Botrytis cinerea* Pers. Fr. e *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Saccardo em experimentos *in vitro*, e reduziu a manifestação de sintomas de míldio causado por *Plasmopara viticola* em frutos e folhas (Furuya et al., 2011). Fu et al. (2010) avaliando 836 cepas de bactérias isoladas da rizosfera de ginseng (*Panax quinquefolius* L.) encontrou 10 cepas com forte atividade de antibiose a “*Cylindrocarpon*” *destructans*. Sobretudo, existe uma carência de informações de como esses organismos se comportam no controle de *Ilyonectria macrodidyma*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* no controle *in vitro* e *in vivo* de *Ilyonectria macrodidyma* em mudas de videira cv. Merlot enxertada em Paulsen 1103.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de *Ilyonectria macrodidyma*

Isolados de *Ilyonectria macrodidyma* foram obtidos de videiras com sintomas da doença pé-preto, oriundas de diferentes vinhedos georreferenciados do estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Tabela 1), no ano de 2012 (Santos et al., in press). Plantas sintomáticas apresentavam redução de massa de raízes, necrose em raízes e coroa, atraso de brotação, redução de vigor, murchamento de parte aérea e morte de planta. Os isolados estavam armazenados em tubos de ensaio contendo meio de cultura spezieller nährstoffarmer agar (SNA) na micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.

Tabela 1. Isolados de *Ilyonectria macrodidyma* utilizados neste estudo.

Isolado	Origem (cidade)	Porta enxerto/enxerto	Acesso Genbank (Histona H3)
Cy4UFSM	Erechim	VR 043-43/Isabel	KF633167
Cy5UFSM	Garibaldi	Niágara Branca*	KF633168
Cy7UFSM	Garibaldi	16149/ Isabel	KF633170
Cy10UFSM	Bento Gonçalves	Paulsen 1103/Burdin	KF633154
Cy11UFSM	Bento Gonçalves	Gravesac/Merlot	KF633155
Cy15UFSM	Flores da Cunha	Niágara Branca*	KF633159
Cy16UFSM	Flores da Cunha	Bordô*	KF633160

*Cultivar enraizada.

Produtos testados

Produtos formulados à base de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* foram testados em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Além dos tratamentos com os micro-organismos utilizou-se um tratamento com fungicida químico, ingrediente ativo (i.a.) Benomyl, no ensaio *in vivo* (Tabela 2).

Tabela 2. Características dos sete produtos estudados.

Tratamento	Espécie	Concentração (células viáveis mL ⁻¹)	Formulação	Marca comercial	Empresa
T1	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	2x10 ⁹	suspensão concentrada	Trichodermil SC1306	Itaforte Bio Produtos
T2	<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. & Nirenberg	1,5x10 ¹⁰	pó molhável	TrichoderMax WP Plus	Novozymes BioAg
T3	<i>Trichoderma asperellum</i>	1x10 ¹⁰	grânulos dispersíveis em água	Quality WG	Grupo Farroupilha
T4	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma</i> <i>viride/atroviride</i> , <i>Trichoderma viride</i> . Pers.	1x10 ⁹	suspensão concentrada	Trichodel	Empresa Caxiense de Controle Biológico Ltda
T5	<i>Bacillus subtilis</i> Cohn	5x10 ⁹	suspensão concentrada	Rizos	Grupo Farroupilha
T6	<i>Bacillus subtilis</i>	1x10 ⁸	suspensão concentrada	Rizolyptus	Grupo Biosoja
	Ingrediente ativo	Concentração (ingrediente ativo)	Formulação	Marca comercial	Empresa
T7	Benomyl	50%	pó molhável	Benlate 500	Du Pont

Testes *in vitro*

Metabólitos voláteis

A influência de metabólitos voláteis produzidos pelos agentes de biocontrole na inibição do crescimento micelial de *Ilyonectria macrodidyma* foi observada utilizando as duas superfícies de placas de Petri, fixadas uma a outra. Para esse ensaio, foram utilizadas placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA. Colônias de *Trichoderma* spp. foram obtidas de alíquotas dos produtos (Tabela 2) plaqueadas em meio BDA, 10 dias antes da instalação do ensaio. Um disco micelial do patógeno, com 8 mm de diâmetro e 10 dias de crescimento, foi repicado para o centro da uma placa e para a outra placa, um disco micelial de *Trichoderma* com a mesma dimensão. Para tratamentos em que foi avaliada a ação de

Bacillus subtilis, procedeu-se o método de estrias paralelas derivadas das suspensões bacterianas (Monteiro et al., 2013). As duas partes foram fixadas uma à outra e vedadas com película flexível, a fim de evitar a saída dos metabólitos. Como tratamento testemunha utilizou-se somente o patógeno na placa. As placas foram mantidas a 25 °C, em escuro. A avaliação ocorreu após 14 dias da repicagem do antagonista, determinando o diâmetro médio das colônias do patógeno, medindo em dois sentidos perpendiculares com auxílio de um paquímetro digital. Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial do patógeno utilizou-se a fórmula de Erdogan & Benlioglu (2010): $[(\text{Tratamento} - \text{controle}) / \text{controle} \times 100]$. Cinco placas por tratamento foram utilizadas como repetições.

Pareamento de culturas

Para esse ensaio *in vitro* foi empregado o método de cultura pareada. Dois discos miceliais de 8 mm de diâmetro foram repicados para placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA em dois sentidos opostos, à 0,5 cm da borda da placa. Em uma das extremidades foi colocado o disco do patógeno (Tabela 1) e na extremidade oposta, 14 dias após, um disco de *Trichoderma* obtido do produto comercial (Tabela 2). Para avaliar o efeito de *Bacillus subtilis*, foi depositado no centro da placa um cilindro de meio de cultura BDA de 8 mm de diâmetro contendo estruturas do patógeno. Decorridos quatro dias, 10 µL de suspensão bacteriana (10^8 ufc mL⁻¹) foram simetricamente dispostas em 4 sítios equidistantes (3 cm) do centro da placa.

Como tratamento testemunha utilizou-se somente o patógeno na placa. As placas foram mantidas a 25 °C, em escuro. A avaliação ocorreu após 14 dias da repicagem do antagonista, determinando o diâmetro das colônias do patógeno. Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial, utilizou-se a fórmula de Erdogan & Benlioglu (2010): $[(\text{Tratamento} - \text{controle}) / \text{controle} \times 100]$. Cinco placas por tratamento foram utilizadas como repetições.

Teste *in vivo*

O potencial de biocontrole *in vivo* foi avaliado utilizando diferentes produtos à base de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (Tabela 2) no controle de *Ilyonectria macrodidyma* em videira. Foram utilizadas 10 enxertos-prontos, com um ano de idade, cv. Merlot enxertada em Paulsen 1103 para cada tratamento. O substrato de transplantio (substrato comercial Mec Plant, 80% e areia, 20%) foi infestado com agentes de biocontrole 14 dias antes da instalação do ensaio, aplicando 10^4 ufc g^{-1} de substrato. Simultaneamente ao transplantio, procedeu-se a infestação do substrato com o isolado altamente agressivo Cy5UFSM (Santos et al., in press) na concentração de 5×10^5 esporos g^{-1} de substrato (Alaniz et al., 2011). Mudanças foram transplantadas para sacos plásticos com volume de 1 L. Além dos tratamentos com os microorganismos utilizou-se um tratamento com fungicida, ingrediente ativo Benomyl (Rego et al., 2006), na dose de $0,45 g L^{-1}$ num volume de 1 L de calda para 10 L de substrato (T7), um com apenas o patógeno (T8) e outro com água destilada e esterilizada, testemunha absoluta (T9). Trinta dias após a instalação do ensaio os tratamentos com *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* receberam uma nova infestação com a mesma concentração. As plantas foram mantidas por quatro meses em casa de vegetação a 25 °C e fotoperíodo 12 h.

Após quatro meses de incubação as plantas foram retiradas das embalagens e o sistema radicular lavado em água corrente. Foi avaliado o comprimento da maior raiz formada, comprimento do maior broto formado, peso da matéria seca de parte aérea e raiz e a taxa de reisolamento do patógeno. A massa seca foi obtida após secagem do material vegetal em estufa com ventilação forçada a 60 °C, até atingir peso constante. Para reisolamento do patógeno, 10 fragmentos de tecido lenhoso da região basal (2 cm acima da extremidade inferior da estaca) de cada planta foram desinfestados superficialmente com banho em álcool (70%) hipoclorito de sódio (1%) e três banhos de água destilada e esterilizada, cada um por um minuto. Os fragmentos foram secos em papel filtro esterilizado e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA acrescido de 0,5 g de sulfato de estreptomicina L^{-1} de meio. As placas foram incubadas a 25 °C por 14 dias, no escuro. Decorrido esse período, foi calculada a proporção de fragmentos de tecido lenhoso a partir dos quais colônias de *Ilyonectria macrodidyma* foram recuperadas, em relação ao número total de fragmentos obtidos de cada planta.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Para experimentos *in vitro* foi utilizado esquema bifatorial, Fator A (isolados do patógeno) x Fator D (isolados do antagonista). Foi realizada análise estatística separada para *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. devido à variação da instalação do ensaio e comportamento dos micro-organismos. Para o experimento *in vivo* foi utilizado esquema unifatorial. A análise estatística constou da análise de variância dos dados transformados por $\sqrt{(x + 0,5)}$ e, quando constatado efeito significativo, realizou-se comparação das médias através do teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade. Para as análises, utilizou-se o software SISVAR 5.3 (Sistema de Análise de Variância Para Dados Balanceados) (Ferreira, 2010).

RESULTADOS

Testes *in vitro*

Metabólitos voláteis

Para o teste de metabólitos voláteis, todos os tratamentos com isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* inibiram o crescimento dos sete isolados de *Ilyonectria macrodidyma*, através da produção de metabólitos voláteis (Tabela 3). Para o ensaio utilizando *Trichoderma* spp. no controle de isolados de *I. macrodidyma*, houve interação significativa entre os fatores. A maior redução do crescimento micelial do patógeno foi observada no tratamento T1 (*Trichoderma harzianum* - Trichodermil SC1306), 64,30%, seguida pelo T4 (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride/atroviride* e *Trichoderma viride* - Trichodel), 55,20%, T2 (*Trichoderma asperellum* - TrichoderMax WP Plus), 52,17%, e T3 (*Trichoderma asperellum* - Quality WG), 43,61%. O isolado Cy10UFSM apresentou a menor porcentagem de inibição, se comparado aos demais isolados de *I. macrodidyma*.

Para tratamentos à base de *Bacillus subtilis* no controle de isolados de *I. macrodidyma*, apenas houve diferença significativa entre isolados do patógeno. Não houve diferença entre os isolados obtidos dos produtos em teste. A porcentagem de inibição de crescimento micelial média dos dois isolados foi superior a 40%.

Tabela 3. Inibição de crescimento micelial (%) de isolados de *Ilyonectria macrodidyma* expostos a metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* *in vitro*.

Inibição de crescimento micelial de <i>I. macrodidyma</i>								
------(%)-----								
Trat. ¹	Cy4UFMS	Cy5UFMS	Cy7UFMS	Cy10UFMS	Cy11UFMS	Cy15UFMS	Cy16UFMS	Média
T1	66,15 bB ^{2,3}	71,49 bB	66,18 bB	49,15 dA	62,74 bB	68,81 bB	65,57 bB	64,30 d
T2	61,13 bB	63,11 bB	50,50 aB	04,58 aA	65,64 bB	59,01 bB	61,22 bB	52,17 b
T3	45,82 aB	44,35 aB	58,64 bB	12,28 bA	47,36 aB	50,38 aB	46,47 aB	43,61 a
T4	67,86 bC	53,08 aB	51,12 aB	36,60 cA	61,61 bC	63,54 bC	52,68 aB	55,20 c
Média	60,23 B	58,00 B	56,61 B	25,65 A	59,34 B	60,43 B	56,48 B	
CV (%)	6,76							
T5	40,88 aA	50,54 aA	32,92 aA	47,89 aA	50,92 aA	47,23 aA	68,84 aA	44,42 a
T6	45,53 aA	48,45 aA	41,03 aA	33,22 aA	44,18 aA	29,45 aA	69,05 aB	48,46 a
Média	43,21 A	49,49 A	36,98 A	40,54 A	47,55 A	38,34 A	68,95 B	
CV (%)	15,59							

¹ Tratamento: **T1:** *Trichoderma harzianum* (Trichodermil SC1306); **T2:** *Trichoderma asperellum* (TrichoderMax WP Plus); **T3:** *Trichoderma asperellum* (Quality WG); **T4:** *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride/atroviride*, *Trichoderma viride* (Trichodel); **T5:** *Bacillus subtilis* (Rizos); **T6:** *Bacillus subtilis* (Rizolyptus).

² Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

³ Dados transformados ($\sqrt{(x + 0,5)}$).

Pareamento de culturas

Para o ensaio de pareamento de culturas, *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* apresentaram antagonismo ao patógeno. Para ambos houve interação entre os fatores (antagonista) x (*I. macrodidyma*). O melhor tratamento à base de *Trichoderma* foi o T4, diferindo dos demais. A porcentagem de inibição ficou próxima a 40% para os isolados

obtidos dos quatro produtos testados. O maior controle foi observado para o isolado Cy10UFSM (46,65%), seguido de Cy15UFSM (42,30%) (Tabela 4).

No ensaio avaliando *B. subtilis*, T6 (Rizolyptus) reduziu o crescimento micelial médio dos sete isolados em 40,84%, sendo superior ao T5 (Rizos) que inibiu o desenvolvimento micelial em 29,50%. O maior controle médio dos dois produtos foi observado para o isolado Cy11UFSM (40,93%), que diferiu dos demais.

Tabela 4. Inibição do crescimento micelial (%) de isolados de *Ilyonectria macrodidyma* em cultivo pareado com isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* *in vitro*.

Inibição de crescimento micelial de <i>I. macrodidyma</i>								
------(%)-----								
Trat. ¹	Cy4UFSM	Cy5UFSM	Cy7UFSM	Cy10UFSM	Cy11UFSM	Cy15UFSM	Cy16UFSM	Média
T1	33,85 aA ^{2,3}	37,12 aA	34,46 aA	45,56 aB	38,63 aA	41,69 aB	34,96 aA	38,04 a
T2	34,21 aA	37,47 aA	44,03 bB	48,09 aC	35,16 aA	40,90 aB	35,54 aA	39,34 a
T3	44,19 bB	38,24 aA	40,93 bA	47,34 aB	37,16 aA	40,62 aA	41,30 bA	41,39 b
T4	44,20 bA	40,88 aA	42,78 bA	45,62 aA	40,85 aA	46,01 aA	43,72 bA	43,43c
Média	39,11 A	38,43 A	40,55 A	46,65 C	37,95 A	42,30B	38,88 A	
CV (%)	3,96							
T5	26,75 aB	26,49 aB	20,93 aA	32,80 aC	36,05 aC	34,00 aC	29,47 aC	29,50 a
T6	50,57 bD	37,39 bB	29,78 bA	38,98 bB	45,81 bC	40,50 bB	42,87 bC	40,84 b
Média	38,66 C	31,94 B	25,36 A	35,89 C	40,93 D	37,25 C	36,17 C	
CV (%)	4,77							

¹ Tratamento: **T1**: *Trichoderma harzianum* (Trichodermil SC1306); **T2**: *Trichoderma asperellum* (TrichoderMax WP Plus); **T3**: *Trichoderma asperellum* (Quality WG); **T4**: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride/atroviride*, *Trichoderma viride* (Trichodel); **T5**: *Bacillus subtilis* (Rizos); **T6**: *Bacillus subtilis* (Rizolyptus).

² Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

³ Dados transformados ($\sqrt{(x + 0,5)}$).

Teste *in vivo*

No momento da redação desta dissertação o experimento *in vivo* encontra-se em andamento e, portanto, ainda não existem resultados para serem relatados.

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra o potencial de biocontrole de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* contra *Ilyonectria macrodidyma*. Espécies do gênero *Trichoderma* podem reduzir a severidade de doenças em plantas pela inibição de fitopatógenos no solo através de seu elevado potencial antagonista e atividade micoparasítica (Viterbo & Horwitz, 2010; Hermosa et al., 2012). Lopes et al. (2012) detectaram correlação positiva entre a produção de metabólitos voláteis e a capacidade antagonista de diferentes espécies de *Trichoderma* contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Neste trabalho, o valor médio de inibição foi 53,82%, superior aos valores obtidos por Lopes et al (2012), que verificaram inibição na ordem de 8,33 a 55,50%, sendo 24,94% o valor médio. Ávilla et al. (2005), avaliando diferentes isolados de *T. harzianum* e *T. atroviride* P. Karst., verificaram que houve variação na produção de substâncias voláteis pelos isolados, variando de 20 a 52,7% na inibição do crescimento de *S. sclerotiorum*. *T. harzianum* e *T. viride* inibiram o crescimento de *Rhizoctonia solani* J. G. Kühn em 40 e 50%, respectivamente (Seema & Devaki, 2012).

Fiddaman & Rossall (1993) sugeriram a produção de voláteis antifúngicos por *B. subtilis*, sendo considerado mais um modo de ação disponível para essa bactéria no controle de fungos. Diversas espécies de *Bacillus* produzem substâncias antibióticas (iturina A, fengicina e surfactina) (Romero et al., 2007) que desempenham papel importante no controle biológico de fungos patogênicos de plantas. Em particular, ensaios *in vitro* demonstram que metabólitos estáveis ao calor de *Bacillus subtilis* AG1 podem inibir o crescimento de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., agente causal das podridões de tronco e raízes da videira (Alfonzo et al., 2009). Neste ensaio, os dois isolados de *Bacillus subtilis* obtidos de produtos comerciais inibiram em 44,42 e 48,46% o crescimento de *I. macrodidyma*. Monteiro et al. (2013) verificou redução de 83,84% do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary quando submetidos a metabólitos voláteis de *B. subtilis*.

No cultivo pareado de *Trichoderma* spp. e *I. macrodidyma* observaram-se valores de inibição próximos a 40% para os quatro isolados. T4 (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride/atroviride* e *Trichoderma viride*) apresentou os melhores resultados, diferindo dos demais tratamentos. Bomfim et al. (2010) verificaram que *T. viride* e *T. harzianum* obtiveram os melhores resultados na técnica do pareamento no controle de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., agente causal da podridão floral do maracujazeiro.

Sharfuddin & Mohanka (2012) encontrou valores de 71 a 82,8% de inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum* Schlecht emend. Snyder and Hansen f. sp. *lentis* Vasudeva and Srinivasan em confronto com diferentes isolados de *Trichoderma* spp. Essa colonização bem sucedida de um determinado habitat, neste caso a placa de Petri contendo meio, por qualquer organismo é crucialmente dependente do potencial de defesa de seu nicho ecológico e crescimento, além da concorrência de nutrientes, espaço e luz (Schuster & Schmoll, 2010). A competição por carbono, nitrogênio e outros fatores que envolvem o crescimento, juntamente com a competição por espaço ou sítios específicos de infecção, também podem ser utilizados pelos agentes de biocontrole para controlar fitopatógenos (Vinale et al., 2008). No pareamento de culturas, o tratamento *Bacillus subtilis* - Rizolyptus apresentou valores de inibição superiores ao *Bacillus subtilis* - Rizos. Karimi et al. (2012) observaram que isolados de *B. subtilis* apresentaram melhores resultados que isolados de *Pseudomonas* spp., destacando-se o isolado *B. subtilis* B28 com 51,16% de inibição de crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (Padwick) Sato & Matuo. *Bacillus subtilis* KS1 inibiu o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. e *Botrytis cinerea* Pers., resultando em uma ampla zona de inibição nas placas (Furuya et al., 2011). Ashwini & Srividya (2013) verificaram *B. subtilis* inibindo o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* Schltdl. (40%) e *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (41%). *Bacillus* spp. oferecem várias vantagens sobre outras bactérias devido à sua capacidade para formar endósporos e a atividade de largo espectro de seus antibióticos (Cavaglieri et al., 2005). Compant et al. (2013) destacam estirpes bacterianas de biocontrole e os seus metabólitos tendo efeito direto sobre o crescimento de fungos causadores de doenças do lenho da videira por inibição do crescimento micelial e inibição das atividades enzimáticas fúngicas.

A discussão do experimento *in vivo* não foi realizada em virtude dos resultados ainda não terem sido obtidos.

REFERÊNCIAS

Alaniz, S., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J. & Armengol, J. (2011). Evaluation of fungicides to control *Cylindrocarpon liriodendri* and *Cylindrocarpon macrodidymum* *in vitro*, and their effect during the rooting phase in the grapevine propagation process. *Crop Protection*, 30 (4), 489-494.

Alfonzo, A., Conigliaro, G., Torta, L. I. V. I. O., Burruano, S., & Moschetti, Gianca, R. L. O. (2009). Antagonism of *Bacillus subtilis* strain AG1 against vine wood fungal pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 48 (1), 155-158.

Ashwini, N., & Srividya, S. (2013) Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech*, 1-10.

Ávilla, Z. R.; Carvalho, S. S.; Braúna, L. M.; Gomes, D. M. P. A., Silva, M. C. F., & Mello, S. C. M. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Brasília, DF. Embrapa Recursos Genéticos, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 117, 2005, 30p.

Bomfim, M. P., São José, A. R., Rebouças, T. N. H., Almeida, S. S. D., Souza, I. V. B., & Dias, N. O. (2010). Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. *Summa Phytopathologica*, 36 (1), 61-67.

Brayford, D. *Cylindrocarpon*. In Singleton L. L., MIHAIL J. D.; RUSH C. M. Eds. *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. APS Press, St. Paul, Minnesota. 1993, p. 103-106.

Cavaglieri, L., Orlando, J. R. M. I., Rodriguez, M. I., Chulze, S., & Etcheverry, M. (2005). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. *Research in Microbiology*, 156, 748-754.

Chaverri, P., Salgado, C., Hirooka, Y., Rossman, A. Y., & Samuels, G. J. (2011). Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Studies in Mycology*, 68 (1), 57-78.

Compant, S., Brader, G., Muzammil, S., Sessitsch, A., Lebrhi, A., & Mathieu, F. (2012). Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *BioControl*, 58, 435-455.

Erdogan, O., & Benlioglu, K. (2010). Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions. *Biological Control*, 53, 39-45.

Ferreira DF (2010). Sisvar versão 5.3 (Biud 75). *Sistemas de análises de variância para dados balanceados: Programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos*. Lavras, Universidade Federal de Lavras.

Fiddaman, P. J., & Rossall, S. (1993). The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology*, 74 (2), 119-126.

Fourie, P. H. Halleen, F., Vyver, J. V. D., & Schreuder, W. (2001) Effect of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 40 (3), 473-78.

Fourie, P. H., & Halleen, F. (2006). Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 116 (4), 255-265.

Fu, J. F., Shi, H. Y., Zhou, R. J., Yan, X. R., & Shi, J. H. (2010) Isolation screening and identification of antagonistic bacteria against ginseng rusted root disease. *Journal of Jilin Agricultural University*, 32 (2), 136-139.

Furuya, S., Mochizuki, M., Aoki, Y., Kobayashi, H., Takayanagi, T., Shimizu, M., & Suzuki, S. (2011). Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KS1 for the biocontrol of grapevine fungal diseases. *Biocontrol Science and Technology*, 21, (6) 705-720.

Garrido, L. D. R., Sônego, O. R., & Urben, A. F. (2004). *Cylindrocarpon destructans* causador do “Pé-Preto” da videira no Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira*, 29 (5), 548-550.

Gramaje, D., & Armengol, J. (2011). Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease*, 95 (9), 1040-1055.

Harman, G. E. (2000) Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84 (4), 377-393.

Halleen, F., Fourie, P. H., & Lombard, P. J. (2010). Protection of grapevine pruning wounds against *Eutypa lata* by biological and chemical methods. *South African Journal for Enology & Viticulture*, 31 (2), 125-132.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158 (1), 17-25.

Karimi, K., Amini, J., Harighi, B., & Bahramnejad, B. (2012). Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. against fusarium wilt of chickpea. *Australian Journal of Crop Science*, 6 (4) 695-703.

Kotze, C., Van Niekerk, J., Halleen, F., Mostert, L., & Fourie, P. (2011). Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, 247-263.

Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Geraldine, A. M., Brandão, R. S., Monteiro, V. N., Júnior, M. L., Coelho, A. S. G., Ulhoa, C. J., & Silva, R. N. (2012). Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology*, 116 (7), 815-824.

Monteiro, F. P., Ferreira, L. C., Pacheco, L. P., & Souza, P. E. (2013). Antagonism of *Bacillus subtilis* against *Sclerotinia sclerotiorum* on *Lactuca sativa*. *Journal of Agricultural Science*, 5 (4), 214-223.

Mutawila, C., Fourie, P., Halleen, F., & Mostert, L. (2011). Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, 264-276.

Perazzolli, M., Dagostin, S., Ferrari, A., Elad, Y., & Pertot, I. (2008). Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. *Biological Control*, 47 (2), 228-234.

Petit, E., Barriault, E., Baumgartner, K., Wilcox, W. F., & Rolshausen, P. E. (2011). *Cylindrocarpon* species associated with black-foot of grapevine in northeastern United States and southeastern Canada. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62 (2), 177-183.

Rego, C., Farropas, L., Nascimento, T., Cabral, A., & Oliveira, H. (2006). Black foot of grapevine: sensitivity of *Cylindrocarpon destructans* to fungicides. *Phytopathologia Mediterranea*, 45 (4), 93-100.

Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J. W., Arrebola, E., Cazorla, F. M., Kuipers, O. P., Paquot, M., & Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20 (4), 430-440.

Santos R. F., Blume, E., Muniz, M. F. B., Heckler, L. I., Finger G., Maciel C. G., Harakava R, Garrido L. R. (in press) First report of *Ilyonectria macrodidyma* associated with black foot disease of grapevine in Brazil. *Plant Disease* <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-13-0424-PDN>.

Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 787-799.

Seema, M., Devaki, N. S. (2012). In vitro evaluation of biological control agents against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Agricultural Technology*, 8 (1), 233-240.

Sharfuddin, C., & Mohanka, R. (2012) *In vitro* antagonism of indigenous *Trichoderma* isolates against phytopathogen causing wilt of lentil. *International Journal of Life Science & Pharma Research*, 2 (3), 195-202.

Susi, P., Aktuganov, G., Himanen, J., & Korpela, T. (2011). Biological control of wood decay against fungal infection. *Journal of Environmental Management*, 92,1681-1689.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 1-10.

Viterbo, A., & Horwitz, B. A. (2010). Mycoparasitism. In *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*, vol. 42, pp. 676–693. Edited by K. A. Borkovich & D. J. Ebbole. Washington: American Society for Microbiology.

CAPÍTULO 8

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da caracterização fenotípica e análise multi-gene (ITS rDNA, β -tubulina e histona H3) dos 20 isolados obtidos de diferentes materiais genéticos de videira com sintomas da doença pé-preto coletados no Rio Grande do Sul, utilizados neste estudo, conclui-se haver nove isolados de *Campylocarpon pseudofasciculare*, oito de *Ilyonectria macrodidyma*, dois de “*Cylindrocarpon*” *pauciseptatum* e um de *Ilyonectria robusta*. Isolados de *C. pseudofasciculare* apresentavam coloração de colônia marrom a castanho, macroconídios levemente curvados predominantemente com 3 septos (37,98 x 6,99 μ m) e ausência de microconídios. Isolados de *I. macrodidyma* variaram na cor de colônia e dimensões de esporos, sendo comum a presença de microconídios. A análise multi-gene informou que a sequência de nucleotídios referentes à histona H3 foi a mais informativa, filogenicamente, para as espécies estudadas.

Estudos de patogenicidade utilizando *Vitis labrusca* cv. Bordô revelaram que todos isolados foram patogênicos, resultando em redução de massa de raízes e de parte aérea, necrose em raízes e base da planta, escurecimento de vasos condutores, secamento de parte aérea e morte de planta. *Ilyonectria robusta* (Cy9UFSM) foi a espécie que apresentou menor severidade de sintomas, tanto para parte aérea quanto para raiz. Para comprovação dos postulados de Koch, procedeu-se o reisolamento dos fungos a partir de fragmentos da base das plantas inoculadas. Colônias fúngicas dos 20 isolados foram recuperadas a partir de fragmentos incubados em meio BDA, por 14 dias. A partir dos ensaios de caracterização morfológica, diversidade genética e patogenicidade pode-se constatar os primeiros relatos de *I. macrodidyma*, *I. robusta* e “*C.*” *pauciseptatum* associados à doença pé-preto da videira no Brasil. *C. pseudofasciculare* já havia sido relatado no nordeste do Brasil, associado a sintomas de declínio de videiras.

Nos ensaios *in vitro*, envolvendo o controle biológico com isolados de *Trichoderma* spp. e de *Bacillus subtilis*, obtidos de diferentes produtos comerciais, observou-se o potencial antagonico desses micro-organismos a *Ilyonectria macrodidyma*. No teste de metabólitos voláteis, *Trichoderma harzianum* (Trichodermil SC1306) inibiu o crescimento micelial em

64,30% dos sete isolados de *I. macrodidyma*. Enquanto isso, *Bacillus subtilis* (Rizos) reduziu 44,42% e *Bacillus subtilis* (Rizolyptus) 48,46%. Para o teste de pareamento de culturas, o valor médio de inibição para os quatro isolados de *Trichoderma* spp. foi de 40,55%. *Bacillus subtilis* (Rizolyptus) foi mais eficiente que *B. subtilis* (Rizos), inibindo em 40,84%. Até o presente momento não ocorreu a avaliação final do experimento *in vivo*, utilizando a cultivar Merlot enxertada em Paulsen 1103. Porém, em avaliação visual observa-se maior volume de brotação nos tratamentos em que foram aplicados os agentes de controle biológico, se comparados ao tratamento que recebeu apenas o patógeno.

Cabe ressaltar que esta dissertação é o primeiro passo para estudos futuros sobre a doença pé-preto da videira, ainda pouco conhecida nas condições do Brasil e América Latina. O estudo etiológico abordado neste trabalho é a primeira etapa para elaborar pesquisas englobando diferentes formas de controle. Por se tratar de um patógeno de solo, o controle químico é dificultado devido à aplicação de produtos químicos nesse ambiente repleto de vida. Sendo assim, o controle biológico vem como uma alternativa sustentável de controle que apresenta bons resultados para diversos patossistemas, incluindo outras doenças do lenho da videira.

APÊNDICE

Apêndice 1. Lista dos isolados estudados.

Isolado	Espécie	Origem (Município)	Porta-enxerto/enxerto
Cy1UFMSM	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	Fagundes Varela	Bordô*
Cy2UFMSM	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	Guaporé	VR 043-43/Violeta
Cy3UFMSM	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	Erechim	Rupestris du Lot/Niágara Rosada
Cy4UFMSM	<i>Ilyonectria macrodidyma</i>	Erechim	VR 043-43/Isabel
Cy5UFMSM	<i>Ilyonectria macrodidyma</i>	Garibaldi	Niágara Branca*
Cy6UFMSM	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	Garibaldi	Niágara Branca*
Cy7UFMSM	<i>Ilyonectria macrodidyma</i>	Garibaldi	16149/Isabel
Cy8UFMSM	<i>Ilyonectria macrodidyma</i>	Garibaldi	16149/Isabel
Cy9UFMSM	<i>Ilyonectria robusta</i>	Nova Pádua	Bordô*
Cy10UFMSM	<i>Ilyonectria macrodidyma</i>	Bento Gonçalves	Paulsen 1103/Burdin
Cy11UFMSM	<i>Ilyonectria macrodidyma</i>	Bento Gonçalves	Gravesac/ Merlot
Cy12UFMSM	<i>“Cylindrocarpon” pauciseptatum</i>	Dois Lajeados	Concord*
Cy13UFMSM	<i>“Cylindrocarpon” pauciseptatum</i>	Dois Lajeados	Bordô*
Cy14UFMSM	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	Farroupilha	Bordô*
Cy15UFMSM	<i>Ilyonectria macrodidyma</i>	Flores da Cunha	Niágara Branca*
Cy16UFMSM	<i>Ilyonectria macrodidyma</i>	Flores da Cunha	Bordô*
Cy17UFMSM	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	Nova Pádua	RR 10114/Isabel
Cy18UFMSM	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	Monte Belo do Sul	Paulsen 1103/Chardonnay
Cy19UFMSM	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	Farroupilha	Paulsen 1103/Isabel
Cy20UFMSM	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	Nova Roma do Sul	Isabel*

* pé-franco.