

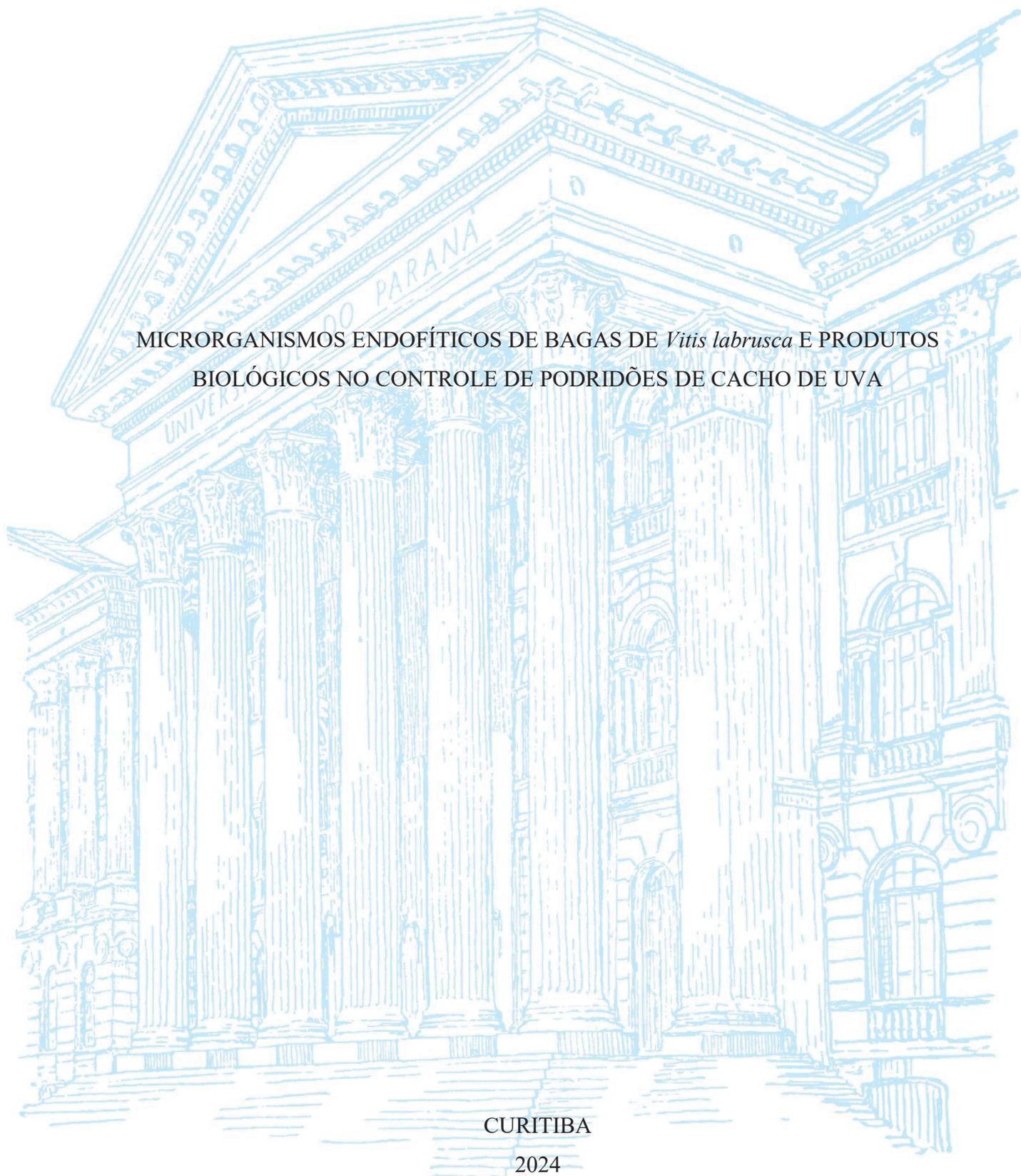
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA IAVORSKI ZELA

MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE BAGAS DE *Vitis labrusca* E PRODUTOS  
BIOLÓGICOS NO CONTROLE DE PODRIDÕES DE CACHO DE UVA

CURITIBA

2024



CAMILA IAVORSKI ZELA

MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE BAGAS DE *Vitis labrusca* E PRODUTOS  
BIOLÓGICOS NO CONTROLE DE PODRIDÕES DE CACHO DE UVA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em  
Agronomia, Área de Concentração em Produção  
Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade,  
Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do  
Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de  
Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Louise Larissa May De Mio

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Zela, Camila lavorski

Microorganismos endofíticos de bagas de *Vitis labrusca* e produtos biológicos no controle de prodriddões de cacho de uva / Camila lavorski Zela. – Curitiba, 2024.

1 recurso online: PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal).

Orientadora: Profa. Dra. Louise Larissa May De Mio

1. Uva - Cultivo. 2. Microbiologia agrícola. 3. Microorganismos fitopatogênicos. 4. Agricultura sustentável. I. May de Mio, Louise Larissa. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal). III. Título.

Bibliotecária: Elizabeth de Almeida Licke da Luz CRB-9/1434

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAMILA IAVORSKI ZELA** intitulada: **MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE BAGAS DE *Vitis labrusca* E PRODUTOS BIOLÓGICOS NO CONTROLE DE PODRIDÕES DE CACHO DE UVA**, sob orientação da Profa. Dra. LOUISE LARISSA MAY DE MIO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Setembro de 2024.

Assinatura Eletrônica

27/09/2024 16:09:31.0

LOUISE LARISSA MAY DE MIO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

27/09/2024 13:58:37.0

LUCAS DA RESSURREIÇÃO GARRIDO

Avaliador Externo (EMBRAPA)

Assinatura Eletrônica

30/09/2024 09:40:31.0

RENATA FAIER CALEGARIO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

*Com profundo amor e gratidão, dedico esta dissertação à memória do meu pai,  
**João Luiz Zela**, o homem que tinha tão pouco e me deu tudo quando precisei.  
O homem que estudou até a quarta série e, mesmo assim, enriqueceu minha vida com  
sabedoria, fazendo-me Engenheira Agrônoma e, hoje, Mestre.  
Ele transmitiu os mais nobres valores da minha vida: humildade, amor ao próximo e honra.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, "[...] o caminho, a verdade e a vida" (João 14:6), que ilumina os meus passos. À **Virgem Maria**, imaculada e mãe de Jesus, pelo seu amparo materno. E a **São Francisco de Assis**, que nos ensina que é mais importante amar do que ser amado.

Agradeço ao meu pai, **João Luiz**, por todos os esforços que fez para que eu chegasse até aqui. É uma pena que o céu esteja tão longe.

Agradeço à minha mãe, **Jane**, que sempre colocou a família acima de seus interesses. Uma das pessoas mais altruístas que conheço.

Agradeço ao meu marido, **Eduardo**, pelo amor incondicional e por todas as virtudes. O homem que sempre teve muita paciência e esteve ao meu lado nos meus piores e melhores momentos desses últimos anos. Obrigada por tudo que faz por nós.

Agradeço aos meus irmãos, **Fernando**, **Milena** e **Leomar** que são acalento. Ao Fernando pelos conselhos e por ser um dos meus melhores amigos. À Milena, pela risada contagiante que herdou da nossa querida avó. Ao Leomar, por ser como um irmão para mim.

Agradeço aos meus avós **Cleonice**, **Josefa** e **Luis** (*in memoriam*) e ao meu avô, **Juca**.

Agradeço a todos os meus **familiares** por entenderem e apoiarem minhas escolhas, mesmo quando isso significou estarmos longe. Suas palavras de orgulho e incentivo foram fundamentais para que eu alcançasse minhas conquistas.

Agradeço as minhas amigas **Larissa** e **Nathiele** por todo o carinho e apoio.

Agradeço à **Carolaine**, minha amiga de infância, cuja amizade perdura há 19 anos, e foi essencial na reta final do mestrado. Obrigada por todas as vezes que me fez sorrir.

Agradeço ao meu terapeuta e amigo, **Michael Goes**, sem sua ajuda não teria conseguido superar os obstáculos com tanta resiliência.

Agradeço ao **Clóvis Roberto Hoffmann**, por despertar meu amor pela fruticultura e ser um profissional exemplar, comprometido com os agricultores.

Agradeço ao **Irani Castro da Silva Soares**, cujo lema de vida é: "Gostoso é o fruto do meu trabalho" – ele trabalha com fruticultura. Você me fez perceber que sem amigos não somos nada e que as articulações na agronomia são imprescindíveis para avançar no conhecimento e entregar nosso trabalho com excelência.

Agradeço à **Catherine Penter Gaudeda Machulek** por ter me recebido tão bem. Você é uma agrônoma exemplar. Acredito que nossa amizade é um encontro de almas.

Agradeço à Professora **Louise Larissa May De Mio**, por ter me dado oportunidades que eu jamais poderia imaginar. Há cinco anos, quando cheguei insegura no LEMID, ela me acolheu e esteve pronta para me fazer uma profissional melhor, mais capaz e mais madura. Agradeço por ser uma ótima profissional, entusiasmada, dedicada, por todas as conversas e por acreditar em mim, quando nem eu acreditei.

Agradeço à Professora **Renata Faier Calegario**, por destravar minhas dificuldades com a biologia molecular. Obrigada por ser tão sensível e compreensiva.

Agradeço ao Professor **Luiz Antonio Biasi**, um exemplo de humildade e paciência, por sempre me ouvir.

Agradeço à Professora **Lúcia Gil**, pelas aulas de inglês e pela amizade.

Agradeço à **Lucimara Antunes** e à **Tatiana Miranda Borges**, por sempre estarem dispostas a nos ajudar nas dúvidas em relação ao PGAPV.

Agradeço à **Camilla Castellar**, por tanto me ensinar, por me dar conselhos e por ser uma grande amiga durante o percurso na fitopatologia. Sem sua ajuda, não teria ingressado no mestrado. Sinto muito orgulho de ter sido sua estagiária.

Agradeço ao **Daniel Ricardo Maas Steiner** por toda parceria no início do mestrado. Com você, aprendi que das diferenças podem surgir grandes amizades.

Agradeço à **Débora de Oliveira Franco**, que sempre esteve comigo, ajudando nos ensaios, de dia ou a noite, de segunda a segunda, quando foi necessário. Você é muito especial, minha estagiária e amiga. Obrigada por me ensinar que sempre existe um método mais rápido e eficiente para alcançar os nossos objetivos.

Agradeço as amizades que a pós-graduação me proporcionou. Em especial, **Vanessa Roncovsky, Heloisa Thomazi Kleina, Thiago de Aguiar Carraro, Natasha Akemi Hamada, Maria Gabriela de Carlos da Rocha, Erica Camila Zielinski, Débora Petermann, Mayara Catherine Candido Silva, Giovana Beger, Daiara Forlin, Tatiane Grazielle Zambiasi, André Luiz Graf Junior, Paulo Roberto Cionek, Elizeu Junior da Silva, Gabriel Koch e Nicolas Eduardo Ravaglio.**

Agradeço à Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PGAPV), por todo o suporte e estrutura. À CAPES e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro essencial para a realização desta pesquisa.

Agradeço a todos que me apoiaram e acreditaram em mim. Aos amigos novos e aos antigos. A todos que me ajudaram de alguma forma, me ouvindo, me acolhendo, me ajudando em algum ensaio, em alguma interpretação de dados...

Muito obrigada!

“As estrelas são todas iluminadas...  
Não será para que cada um possa um dia encontrar a sua?”  
– **Antoine de Saint-Exupéry.**

## RESUMO

A podridão da uva madura (*Colletotrichum* spp.) e a podridão cinzenta (*Botrytis cinerea*) estão entre as principais podridões de cacho de uva. Medidas culturais aliadas ao controle químico são métodos comumente utilizados para o controle de podridões. Contudo, a pressão de seleção sobre os patógenos exercida por aplicações frequentes de fungicidas, os impactos ao meio ambiente e o período de carência dos produtos são limitantes para o controle. Produtores relatam falhas no controle das podridões. Uma alternativa seria a introdução de agentes de controle biológico (ACBs) como bactérias e leveduras que são endofíticas de bagas de *Vitis labrusca*. Os endofíticos, ao estabelecerem relações simbióticas com as plantas, tornam-se aliados importantes na bioproteção. O estudo teve como objetivo a prospecção e avaliação de microrganismos endofíticos presentes em bagas de uva da cultivar 'Bordô' (*V. labrusca*). O primeiro capítulo focou na identificação desses microrganismos e na análise de seu potencial antagonístico contra *Colletotrichum* spp. e *Botrytis cinerea*. No segundo capítulo, foi analisado o modo de ação dos microrganismos endofíticos pré-selecionados e de produtos biológicos comerciais sobre as estruturas infectivas de três espécies de *Colletotrichum* (*C. nymphaeae*, *C. siamense* e *C. viniferum*), e o impacto desses ACBs na podridão da uva madura. Inicialmente, foi realizada uma triagem com 52 isolados endofíticos de bagas de *V. labrusca*, avaliando o efeito destes sobre o crescimento micelial de *C. nymphaeae* e *B. cinerea*. Em seguida, três isolados selecionados como antagonistas aos dois patógenos foram identificados por análise molecular, utilizando ITS-rDNA para leveduras e *16S* para bactérias. As sequências obtidas foram comparadas com sequências disponíveis no Genbank e no LPSN, seguido das análises filogenéticas. Na segunda parte do trabalho foram comparados os isolados endofíticos e os produtos comerciais quanto à inibição do crescimento micelial de *C. nymphaeae*, *C. siamense* e *C. viniferum*, principais espécies identificadas em coleção brasileira. Esses testes incluíram pareamento de colônias, análise da ação de metabólitos termoestáveis e compostos voláteis antifúngicos. Além disso, foi avaliada a germinação dos conídios dos isolados patogênicos e sua capacidade de formar colônias após contato com os ACBs. Em experimento *ex vivo* foi avaliado progresso da podridão da uva madura em bagas de uva tratadas com os ACBs antes da inoculação com o patógeno. Os três isolados endofíticos classificados como antagonísticos a *Colletotrichum* spp. e *B. cinerea* foram identificados como *Clavispora asparagi* (VA4L), *Zygoascus meyeriae* (VB5B) e *Tatumella morbirosei* (PA1N). As espécies de *Colletotrichum* variaram em sensibilidade aos ABCs prospectados e aos padrões de fungicida e biológicos comerciais. Os tratamentos testados tiveram modos de ação variados. Dentre os produtos comerciais, Serenade® e Duravel® foram os mais eficazes na redução do crescimento micelial e da incidência da podridão da uva madura. Duravel® inibiu a viabilidade dos conídios, e Serenade® produziu compostos que inibiram o crescimento dos patógenos. Os isolados endofíticos prospectados reduziram o crescimento micelial e a incidência da doença, com resultados semelhantes ao fungicida clorotalonil. Com os dados deste estudo pode ser afirmado que os ABCs prospectados e produtos biológicos comerciais são promissores para o manejo das podridões da uva em campo e em pós-colheita. Estudos em campo para estabelecer a melhor estratégia de uso são recomendados como continuidade desta pesquisa.

Palavras-chave: Bioinsumos, *Vitis* spp., Agricultura Sustentável, Bioprospecção, Antagonismo.

## ABSTRACT

Grape ripe rot (*Colletotrichum* spp.) and gray mould (*Botrytis cinerea*) are among the main grapevine bunch rots. Cultural measures combined with chemical control are methods commonly used to control rot. However, the selection pressure exerted on the pathogens by frequent applications of fungicides, the impact on the environment and the grace period of the products all limit control. Producers report failures in the control of rots. An alternative would be the introduction of biological control agents (BCAs) such as bacteria and yeasts that are endophytes of *Vitis labrusca* berries. By establishing symbiotic relationships with plants, endophytes become important allies in bioprotection. The aim of this study was to prospect and evaluate endophytic microorganisms present in 'Bordô' grape berries (*V. labrusca*). The first chapter focused on identifying these microorganisms and analyzing their antagonistic potential against *Colletotrichum* spp. and *Botrytis cinerea*. The second chapter analyzed the mode of action of the pre-selected endophytic microorganisms and commercial biological products on the infective structures of three *Colletotrichum* species (*C. nymphaeae*, *C. siamense* and *C. viniferum*), and the impact of these ABCs on Grape ripe rot. Initially, 52 endophytic isolates from *V. labrusca* berries were screened and their effect on the mycelial growth of *C. nymphaeae* and *B. cinerea* was evaluated. Next, three isolates selected as antagonists to the two pathogens were identified by molecular analysis, using ITS-rDNA for yeasts and *16S* for bacteria. The sequences obtained were compared with sequences available on Genbank and LPSN, followed by phylogenetic analysis. In the second part of the work, endophytic isolates and commercial products were compared in terms of their inhibition of the mycelial growth of *C. nymphaeae*, *C. siamense* and *C. viniferum*, the main species identified in the Brazilian collection. These tests included colony pairing, analysis of the action of thermostable metabolites and antifungal volatile compounds. In addition, the germination of the conidia of the pathogenic isolates and their ability to form colonies after contact with the ABCs were evaluated. In an ex vivo experiment, the progress of grape ripe rot was assessed on grape berries treated with the ABCs before inoculation with the pathogen. The three endophytic isolates classified as antagonistic to *Colletotrichum* spp. and *B. cinerea* were identified as *Clavispora asparagi* (VA4L), *Zygoascus meyeriae* (VB5B) and *Tatumella morbirosei* (PA1N). *Colletotrichum* species varied in their sensitivity to the ABCs prospected and to commercial fungicide and biological standards. The treatments tested had different modes of action. Among the commercial products, Serenade® and Duravel® were the most effective in reducing mycelial growth and the incidence of grape ripe rot. Duravel® inhibited the viability of conidia, and Serenade® produced compounds that inhibited the growth of pathogens. The endophytic isolates studied reduced mycelial growth and the incidence of the disease, with similar results to the fungicide chlorothalonil. With the data from this study, it can be stated that the ABCs prospected and commercial biological products are promising for the management of grape rots in the field and post-harvest. Field studies to establish the best use strategy are recommended as a continuation of this research.

Keywords: Bio-inputs, *Vitis* spp., Sustainable Agriculture, Bioprospecting, Antagonism.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1 A CULTURA DA VIDEIRA .....	16
2.1.1 Origem e classificação botânica .....	16
2.1.2 Aspectos socioeconômicos da cultura .....	17
2.1.3 Aspectos nutracêuticos relacionados à videira .....	18
2.1.4 Doenças fúngicas da videira .....	18
2.2 PODRIDÃO DA UVA MADURA .....	20
2.2.1 Distribuição .....	20
2.2.2 Etiologia .....	20
2.2.3 Sintomatologia.....	21
2.2.4 Ciclo biológico e epidemiologia da doença.....	21
2.3 PODRIDÃO CINZENTA OU MOFO CINZENTO DA UVA.....	22
2.3.1 Distribuição e Etiologia .....	22
2.3.2 Sintomatologia.....	22
2.3.3 Ciclo biológico e epidemiologia da doença.....	23
2.4 ASPECTOS DO MANEJO DAS PODRIDÕES DE CACHO DE UVA, CAUSADAS POR <i>Colletotrichum</i> spp. E <i>B. cinerea</i> .....	23
2.4.1 Controle biológico .....	25
<b>3 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>27</b>
<b>CAPÍTULO I – PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE BAGAS DE <i>V. labrusca</i> PARA CONTROLE DE PODRIDÕES DE CACHO DE UVA</b>	<b>35</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
2.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE BAGAS DE <i>V. labrusca</i> E DOS PATÓGENOS .....	38
2.1.1 Obtenção dos isolados endofíticos de bagas de <i>V. labrusca</i> .....	38
2.1.2 Obtenção dos isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. e de <i>Botrytis</i> sp.....	39
2.2 PROSPECÇÃO DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS ANTAGONISTAS .....	40
2.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS E PATOGENOS .....	41
2.3.1 Isolamento de DNA .....	41
2.3.2 Amplificação por PCR.....	42

2.3.3 Análise filogenética .....	43
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
3.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE BAGAS DE <i>V. labrusca</i> .....	46
3.2 PROSPECÇÃO DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS ANTAGONISTAS .....	47
3.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS E PATOGÊNICOS .....	51
3.3.1 Isolados com potencial antagonico endofíticos de bagas de <i>V. labrusca</i> .....	51
3.3.2 Identificação dos isolados patogênicos .....	54
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>5 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO II – MICRORGANISMOS ENDOFITICOS DE BAGA E PRODUTOS COMERCIAIS AFETAM ESTRUTURAS INFECTIVAS DE TRÊS ESPÉCIES DE <i>Colletotrichum</i> SP. E CONTROLAM PODRIDÃO DA UVA MADURA.....</b>	<b>67</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>70</b>
2.1 PROCEDÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. ....	71
2.2 AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO UTILIZADOS NOS TESTES <i>in vitro</i> E NO CONTROLE DE PODRIDÃO DA UVA MADURA.....	71
2.2.1 Cultivo dos agentes de controle biológico (C12, VA4L, VB5B e PA1N).....	72
2.3 TESTES <i>in vitro</i> PARA VERIFICAR O EFEITO DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO (ABCs) NAS ESTRUTURAS INFECTIVAS <i>Colletotrichum</i> spp. ....	73
2.3.1 Efeito dos ABCs sobre o crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. em cultivo pareado de colônias .....	73
2.3.2 Efeito de metabólitos termoestáveis produzidos por ABCs sobre o crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp.....	73
2.3.3 Efeito de compostos voláteis produzidos por ABCs sobre o crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	74
2.3.4 Germinação de conídios de <i>Colletotrichum</i> spp. após contato com ABCs.....	74
2.3.5 Formação de colônias de <i>Colletotrichum</i> spp. após contato de conídios com ABCs .....	75
2.4 AGENTES BIOLÓGICOS NO CONTROLE PREVENTIVO DE PODRIDÃO DA UVA MADURA .....	75
2.5 ANÁLISE DOS DADOS .....	77
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>78</b>

3.1 TESTES *IN VITRO* PARA VERIFICAR O EFEITO DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO (ABCs) NAS ESTRUTURAS INFECTIVAS DE *COLLETOTRICHUM* SPP.

78

3.1.1 Efeito dos ABCs sobre o crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. após cultivo pareado de colônias .....	78
3.1.2 Efeito de metabólitos termoestáveis produzidos por ABCs sobre o crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp.....	80
3.1.3 Efeito de compostos voláteis produzidos por ABCs sobre o crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	81
3.1.4 Germinação de conídios de <i>Colletotrichum</i> spp. após contato com ABCs .....	82
3.1.5 Formação de colônias de <i>Colletotrichum</i> spp. após contato de conídios com ABCs .....	83
3.2 AGENTES BIOLÓGICOS NO CONTROLE PREVENTIVO DE PODRIDÃO DA UVA MADURA .....	84
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>91</b>
<b>5 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>100</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo de videiras (*Vitis* spp.) é mundialmente importante (FAOSTAT, 2024). No Brasil, a uva é a principal frutífera de clima temperado, com produção estimada em 1,7 milhões de toneladas, distribuída principalmente entre as regiões sul e nordeste do país (IBGE, 2024). O Rio Grande do Sul lidera como o maior produtor, com cerca de 90% da produção destinada à indústria de sucos e vinhos de mesa, produzidos principalmente com *V. labrusca*. Pernambuco, São Paulo, Bahia e Paraná seguem no ranking nacional, com o Paraná ocupando o 5º lugar, produzindo cerca de 60 mil toneladas na safra 2023/2024 (IBGE, 2024). Esse estado tem previsão de crescimento na produção, impulsionado pela criação do Programa Estadual de Revitalização da Viticultura Paranaense (REVITIS), que apoia a expansão das áreas cultivadas (SEAB, 2024).

Uma parcela significativa da produção de uvas no país é desafiada por longos períodos chuvosos próximos à colheita dos frutos. Neste momento, as podridões de cacho de uva são doenças especialmente importantes, impactando tanto a produtividade, quanto a qualidade dos produtos. Afetam a estética dos frutos e podem alterar as características do vinho e do suco, pois as enzimas produzidas pelos patógenos prejudicam a cor, aroma e o sabor devido à oxidação de compostos fenólicos presentes nesses produtos (Sônego; Garrido, 2005; Meneguzzo *et al.* 2006; Rizzon; Meneguzzo, 2007).

Dentre os patógenos que causam podridões de cacho de uva, dois dos mais relevantes são: *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum* spp., que causam a podridão cinzenta e a podridão da uva madura, respectivamente (Nogueira *et al.*, 2017). Ambos os patógenos foram eleitos entre os dez principais patógenos de plantas devido ao número de hospedeiros que são capazes de infectar e aos danos causados por eles (Dean *et al.*, 2012).

No Brasil, a podridão cinzenta da uva é causada exclusivamente por *B. cinerea* (Azevedo *et al.*, 2020). Em contraste, alta diversidade genética tem sido relatada para o gênero *Colletotrichum* associado às videiras. Inicialmente, os complexos *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. boninense* foram relatados causando podridão da uva madura (Echeverrigaray *et al.*, 2020). Considerando todas as regiões produtoras do país, treze espécies de *Colletotrichum* spp. foram identificadas associadas à videira, distribuídas nestes complexos, com predomínio de *C. nymphaeae*, *C. siamense* e *C. viniferum* (Steiner *et al.*, 2024).

Essa diversidade genética tem implicações práticas significativas como, por exemplo, diferenças entre os complexos quanto à especificidade do tecido (folhas, frutos, ramos, flores, etc.), à agressividade (tamanho e número de lesões, à capacidade de produzir conídios, etc.), à

distribuição geográfica (ampla faixa de temperatura e diferenças quanto à necessidade de umidade) e à sensibilidade a fungicidas (Dowling *et al.*, 2020). Vale ressaltar que há variações observadas até mesmo entre isolados de uma mesma espécie.

O manejo das podridões de cacho de uva requer a integração de diferentes métodos de controle. Embora *V. labrusca* seja considerada mais resistente à maioria das doenças em comparação com *V. vinifera*, não existem cultivares comerciais com resistência completa às podridões (Su *et al.*, 2023). Desta forma, medidas culturais como a desfolha manual durante o ciclo e a desbrota são recomendadas para aumentar a aeração da copa visando o controle de *B. cinerea* (Valdés-Goméz *et al.*, 2008; Wurz *et al.*, 2017); e o uso de cobertura plástica, que reduz a água livre na planta e, conseqüentemente, as podridões de cacho (Chavarria *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2012). Além disso, utilizar variedades com cachos de menor compactação desfavorece infecção de *B. cinerea* (Hed *et al.*, 2015).

Contudo, em condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento de *Colletotrichum* spp. e *B. cinerea* nos frutos, as medidas culturais são insuficientes para o controle da doença. Portanto, o controle químico é realizado com aplicação de fungicidas. Mas este método apresenta limitações como o período de carência do produto, a seleção de populações de patógenos resistentes, além dos impactos causados ao meio ambiente e à saúde do consumidor (Sharma *et al.*, 2009; Hamann, 2011).

Como alternativa, o controle biológico surge como uma opção promissora. Os organismos endofíticos, que vivem dentro dos tecidos vegetais sem causar danos aparentes (DE BARY, 1866), têm se mostrado especialmente promissores no controle biológico de doenças de plantas. Esses microrganismos têm o potencial de promover o crescimento vegetal e atuar na proteção contra patógenos, competindo por recursos, produzindo substâncias antimicrobianas ou induzindo resistência sistêmica (RABBEE *et al.*, 2024). Essas interações simbióticas não só reduzem a dependência de pesticidas químicos, mas também promovem práticas agrícolas mais sustentáveis e ecologicamente corretas (ALABID *et al.*, 2019). O conhecimento dos mecanismos de ação dos endofíticos é fundamental para a eficácia do controle biológico (Blakeman; Fokkema, 1982). Alguns mecanismos de ação já relatados são antibiose, competição, parasitismo e indução de resistência sistêmica (Bettiol; Morandi, 2009; Medeiros *et al.*, 2018).

Apesar do potencial de controle, a disponibilidade de produtos biológicos eficientes ainda é limitada. Apenas alguns produtos à base de *Bacillus* ou *Trichoderma* são registrados para o controle de *Colletotrichum* spp. e *B. cinerea* (AGROFIT, 2024) e sua eficácia no controle ainda carece de estudos científicos. Assim, há necessidade de desenvolvimento de novos

produtos biológicos, que se inicia pela prospecção de microrganismos antagonistas e o entendimento de seus modos de ação. A busca por esses microrganismos deve focar em locais onde a doença não ocorre, como hospedeiros sadios ou cultivares resistentes (Baker; Cook, 1974). Neste contexto, a prospecção de endofíticos em *V. labrusca*, que apresenta maior resistência a podridões de cacho comparada à *V. vinifera*, pode ser uma estratégia promissora.

Diante disso, o primeiro capítulo deste estudo teve como objetivos prospectar microrganismos endofíticos presentes em bagas de uva da cultivar ‘Bordô’ (*V. labrusca*), avaliando seu potencial antagônico contra *Colletotrichum* spp. e *B. cinerea*, além de realizar a identificação molecular desses microrganismos. O segundo capítulo se concentra em validar o efeito dos endofíticos pré-selecionados e de produtos biológicos comerciais sobre as estruturas infectivas de isolados de *C. nymphaeae*, *C. siamense* e *C. viniferum*, bem como avaliar o impacto desses agentes de controle biológico na podridão da uva madura.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A CULTURA DA VIDEIRA

#### 2.1.1 Origem e classificação botânica

A videira é uma planta perene, lenhosa, caducifolia, sarmentosa, com presença de gavinhas, de hábito trepador, pertencente à família das vitáceas. O gênero de maior importância é o *Vitis*, que possui mais de sessenta espécies. As espécies cultivadas são a *V. labrusca*, conhecida como ‘uva americana’ e *V. vinifera*, conhecida como ‘uva europeia’, devido ao centro de origem dessas espécies (Galet, 1988). Os frutos das uvas europeias são de excelente qualidade, porém, possuem menor resistência a pragas e doenças em comparação às videiras americanas, que possuem características variáveis em relação aos frutos (Keller, 2010).

Originalmente, as videiras são bem adaptadas às regiões de clima temperado, podendo ser cultivadas com sucesso em regiões subtropicais e tropicais. No Brasil, tradicionalmente, a cultura foi implantada na região sul, devido às características climáticas da região. Porém, com o desenvolvimento de novas tecnologias como a irrigação da cultura aliada à quebra de dormência através de fitormônios, houve a possibilidade de implantação da cultura na região do semiárido brasileiro, que se caracteriza pela escassez de chuvas e ambiente quente, impossibilitando o somatório de horas de frio necessário para a quebra de dormência das uvas naturalmente (Camargo, 2002).

### 2.1.2 Aspectos socioeconômicos da cultura

A uva representa uma das frutas mais consumidas no mundo (FAO, 2024). A área mundial destinada ao cultivo de videiras é de cerca de 7,3 milhões de hectares (ha), resultando em produção de aproximadamente 75 milhões de toneladas divididas igualmente entre o consumo *in natura* e a produção de vinhos ou sucos (OIV, 2024). No Brasil, aproximadamente 1,7 milhões de toneladas de uva são produzidas (IBGE, 2024). A região sul é a maior produtora, representando um total de aproximadamente um milhão de toneladas, das quais, o estado com maior produção é o Rio Grande do Sul, com média de 905 mil toneladas. Cerca de 90% da produção de uvas da região sul é destinada à indústria de sucos e vinhos. Na sequência o estado do Pernambuco, São Paulo, Bahia e Paraná ocupam o ranking de maiores produtores. O Paraná produziu cerca de 60 mil toneladas na Safra 2023/2024, ocupando o 5º lugar em produção no país (IBGE, 2024).

A vitivinicultura brasileira é bastante diversificada, com diferentes finalidades de cultivo, climas, sistemas de condução e manejo. O cultivo da videira representa uma atividade de muita importância para a agricultura familiar. Além disso, promove a economia local de algumas regiões devido aos investimentos realizados por empresas que geram empregos e renda (Mello *et al.*, 2019). Outro ponto, é a promoção do turismo rural, principalmente nas regiões tradicionalmente conhecidas como vitivinicultoras, a exemplo da Serra Gaúcha, conhecida pela produção de vinhos coloniais (Duarte *et al.*, 2011; Mello *et al.*, 2016).

Devido a importância socioeconômica dos vinhedos, nota-se a busca pela aplicação de procedimentos técnicos que respeitem o ambiente, a legislação trabalhista e a saúde do consumidor. Por exemplo, no final da década de 90, a região do Vale de São Francisco começou a implantar o Sistema de Produção Integrada que abrange normativas e procedimentos que asseguram a qualidade da fruta, (Oliveira *et al.*, 2011), fato que facilitou a exportação de uvas de mesa, devido ao apelo mundial crescente por alimentos com menor quantidade de resíduos químicos (Camargo *et al.*, 2002).

O Nordeste brasileiro possui a taxa de desemprego mais elevada do país (IBGE, 2024). Com a expansão da viticultura no Vale do São Francisco, houve a geração de milhares de empregos, aumentando a renda da população desta região, estima-se que cada hectare plantado de uva, gere, pelo menos, dois empregos diretos no campo e quatro indiretos decorrentes dos processos produtivos da atividade (Silva; Coelho, 2010).

### 2.1.3 Aspectos nutracêuticos relacionados à videira

Os carboidratos são o principal componente das uvas e estão presentes em grande quantidade na forma de açúcares naturais, como a glicose e a frutose. Cultivares de *V. vinifera* contém cerca de 29,2% de carboidratos em sua composição total. Estes estudos mostram também que a uva é composta por, aproximadamente, 8,2% de lipídeos e 8,5% de proteínas (Sousa *et al.*, 2014).

Além disso, as uvas também fibras alimentares (cerca de 46%) que são importantes para a manutenção da saúde do trato gastrointestinal e para a prevenção de doenças como a constipação e o câncer de cólon (Stampanoni, 1998). É importante ressaltar que os valores de composição nutricional podem se alterar de acordo com diversos fatores como a cultivar, o local de produção e o manejo das plantas (Kalili *et al.*, 2023).

As uvas também são ricas em polifenóis, um dos mais importantes é o resveratrol, um composto não-flavonoide. As atividades mais conhecidas atribuídas a esse composto são os efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antiproliferativos e quimiopreventivos (Barbalho *et al.*, 2020). A  $\epsilon$ -viniferina é um dímero do resveratrol que previne o desenvolvimento de algumas comorbidades da obesidade, como diabetes tipo 2, dislipidemias, hipertensão e esteatose hepática (Gómez-Zorita *et al.*, 2023).

### 2.1.4 Doenças fúngicas da videira

Como ocorre com a maioria das espécies cultivadas no mundo, fatores abióticos e bióticos podem restringir o potencial produtivo das videiras (Bernardo *et al.*, 2018). Entre os fatores bióticos, as doenças fúngicas são um dos principais obstáculos à produtividade e à qualidade das uvas (Tessmann *et al.*, 2019). Existem diversas doenças causadas por fungos ou oomicetos citadas na literatura prejudicando os processos fisiológicos das videiras (FIGURA 1).

As principais doenças fúngicas que causam danos no sistema vascular da uva são a fusariose – *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *herbemontis* Tocchetto, o declínio – *Eutypa lata* (Pers.: Fr.) C. Tul., pé-preto – (*Campylocarpon* sp., *Cylindrocarpon* sp., *Cylindrocladiella* sp. e *Ilyonectria* sp., doença de Petri – *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp., podridão ou morte descendente - *Botryosphaeria* spp. que reduzem principalmente o vigor da planta, devido ao impedimento de translocação de seiva (Sônego *et al.*, 1999; Garrido *et al.*, 2004).

Há também doenças foliares que afetam a fotossíntese como a antracnose – *Elsinoe ampelina* (de Bary) Shear, o míldio – *Plasmopora viticola* (Berk.; Curlis) Berl; de Toni, o oídio – *Erysiphe necator* (Schw.) Burrell, a mancha das folhas da videira – *Pseudocercospora vitis* (Lév.) Speg, a ferrugem da videira – *Phakopsora euveitis* e a escoriose – *Phomopsis viticola* (Amorim; Kuniyuki, 2005; Almança *et al.*, 2015). Alguns exemplos de doenças fúngicas que afetam órgãos de armazenamento na videira são: a antracnose – *Elsinoe ampelina* (de Bary) Shear, a podridão amarga – *Greeneria uvicola* (Berk.; Curtis) Punithalingam, a podridão da uva madura – *Colletotrichum* spp. (Penz.) Penz.; Saac. e o mofo cinzento – *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. (Amorim; Kuniyuki, 2005).

As podridões de cacho de uva são indesejáveis, tanto para o consumo *in natura*, por afetarem a estética dos frutos (Nogueira *et al.*, 2017), quanto para os produtos processados, a exemplo da presença de *B. cinerea* ou *Colletotrichum* spp., que afetam negativamente a qualidade do vinho e suco (Sônego; Garrido, 2005; Meneguzzo *et al.* 2006; Rizzon; Meneguzzo, 2007), com exceção da podridão-nobre (*B. cinerea*) que se manifesta em períodos de sobrematuração, em condições climáticas e que é procurada para a elaboração de vinhos licorosos, tipo Sauternes (Reynier, 1986). As principais doenças em cachos causadas por fungos em videira são a podridão da uva madura e o mofo cinzento (Nogueira *et al.*, 2017), que serão discutidas em seguida.

FIGURA 1 –DOENÇAS IMPORTANTES CAUSADAS POR FUNGOS OU OOMICETOS NA CULTURA DA VIDEIRA (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*)



Fonte: A autora (2023). A) Mancha das folhas da videira (*Pseudocercospora vitis*); B) Míldio (*Plasmopara viticola*); C) Antracnose (*Elsinoe ampelina*); D) Mofo cinzento (*Botrytis cinerea*); E e F) Podridão da uva madura (*Colletotrichum* spp.), sintomas iniciais e avançados.

## 2.2 PODRIDÃO DA UVA MADURA

### 2.2.1 Distribuição

O primeiro relato da podridão da uva madura foi em 1891, na região sul dos Estados Unidos (Southworth, 1891). *Colletotrichum* spp. também foram relatadas como causa da doença em outros países, a exemplo de China (Yokosawa *et al.*, 2020), Taiwan (Duan; Chen, 2022), Índia (Chowdappa *et al.* 2009), Japão (Yamamoto *et al.* 1999), Austrália (Greer *et al.*, 2013), e Brasil (Amorim; Kuniyuki, 2005; Echeverrigaray *et al.*, 2020). A podridão da uva madura, causada por espécies de *Colletotrichum* sp., possui crescente importância no Brasil, devido à demanda por frutos com maior índice de °Brix, que permanecem maior tempo no campo (Garrido; Sônego, 2008).

### 2.2.2 Etiologia

O gênero *Colletotrichum* causa doença em ampla gama de hospedeiros, principalmente na pós-colheita de frutas e vegetais (Bailey; Jeger, 1992).

Um aspecto interessante sobre *Colletotrichum* é que, embora seja conhecido como causador de antracnose em diversas culturas (Adaskaveg; Hartin, 1997; Weir; Johnston, 2010), na videira, o patógeno responsável por essa doença é o *Elsinoe ampelina* (Wilcox *et al.*, 2015). Portanto, *Colletotrichum* spp. está associado à podridão da uva madura.

A variabilidade genética de *Colletotrichum* spp., investigada por meio de análises filogenéticas, resultou em um sistema de classificação do gênero baseado em diferentes complexos de espécies (Weir *et al.*, 2012). Para a identificação e delimitação das espécies de *Colletotrichum*, é recomendada a utilização de análises multigênicas, as quais têm permitido a descrição de mais de 200 espécies, agrupadas em diversos complexos (Marin-Felix *et al.*, 2017).

No Brasil, os complexos *C. acutatum*, *C. gloesporioides* e *C. boninense* foram associados à videira (Echeverrigaray *et al.*, 2020; Steiner *et al.*, 2024), dos quais fazem parte as espécies: *C. nymphaeae*, *C. melonis*, *C. siamense*, *C. chrysophilum*, *C. fructicola*, *C. viniferum*, *C. theobromicola*, *C. hibiense*, *C. jiangxiense*, *C. gloesporioides*, *C. karstii* e *C. boninense*. Dentre estas, as espécies com maior ocorrência no Brasil causando a podridão da uva madura são: *C. nymphaeae*, *C. siamense* e *C. viniferum* (Steiner *et al.*, 2024).

### 2.2.3 Sintomatologia

A evolução dos sintomas de *Colletotrichum* spp. em bagas de uva pode ser observada na Figura 2. Os sintomas iniciais da doença são manchas pardo-avermelhadas que se estendem por todo o fruto. Posteriormente, pontuações escuras formadas pelos acérvulos do fungo aparecem nas bagas. Com alta umidade, os conídios são expostos numa massa mucilaginosa de coloração rósea. Os cachos ficam enrugados e caem (Amorim; Kuniuki, 2005).

As diferentes espécies do gênero *Colletotrichum* podem causar diferentes graus de incidência e severidade da doença como mostram estudos de Greer (2011), em que espécies de *C. acutatum* tiveram uma taxa de infecção mais rápida do que *C. gloeosporioides*.

FIGURA 2 – EVOLUÇÃO DOS SINTOMAS DE PODRIDÃO DA UVA MADURA, CAUSADA POR *Colletotrichum* spp. EM UVA DA CULTIVAR ‘THOMPSON’.



FONTE: A autora (2022).

### 2.2.4 Ciclo biológico e epidemiologia da doença

Os patógenos que causam a podridão da uva madura sobrevivem em frutos mumificados no pomar, além das gemas e gavinhas infectadas (Batista; Barbosa, 2022). A liberação de ascósporos provenientes dos cachos mumificados ocorre no início da primavera e durante a maturação dos frutos (Garrido; Sônego, 2004). A infecção pode ocorrer durante a florada até a colheita da uva (Steel *et al.*, 2012). Quando a infecção ocorre nos estágios iniciais de desenvolvimento do fruto, o patógeno pode permanecer latente até o início da maturação, quando começam a aparecer os primeiros sintomas (Hamada *et al.* 2011).

*V. vinifera* possui suscetibilidade ontogênica a *Colletotrichum* spp., isto é, certas fases do desenvolvimento da cultura podem ser mais sensíveis à infecção e ocorrência da doença. Os cachos de uvas mostram-se mais suscetíveis à podridão da uva madura quando expostos ao

inóculo e às condições ambientais no final da safra. Cachos protegidos ou expostos apenas no início da safra não desenvolvem podridão da uva madura severa, destacando o risco aumentado de infecção à medida que as uvas amadurecem (Cosseboom, Hu; 2022).

Os frutos sintomáticos produzem conídios, que servem de fonte de inóculo para novas infecções no campo e na pós-colheita. Precipitações maiores que 9 mm e temperaturas entre 16 e 26,5 °C, além de um período de molhamento em torno de 24 horas, são condições favoráveis para o desenvolvimento do patógeno (Schenato *et al.*, 2008; Pradella, 2013). Contudo, estudos de Cosseboom e Hu (2023) que avaliaram a espécie *C. fioriniae*, indicaram que a faixa de temperatura ideal para a maior incidência de podridão madura foi entre 27 a 32 °C. Especificamente, a temperatura de 27 °C combinada com a duração de molhamento foliar de 24 horas resultou em uma incidência de 100% de podridão madura.

A disseminação da doença pode ocorrer de duas maneiras principais: água e vento. A água é importante para a diluição da substância mucilaginosa que envolve os conídios, produzidos durante o ciclo secundário, facilitando a germinação. Após a formação do tubo germinativo, forma-se o apressório possibilitando a infecção (Guerreiro, 2006).

## 2.3 PODRIDÃO CINZENTA OU MOFO CINZENTO DA UVA

### 2.3.1 Distribuição e Etiologia

*B. cinerea* é um fitopatógeno que causa doenças em mais de 200 hospedeiros em todo o mundo, principalmente em frutas e hortaliças (Williamson *et al.*, 2007; Amiri *et al.*, 2014). Embora, no Brasil, a espécie relatada na cultura da uva seja *B. cinerea*, outras espécies foram relatadas em diferentes países causando podridão cinzenta, a exemplo de *B. euroamericana*, nos Estados Unidos e Europa (Garfinkel *et al.* 2017), *B. californica*, também nos EUA (Saito *et al.* 2016), *B. sinoviticola*, na China (Zhou *et al.* 2014), e *B. medusae*, na Austrália (Harper *et al.* 2019).

### 2.3.2 Sintomatologia

O sintoma típico da doença é a podridão do cacho, com produção de massa de esporos cinza-esverdeados, que confere o aspecto típico da podridão cinzenta (Amorim; Kuniuki, 2005) (FIGURA 3). Em alguns países, a podridão cinzenta é considerada a principal doença de cachos em uva (Molitor *et al.*, 2012). Além de afetar as uvas para consumo *in natura*, um dos sérios

problemas correlacionados à ocorrência de *B. cinerea* em uva é a qualidade do vinho, onde o patógeno prejudica a cor, o aroma e o sabor devido à oxidação de compostos fenólicos por enzimas produzidas por este fungo (Sônego *et al.*, 2005; Meneguzzo *et al.* 2006).

FIGURA 3 – EVOLUÇÃO DOS SINTOMAS DE PODRIDÃO CINZENTA DA UVA, CAUSADA POR *Botrytis cinerea* EM UVA DA CULTIVAR ‘THOMPSON’.



FONTE: A autora (2022).

### 2.3.3 Ciclo biológico e epidemiologia da doença

O fungo sobrevive em forma de escleródios no ramo ou em restos culturais de uva, como as gavinhas, ráquis e bagas mumificadas, ramos e pedúnculos presentes no solo ou presos à planta. Os cachos mumificados são considerados o inóculo inicial com maior importância (Jaspers *et al.*, 2013, 2016). Os conídios são liberados na primavera, infectando folhas e ramos novos antes da floração (Keller *et al.*, 2003). Quando infecta as flores, permanece latente devido ao baixo conteúdo de açúcares e alto conteúdo de ácido no tecido. Quando as bagas são formadas e o nível de açúcar começa a aumentar, os primeiros sintomas podem ocorrer. Os ciclos secundários ocorrem a partir dos frutos sintomáticos durante a maturação. A dispersão ocorre através do vento e da água (Garrido; Sônego, 2005).

Temperaturas amenas, entre 15 a 25°C (Gindro; Pezet, 2001) e altas umidades são favoráveis para o desenvolvimento desse patógeno (Edder; Ortelli, 2005; Evans, 2017). Estes fatores ambientais são frequentes na região Sul do Brasil, especialmente nas datas de colheita.

## 2.4 ASPECTOS DO MANEJO DAS PODRIDÕES DE CACHO DE UVA, CAUSADAS POR *Colletotrichum* spp. E *B. cinerea*

O manejo integrado de doenças é cada vez mais utilizado em vinhedos, onde, após o devido monitoramento de condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da doença e da presença de inóculo no pomar, algumas medidas são empregadas para a redução dos impactos causados.

Garrido e Sônego (2004) citam que o controle da podridão da uva madura deve ser realizado primordialmente com a retirada de frutos mumificados do pomar. Outros métodos a serem considerados são a adoção de espaçamentos que proporcionem boa aeração e insolação, a realização da poda verde, aumentando a aeração, reduzindo a duração do molhamento do cacho e facilitando a aplicação do fungicida e deve-se também, evitar o excesso de adubos nitrogenados.

Para controle da podridão cinzenta, algumas medidas recomendadas são a desfolha manual e desbrote (Valdés-Goméz *et al.*, 2008; Wurz *et al.*, 2017). Utilizar variedades com cachos com menor compactação, visto que cachos compactos são mais suscetíveis ao ataque de *B. cinerea* (Hed *et al.* 2015). Outra medida é a vaporização de ácido acético no pomar, que reduz a podridão cinzenta, cujos testes *in vitro* demonstraram o retardo de crescimento micelial e total inibição de germinação (Camili *et al.*, 2010).

Porém, em condições climáticas muito favoráveis ao desenvolvimento das podridões, o uso das medidas culturais deve ser complementado com a aplicação de fungicidas em diversos estádios de desenvolvimento da planta, da floração até a maturação (Almança *et al.*, 2015). Por exemplo, a aplicação de produtos durante a floração pode ser importante para o complexo *C. nymphaeae*, que infecta as flores da videira (Steel *et al.*, 2012).

No Paraná, os fungicidas registrados para a podridão da uva madura: Clorotalonil, Tiofanato-metílico, Oxicloreto de Cobre, Mancozebe e Tebuconazol e para a podridão cinzenta: Clorotalonil, Tiofanato-metílico, Oxicloreto de cobre, Mancozebe, Iprodiona, Pirimetanil, Piraclostrobin, Fluxapirroxade, Captana, Procimidona, Óleo de casca de laranja, Fludioxonil, Ciprodinil, Extrato de *Melaleuca alternifolia* e Laminarina (ADAPAR, 2024).

Conforme mencionado, os cachos de uva tornam-se mais suscetíveis às podridões a partir do início da maturação (Cosseboom; Hu, 2022). Nesse estágio, as opções de fungicidas são limitadas devido ao período de carência dos produtos registrados para o controle das podridões. Além disso, o controle químico enfrenta outros desafios como a seleção de populações de patógenos resistentes e os impactos adversos ao meio ambiente e à saúde do consumidor (Sharma *et al.*, 2009; Hamann, 2011).

Steiner *et al.* (2024) estudaram populações de *Colletotrichum* spp. nas principais regiões produtoras de uva do Brasil, investigando a resistência aos fungicidas tiofanato-metílico e azoxistrobina. O estudo identificou isolados resistentes a ambos os fungicidas. Diante disso, a inclusão de agentes de controle biológico no manejo integrado é essencial para o sucesso no combate às podridões.

### 2.4.1 Controle biológico

Cook e Barker (1983) definem controle biológico como “a redução de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocadas por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem”. Os agentes biológicos têm a característica de apresentar menores impactos ambientais, comparados aos químicos convencionais (Bettiol; Morandi, 2009). A ocorrência de biodiversidade e manutenção dos processos ecossistêmicos, dependem de interações entre microrganismos e destes com as plantas. A presença de antagonistas é um processo natural importante para o equilíbrio de organismos patogênicos. Nos sistemas agrícolas, o manejo das espécies antagonistas é realizado para o controle biológico de fitopatógenos (Mathre *et al.*, 1999).

No mercado, são poucos os produtos biológicos registrados para o controle biológico de doenças causadas por *Colletotrichum* spp. e *B. cinerea* em comparação aos fungicidas sintéticos. As opções são limitadas a espécies de *Bacillus* sp., como: *B. amyloliquefaciens*, *B. pumillus*, *Bacillus subtilis* e *B. velezensis*. Contudo, na literatura, muitas relações antagônicas são relatadas, sendo elas: antibiose, competição, parasitismo, predação, hipovirulência e defesa do hospedeiro (Bettiol, 1991).

Os microrganismos podem atuar de diferentes formas ao mesmo tempo. Por exemplo, na Eslovênia, as espécies *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Pichia guilliermondii*, leveduras isoladas de vinho, foram capazes de reduzir o crescimento *in vitro* de *B. cinerea*, através da antibiose e competição (Raspor *et al.*, 2010). Outra interação interessante ocorre quando os microrganismos são capazes de ativar a defesa natural da planta (Medeiros *et al.*, 2018).

Diferentes microrganismos podem atuar no biocontrole de podridões em uva. Geralmente, fungos e bactérias são relatados como antagonistas. Quanto as bactérias, o principal gênero estudado é o *Bacillus*. Diferentes cepas de *Bacillus* epifíticas isoladas de videira em diferentes pomares na Índia foram capazes de reduzir o crescimento de *Colletotrichum* do complexo *gloesporioides* (Sawant *et al.*, 2016). Em outro estudo conduzido, *B. subtilis*, isolado de casca de uva foi capaz de inibir a podridão da uva madura e também a podridão cinzenta (Furuya *et al.*, 2010).

Espécies do gênero *Trichoderma* são habitantes de solo, podendo colonizar as raízes das plantas (Hermosa *et al.*, 2012). Esse fungo é relatado como antagonista de diversos fitopatógenos (Ferreira; Musumeci, 2021). Inclusive, em uva, Hamann (2011), em seus estudos, obteve isolados desse microrganismo no filoplano e no solo de vinhedos e, após testes *in vitro*,

percebeu redução de crescimento micelial e também da esporulação de *B. cinerea*, superiores a 50%. De maneira geral, a microbiota do solo e sua relação com as raízes das plantas é mais conhecida do que as relações da microbiota presente no filoplano ou no interior da planta (Bruissson *et al.*, 2019).

Os microrganismos endofíticos são aqueles que vivem no interior de espécies vegetais sem causar danos (Azevedo, 1998). As bactérias endofíticas ocupam um espaço que, normalmente, pode ser colonizado por patógenos, portanto, possuem grande potencial para o controle biológico (Hallmann *et al.*, 1997). Fungos endofíticos presentes em eucalipto são capazes de reduzir a incidência de *B. cinerea*, tornando-se interessantes para a manutenção da sanidade na produção de mudas dessa espécie vegetal (Sbravatti Junior *et al.*, 2013). Isolado endofítico de *B. velezensis* foi capaz de inibir o crescimento micelial de diferentes patógenos fúngicos da videira, incluindo agentes causais de podridões em cacho (Hamaoka *et al.*, 2021).

Um ponto interessante do controle biológico é a necessidade de posicionar as aplicações no momento adequado, considerando as condições climáticas, as formulações dos biocontroladores e também os estágios fenológicos da cultura. *T. atroviride*, *A. pullulans* e *B. subtilis*, microrganismos com diferentes modos de ação, são eficazes para controle de mofo cinzento na videira, tanto a aplicação combinada destes microrganismos, como o uso de apenas um deles, trouxe boas respostas. Aplicações ocorreram em momentos específicos do ciclo da videira que favoreceram a colonização dos microrganismos benéficos (Perlot *et al.*, 2017).

O controle biológico é importante não só por reduzir a dependência de produtos químicos, mas também por preservar a eficácia dos produtos disponíveis, prolongando a durabilidade dos tratamentos convencionais (Wang *et al.*, 2024).

### 3 REFERÊNCIAS

ADAPAR. Agência de defesa agropecuária do Paraná. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/>>. 2024.

ADASKAVEG, J. E.; HARTIN, R. J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. **Phytopathology** 87(9):979-987. 1997.

ALABID, I.; GLAESER, S. P.; KOGEL, K. H. Bactérias endofúngicas aumentam a aptidão de seus fungos hospedeiros e impactam sua associação com plantas cultivadas. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 30, p. 59-74, 2019. DOI: <<https://doi.org/10.21775/CIMB.030.059>>.

ALMANÇA, M. A. K.; LERIN, S.; CAVALCANTI, F. R. **Doenças da videira**. Informe Agropecuário, v.36, n.289, p.70, 2015.

AMIRI, A.; HEATH, S. M.; PERES, N. A. Resistance to fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from strawberry. **Plant Disease**, v. 98, p. 532-539, 2014.

AMORIM, L.; KUNIYUKI, H. Doenças da videira. In: KIMATI, H et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p. 639-642.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: Azevedo, J.L.; MELO, I.S. **Ec. microbiana Jaguariúna**: Embrapa-CNPMA. p. 117-137, 1998.

AZEVEDO, Daiana M.Q. *et al.* Diversity, prevalence and phylogenetic positioning of *Botrytis* species in Brazil. **Fungal Biology**, v. 124, n. 11, p. 940-957, nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.08.002>.

BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. Oxford: **British Society for Plant Pathology**, 1992. 388p.

BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: Freeman, 1974. 433 p.

BARBALHO, S. M. et al. Grape juice or wine: which is the best option? **Crit Rev Food Sci Nutr**, p. 1-14, Jan 10 2020. ISSN 1040-8398.

BATISTA, D. da C.; Barbosa, M.A.G. Podridão da uva madura em “BRS Vitória no Submédio do Vale do São Francisco. Petrolina: **Embrapa Semiárido**. 2022. Circular Técnica 132.

BERNARDO, Sara; DINIS, Lia-Tânia; MACHADO, Nelson; MOUTINHO-PEREIRA, José. Grapevine abiotic stress assessment and search for sustainable adaptation strategies in Mediterranean-like climates: A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 38, art. 66, 2018. DOI: 10.1007/s13593-018-0545-1.

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças do filoplano. In: Bettiol, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA. 1991. pp. 33-35.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 337 p.

BLAKEMAN, J. P.; FOKKEMA, N. J. Comparative efficacy of *Trichoderma* spp. for the control of powdery mildew of cluster bean. **Annual Review of Phytopathology**, v. 20, p. 167-192, 1982.

BRUISSON, S.; ZUFFEREY, M.; L'HARIDON, F.; TRUTMANN, E.; ANAND, A.; DUTARTRE, A.; WEISSKOPF, L. Endophytes and Epiphytes From the Grapevine Leaf Microbiome as Potential Biocontrol Agents Against Phytopathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

CAMARGO, U. A. Novas cultivares de videira para vinho, suco e mesa. In: REGINA, M.A. et al. (ed.) **Viticultura e enologia: atualizando conceitos**. Caldas, MG: EPAMIG-FECD, 2002. p.33-48.

CAMILI, E. C. et al. Fumigation of 'itália' grape with acetic acid for postharvest control of *Botrytis cinerea*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 32 n.2 Jaboticabal. 2010.

CARRARO, A. C.; MOREIRA, R. R.; GELAIN, J.; MAY-DE-MIO, L. L. Etiology and epidemiology of diseases caused by *Colletotrichum* spp. in persimmon, apple, peach, and grapevine. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Volume 28. p. 136-162. 2022.

CHAVARRIA, G. et al. Incidência de doenças e necessidade de controle em cultivo protegido de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.29, n.3, Jaboticabal, 2007.

CHOWDAPPA, P.; REDDY, G. S.; KUMAR, A.; RAO, B. M.; RAWAL, R. D. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose disease of grapes. **Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology** 3:71–77. 2009.

CHOWDAPPA, P.; REDDY, G. S.; KUMAR, A.; RAO, B. M.; RAWAL, R. D. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose disease of grapes. **Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology** 3:71–77. 2009.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. Saint Paul. APS Press; 1983.

COSSEBOOM, Scott D.; HU, Mengjun. **Ontogenic Susceptibility of Grapevine Clusters to Ripe Rot, Caused by the *Colletotrichum nymphaeae* and *C. gloeosporioides* Species Complexes**. *Phytopathology*, v. 112, n. 9, 2022. DOI: 10.1094/PHYTO-01-22-0004-R.

COSSEBOOM, Scott D.; HU, Mengjun. **Predicting Ripe Rot of Grape, Caused by *Colletotrichum fioriniae*, with Leaf Wetness, Temperature, and the Crop Growth Stage**. *Phytopathology*, v. 3, n. 2, 2023. DOI: <10.1094/PHYTOFR-05-22-0060-R>.

DE BARY, Anton. Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten. Engelmann, 1866.

- DEAN, R., VAN KAN, J. A., PRETORIUS, Z. A., HAMMOND-KOSACK, K. E., DI PIETRO, A., SPANU, P. D., *et al.* The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Mol. Plant Pathol.** 13:414-430. 2012. DOI: <<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>>.
- DOWLING, Madeline; PERES, Natalia; VILLANI, Sara; SCHNABEL, Guido. Managing *Colletotrichum* on fruit crops: a “complex” challenge. **Plant Disease**, St. Paul, v. 104, n. 9, p. 2301-2316, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2378-FE>.
- DUAN, C.-H.; CHEN, G.-Y. First report of *Colletotrichum tropicale* causing anthracnose on common fig in Taiwan. **Plant Disease**, Published Online: 14 Apr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1329-PDN>.
- DUARTE, T. S. et al. Turismo no Espaço Rural, Práticas Locais e Imigração Italiana: O Caminho Colonial do Vinho, Pelotas/RS. Rosa dos Ventos. **Revista de Pós- Graduação em Turismo**. Universidade de Caxias do Sul, v. 3, n. 2, 2011.
- ECHEVERRIGARAY, S. et al. *Colletotrichum* species causing grape ripe rot disease in *Vitis labrusca* and *V. vinifera* varieties in the highlands of southern Brazil. **Plant Pathology**, n. June, p. 1504–1512, 2020.
- EDDER P.; ORTELLI D. Survey of pesticide residues in Swiss and foreign Wines. *Trav Chim Aliment Hyg.* n. 96. p.311–320. 2005.
- EVANS, K. J. *Botrytis* management. **Wine Australia for Australian Wine**. 2017.
- FAO. **FAOSTAT**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#home>. 2024
- FRAC**. Classification of fungicides: fungal control agents by cross resistance pattern and mode of action 2024. Disponível em: <[www.frac.info](http://www.frac.info)>.
- FERREIRA, F.V., MUSUMECI, M.A. *Trichoderma* as biological control agent: scope and prospects to improve efficacy. *World J Microbiol Biotechnol* 37, 90, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03058-7>.
- FURUYA, S.; MOCHIZUKI, M.; AOKI, Y.; KOBAYASHI, H. TAKAYANAGI, T.; SHIMIZU, M.; SUZUKI, S. Isolamento e caracterização de *Bacillus subtilis* KS1 para o biocontrole de doenças fúngicas da videira, **Biocontrol Science and Technology**, 2011.
- GALET, P. Cépages et vignobes de France, Tome I Les vignes Américanes. Montpellier: Charles Déhan, 1988, 555 p.
- GARFINKEL, A. R.; LORENZINI, M.; ZAPPAROLI, G.; CHASTAGNER, G. A. *Botrytis euroamericana*, uma nova espécie de peônia e uva na América do Norte e Europa. **Mycologia**, v. 109, n. 3, p. 495-507, 2017.
- GARRIDO, L. R.; SONEGO, O. R. **Podridão da uva madura ou podridão de glomerella**. AGAPOMI, edição 171, agosto de 2008.

GARRIDO, L.R., SÔNEGO, O.R & GOMES, V.N. Fungos associados com o declínio e morte de videiras no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira** 29:322-324. 2004.

GINDRO, K.; PEZET, R. Effects of long-term storage at different temperatures on conidia of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. Fems Microbiology Letters. Nyon, Switzerland, p. 101-104. set, 2001.

GÓMEZ-ZORITA, S., MILTON-LASKIBAR, E., ESEBERRI, I. , BEAUMONT, P. , COURTOIS, A. , KRISA, S. , PORTILLO, M. P. Efeitos Benéficos da ε-Viniferina na Obesidade e Alterações Relacionadas à Saúde. Nutrientes. Volume 15, Edição 4, fevereiro de 2023, Artigo número 928.

GREER, L. A.; HARPER, J. D. I.; STEEL, C. C. Infection of *Vitis vinifera* (cv Chardonnay) Inflorescences by *Colletotrichum acutatum* and *Greeneria uvicola*. **Journal of Phytopathology**. v. 80, n. Dar 76901, p. 407–410, 2013. DOI:<10.1111/jph.12201>.

GREER, L. et al. Ripe rot of south-eastern Australian wine grapes is caused by two species of *Colletotrichum*: *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* with differences in infection and fungicide sensitivity. **Australian journal of Grape and Wine Research**. v. 17, n. 2, p 123-128, 2011.

GUERREIRO, F.G. Estudos histológicos e Epidemiológicos para posterior desenvolvimento de um modelo de infecção para a podridão da uva madura. **Trabalho de conclusão de curso**, Centro Federal de Educação Tecnológica. Curso Superior de Tecnologia em Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves, RS. 47p. 2006.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPFER, J. W. Endophytic Bacteria in Agricultural Crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HAMADA, E.; ANGELOTTI, F.; GARRIDO, L. DA R., GHINI, R.; CARVALHO, M.C.; PALLADINO, R.P. Efeito das mudanças climáticas sobre a favorabilidade às podridões de uva madura e cinzenta da videira no nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia Física**. n. 6. p. 1213-1221. 2011.

HAMANN, F. A. Aspectos do controle biológico de *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. em videira. 2011. **Dissertação** (Mestrado) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

HAMAOKA, K.; AOKI, Y.; SUZUKI, S. Isolamento e Caracterização do Endófito *Bacillus velezensis* KOF112 do Xilema de Broto de Videira como Agente de Controle Biológico de Doenças Fúngicas. **Plantas**, 10 , 1815, 2021.

HARPER, L. A.; DERBYSHIRE, M. C.; LOPEZ-RUIZ, F. J. Identificação e caracterização de *Botrytis medusae*, uma nova espécie críptica que causa mofo cinzento em uvas para vinho na Austrália. **Plant Pathology**, v. 68, p. 939-953, 2019.

HED, B.; NGUGI, H.K.; TRAVIS, J.W. Short- and Long-Term Effects of Leaf Removal and Gibberellin on Chardonnay Grapes in the Lake Erie Region of Pennsylvania. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.66, p.22-29, 2015.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Efeitos benéficos para as plantas de *Trichoderma* e seus genes. **Microbiology**, v. 158, n. 1, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.052274-0>.

IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em < <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201levantamento-sistemico-da-producao-agricola>>. 2024.

JASPERS, M. V.; SEYB, A. M.; TROUGHT, M. C. T.; BALASUBRAMANIAM, R. Overwintering grapevine debris as an important source of *Botrytis cinerea* inoculum. **Plant Pathology**, 62, 130–138, 2013.

JASPERS, M. V.; SEYB, A. M.; TROUGHT, M. C. T.; BALASUBRAMANIAM, R. Necrotic grapevine material from the current season is a source of *Botrytis cinerea* inoculum. **Eur J Plant Pathol**, 144:811–820, 2016.

KALILI, Adil; EL OUAFI, Rachida; ABOUKHALAF, Abdelghani; NACIRI, Kaoutar; TBATOU, Manal; MOUJABBIR, S.; BELAHYAN, A.; BELAHSEN, Rekia. Composição nutricional e compostos bioativos de uma variedade local de *Vitis vinifera* L. cultivada em Marrocos. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, v. 74, n. 1, p. 41-48, 2023. DOI: 10.32394/rpzh.20.

KELLER, M. **The science of grapevines: anatomy and physiology**. London: Elsevier, 2010. 377 p.

KELLER, M.; VIRET, O.; COLE, F. M. Infecção por *Botrytis cinerea* em flores de videira: reação de defesa, latência e expressão da doença. **Fitopatologia**, v. 93, p. 316-322, 2003.

MARIN-FELIX, Y. et al. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. **Studies in Mycology**, v. 86, p. 99-216, mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.04.002>.

MATHRE, D. E.; COOK, R. J.; CALLAN, N. W. From discovery to use: traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. **Plant Disease**, v. 83, p. 972–983, 1999.

MEDEIROS, Flavio H. V.; SILVA, Julio Carlos Pereira; PASCHOLATI, Sérgio Florentino. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIN, Lillian; RESENDE, Jorge A. M.; BERGAMIN FILHO, Armando (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. São Paulo: Ceres, 2018. v. 1, cap. 17, p. 261-274.

MELLO, L. M. R. et al. Vitivinicultura brasileira: panorama 2018. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho. Embrapa Uva e Vinho. **Comunicado Técnico**, 210. 2019.

MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: panorama 2015. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho. Embrapa Uva e Vinho. **Comunicado Técnico**, 191. 2016.

MENEGUZZO, J. et al. Efeito de *Botrytis cinerea* na composição do vinho Gewürztraminer. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, Campinas, 2006.

MOLITOR, D.; BEHR, M.; HOFFMANN, L.; EVERS, D. Impact of grape cluster division on cluster morphology and bunch rot epidemic. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.63, n.4, p.508-514, 2012.

NOGUEIRA, E. M. C. Doenças fúngicas da videira: sintomas e manejo. Instituto Biológico. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. **Documento Técnico**, n. 32. São Paulo, 2017. p. 1-21.

OLIVEIRA, José Eudes de Moraes; LOPES, Paulo Roberto Coelho; MOREIRA, Andréa Nunes. Produção integrada no Vale do São Francisco: situação e perspectivas – a produção integrada de uvas como caso de sucesso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOSSANIDADE (**CONBRAFR**), 1., 2011, Jaboticabal – SP. Anais... Jaboticabal – SP: UNESP, 2011. p. 6 de 53.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DA VINHA E DO VINHO. Data Discovery Report. Disponível em: <<https://www.oiv.int/what-we-do/data-discovery-report?oiv>>.

PERTOT, I.; GIOVANNINI, O.; BENANCHI, M.; CAFFI, T.; ROSSI, V.; MUGNAI, L. COMBINING biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine. **Crop Prot.** 2017, 97, 85–93.

PRADELLA, S.M. Determinação do período de maior suscetibilidade à podridão da uva madura e avaliação de métodos alternativos. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do sul, RS. 46 p.

RABBEE, Muhammad Fazle et al. Endophyte mediated biocontrol mechanisms of phytopathogens in agriculture. **Research in Microbiology**, Available online 9 July 2024. In Press, Corrected Proof. DOI:< <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2024.104229>>.

REYNIER, A. Manual de viticultura. 2ª Ed. Mem Martins : Publicações **Europa-América** Ltda. 1986. 424p.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. Suco de uva. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2007. 45 p. (Coleção Agroindústria Familiar).

SAITO, S. et al. *Botrytis californica*, uma nova espécie críptica no complexo de espécies *B. cinerea* causando mofo cinzento em mirtilos e uvas de mesa. *Mycologia*, v. 108, n. 2, p. 330-343, 2016.

SAWANT, S. I.; WADKAR, P. N.; RAJGURU, R. Y.; MHASKE, N. H.; SALUNKHE V. P.; SAWANT, S. D.; UPADHYAY, A. Potencial de biocontrole de duas novas cepas de *Bacillus* associadas à videira para o manejo da doença da antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, **Biocontrol Science and Technology**, 26:7, 964-979, 2016.

SBRAVATTI JUNIOR, J.A.; POITEVIN, C.G.; ROBL, D.; SANTOS, A.F. DOS; PIMENTEL, I.C.; DALZOTO, P.R.; AUER, C.G. Redução da severidade do mofo cinzento em mudas de *Eucalyptus benthamii* tratadas com *Trichoderma atroviride*. **Summa Phytopathologica**, v.42, n.4, p.363-365, 2016.

SCHENATO, P.G. et al. Influencia da temperatura e do período de molhamento na infecção de bagas de uva por *Glomerella cingulata*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 2008. **Anais...** Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2008. 102 p.

SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. **Biological Control**, v. 50, p. 205-221, 2009.

SILVA, P. C. G.; COELHO, R. C. A viticultura no Submédio do Vale São Francisco: Importância econômica e social da videira. **Embrapa Semiárido**. Sistemas de Produção, 1 – 2ª.edição. ISSN 1807-0027. Versão Eletrônica. Agosto, 2010.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R. Uva – Sabor à mofo. Cultivar HF, n. 32, p. 40–42, 2005.

SÔNEGO, O.R., INÁCIO, C.A. & DIANESE, J.C. First report of *Botryosphaeria dothidea* and *Eutypa lata* on grapevine in Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira** 24:333. 1999.

SOUSA, E. C., UCHÔA-THOMAZ, A. M. A., CARIOCA, J. O. B., MORAIS, S. M. DE, LIMA, A. DE, MARTINS, C. G., ... RODRIGUES, L. L. Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. **Food Science and Technology** (Campinas), 34(1), 135–142, 2014. DOI: <10.1590/s0101-20612014000100020>.

SOUTHWORTH, E. A. A new grape disease. **Journal of Mycology**, v. 7, n. 1, p. 14-16, 1891.

STAMPANONI, K. C. R. Basic flavour descriptive language. *Przem. Spoż*, 4, 36-39, 1998.

STEEL, C. C.; GREER, L. A.; SAVOCCHIA, S. Grapevine inflorescences are susceptible to the bunch rot pathogens, *Greeneria uvicola* (bitter rot) and *Colletotrichum acutatum* (ripe rot). **European Journal of Plant Pathology**, v. 133, p. 773–778, 2012.

STEINER, D. *et al.* Asymptomatic grapevine leaves harbor inoculum for *Colletotrichum* spp. Resumo apresentado no: **13th International Epidemiology Workshop**, Foz do Iguaçu, PR, 2024. p. 74.

SU, Kai *et al.* Candidate gene discovery of *Botrytis cinerea* resistance in grapevine based on QTL mapping and RNA-seq. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1127206, 2023. DOI: 10.3389/fpls.2023.1127206.

TESSMANN, Dauri José; VIDA, João Batista; GENTA, Werner; ROBERTO, Sergio Ruffo; KISHINO, Antonio Yoshio. Doenças e seu manejo. In: KISHINO, Antonio Yoshio; CARVALHO, Sergio Luiz Colucci de; ROBERTO, Sergio Ruffo (Eds.). **Viticultura Tropical: o sistema de produção de uvas de mesa do Paraná**. 1. ed. Londrina: IAPAR, 2019. p. 155-244.

VALDÉS-GOMÉZ, H. et al. Grey mould incidence is reduced on grapevines with lower vegetative and reproductive growth. **Crop Protection** 27, 2008. p. 1174–1186.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R. Characterization and neotypification of *Gloeosporium kaki* Hori as *Colletotrichum horii* nom. nov. **Mycotaxon** 111:209–219. 2010.

- WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. Studies in Mycology. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115–180, 2012.
- WILCOX WF, GUBLER WD, UYEMOTO JK (Eds.). PART I: Diseases Caused by Biotic Factors. In: Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests, Second Edition (pp. 17–146). **The American Phytopathological Society**. 2015.
- WILLIAMSON, B. et al. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 5, p. 561–580, 2007.
- WURZ, D. A. et al. Desfolha precoce como estratégia de controle da podridão de *Botrytis cinerea* na videira Cabernet Sauvignon em regiões de altitude. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.2, p.111-117, 2017.
- YAMAMOTO, J.; SATO, T.; TOMIOKA, K. Occurrence of ripe rot of grape (*Vitis vinifera* L.) caused by *Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 65, p. 83-86, 1999.
- YAMAMOTO, L. Y. et al. Produção e características físico-químicas dos cachos da videira 'BRS Clara' sob cobertura plástica e sombrite em safra fora de época. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.34, n.1, Jaboticabal, 2012.
- YOKOSAWA S, EGUCHI N, SATO T Characterization on of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex causing grape ripe rot in Nagano Prefecture, Japan. **Journal of General Plant Pathology**, 86(3):163–172, 2020. DOI:<<https://doi.org/10.1007/s10327-020-00907-5>>.
- ZHOU, J. et al. Identificação morfológica e filogenética de *Botrytis sinoviticola*, uma nova espécie críptica que causa a doença do mofo cinzento das uvas de mesa (*Vitis vinifera*) na China. *Mycologia*, 2014.

## **CAPÍTULO I – PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE BAGAS DE *V. labrusca* PARA CONTROLE DE PODRIDÕES DE CACHO DE UVA**

Camila Iavorski Zela, Camilla Castellar, Débora de Oliveira Franco, Renata Faier Calegario,  
Louise Larissa May De Mio

### **RESUMO**

As podridões de cacho de uva são um problema crescente no Brasil. Os principais agentes causais de podridões são *Colletotrichum* spp. (podridão da uva madura) e *Botrytis cinerea* (podridão cinzenta). Embora o controle químico seja o principal método utilizado para o manejo dessas doenças, ele apresenta limitações como a seleção de patógenos resistentes e impactos ambientais. Desta forma, o controle biológico desponta como uma alternativa de manejo, no entanto, produtos biológicos ainda são limitados na viticultura. A prospecção de microrganismos endofíticos, especialmente de *Vitis labrusca*, considerada mais resistente a esses patógenos, pode ser uma abordagem interessante para o desenvolvimento de novos produtos biológicos. Neste estudo, isolados endofíticos foram obtidos de bagas de uva da cultivar 'Bordô', colhidas em um pomar comercial em Campo Largo, PR. Frutos de ramos com diferentes números de aplicações de fungicidas (0, 2 e 5) foram coletados e processados para isolamento dos microrganismos endofíticos usando diferentes meios de cultura (NA, LB e BDA), e as colônias obtidas foram armazenadas para posterior análise. Os isolados de *Colletotrichum nymphaeae* (VICnPR20-A1R2) e de *Botrytis cinerea* (VvBcSP21-B1) foram obtidos pela metodologia "overnight freezing", identificados molecularmente e confirmados como patogênicos em *V. labrusca* e *V. vinifera*. Uma triagem foi realizada para verificar o potencial antagonístico dos isolados endofíticos contra esses patógenos. A metodologia de pareamento de colônias foi usada para testar a inibição do crescimento micelial dos patógenos em placas de Petri. Os endofíticos que reduziram significativamente o crescimento dos patógenos foram selecionados para identificação molecular. Assim, procedeu-se a extração de DNA dos isolados utilizando kit comercial, seguida de amplificação por PCR da região ITS do rDNA para leveduras e 16S-rDNA para bactéria. Os amplicons foram sequenciados e as sequências geradas comparadas com sequências disponíveis no GenBank e LPSN para elaboração de árvores filogenéticas. Como resultado da prospecção foram obtidos 88 isolados endofíticos de bagas de *V. labrusca*, dos quais 52 sobreviveram ao armazenamento. Os isolados foram obtidos de parcelas com diferenças na frequência de uso de fungicidas: sem fungicida (18 isolados), com duas aplicações (12) e com cinco aplicações de fungicidas em campo (22). A prospecção mostrou que, independentemente do manejo com fungicidas, a maioria dos isolados inibiu o crescimento de *Colletotrichum nymphaeae* e *Botrytis cinerea*, com reduções de até 57,3% e 67,6%, respectivamente. Quatro isolados (PA1N, isolado de baga com nenhuma aplicação de fungicida e VA4L, VB5B e VC2N, isolados de bagas com cinco aplicações de fungicidas) mostraram-se consistentemente desfavoráveis ao crescimento de ambos os patógenos em todos os experimentos e foram selecionados para identificação. VA4L foi identificado como *Clavispora*, VB5B como *Zygoascus* e PA1N como *Tatumella*. VC2N não foi identificado. Esses resultados destacam a importância de explorar a diversidade microbiana associada às plantas menos suscetíveis a doenças na busca por soluções alternativas. As bagas de uva da cv. 'Bordô' revelaram uma microbiota potencialmente antagonística aos principais agentes causais de podridões de cacho de uvas e os isolados identificados são promissores para futuros testes para identificar mecanismos de ação e potencial para controle de doenças em frutos de cultivares suscetíveis às podridões.

Palavras-chave: *Vitis* spp., agentes de controle biológico, agricultura sustentável

## CHAPTER I – SCREENING OF ENDOPHYTIC MICROORGANISMS FROM *Vitis labrusca* BERRIES FOR THE CONTROL OF GRAPE BUNCH ROT

Camila Iavorski Zela, Camilla Castellar, Débora de Oliveira Franco, Renata Faier Calegario,  
Louise Larissa May De Mio

### ABSTRACT

Grapevine bunch rots are a growing problem in Brazil. The main causal agents of rot are *Colletotrichum* spp. (grape ripe rot) and *Botrytis cinerea* (gray mould). Although chemical control is the main method used to manage these diseases, it has limitations such as the selection of resistant pathogens and environmental impacts. Biological control is therefore emerging as a management alternative, but biological products are still limited in viticulture. The prospecting of endophytic microorganisms, especially from *Vitis labrusca*, which is considered to be more resistant to these pathogens, could be an interesting approach for the development of new biological products. In this study, endophytic isolates were obtained from grape berries of the 'Bordô' cultivar, harvested from a commercial orchard in Campo Largo, PR. Fruits from branches with different numbers of fungicide applications (0, 2 and 5) were collected and processed for isolation of endophytic microorganisms using different culture media (NA, LB and BDA), and the colonies obtained were stored for later analysis. Isolates of *Colletotrichum nymphaeae* (VICnPR20-A1R2) and *Botrytis cinerea* (VvBcSP21-B1) were obtained using the overnight freezing methodology, identified molecularly and confirmed as pathogenic on *V. labrusca* and *V. vinifera*. Screening was carried out to verify the antagonistic potential of the endophytic isolates against these pathogens. The colony pairing methodology was used to test the inhibition of the pathogens' mycelial growth in Petri dishes. The endophytes that significantly reduced the growth of the pathogens were selected for molecular identification. DNA was extracted from the isolates using a commercial kit, followed by PCR amplification of the ITS region of the rDNA for yeasts and 16S-rDNA for bacteria. The amplicons were sequenced and the sequences generated were compared with sequences available on GenBank and LPSN to create phylogenetic trees. As a result of the prospecting, 88 endophytic isolates were obtained from *V. labrusca* berries, 52 of which survived storage. The isolates were obtained from plots with different frequency of fungicide use: without fungicide (18 isolates), with two applications (12) and with five fungicide applications in the field (22). Prospecting showed that, regardless of fungicide management, most of the isolates inhibited the growth of *Colletotrichum nymphaeae* and *Botrytis cinerea*, with reductions of up to 57.3% and 67.6%, respectively. Four isolates (PA1N, isolated from berries with no fungicide application and VA4L, VB5B and VC2N, isolated from berries with five fungicide applications) were consistently unfavorable to the growth of both pathogens in all experiments and were selected for identification. VA4L was identified as *Clavispora asparagi*, VB5B as *Zygoascus meyeriae* and PA1N as *Tatumella morbirosei*. VC2N was not identified. These results highlight the importance of exploring the microbial diversity associated with plants that are less susceptible to disease in the search for alternative solutions. 'Bordô' grape berries revealed a microbiota potentially antagonistic to the main causal agents of grapevine bunch rots and the isolates identified are promising for future tests to identify mechanisms of action and potential for disease control in fruit from cultivars susceptible to rots.

Keywords: *Vitis* spp., biological control agents, sustainable agriculture

## 1 INTRODUÇÃO

Podridões de cacho de uva são limitantes para o sucesso do cultivo, pois afetam a estética e as características organolépticas dos frutos e seus produtos, como o suco e o vinho (Sônego; Garrido, 2005; Meneguzzo *et al.* 2006; Rizzon; Meneguzzo, 2007). No Brasil, dentre os patógenos que causam as podridões, dois são considerados os mais relevantes: *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum* spp., que causam a podridão cinzenta e a podridão da uva madura, respectivamente (Nogueira *et al.*, 2017). As podridões ocorrem em ampla faixa de temperatura e são favorecidas por safras chuvosas próxima à colheita dos frutos, característica comum no sul do Brasil, em anos sob influência do fenômeno *El Niño* ou marcado pela neutralidade no clima (Sônego; Garrido, 2005).

O controle químico é o principal método de controle utilizado para o controle das podridões de cacho, envolvendo pulverizações com fungicidas no inverno e durante o ciclo de cultivo. Contudo, esse método possui limitações como o período de carência do produto, a seleção de populações de patógenos resistentes, além dos impactos causados ao meio ambiente e à saúde do consumidor (Sharma *et al.*, 2009; Burandt *et al.*, 2024). Como alternativa, o controle biológico pode ser uma opção (Bettiol; Morandi, 2009; Medeiros *et al.*, 2018), mas a disponibilidade de produtos biológicos para a viticultura é limitada, apenas espécies do gênero *Bacillus* e *Trichoderma* são registradas para uso na cultura (AGROFIT, 2024).

Nesse contexto, a prospecção de microrganismos antagonistas aos patógenos com maior especificidade para a cultura da videira é promissora para o desenvolvimento de novos produtos biológicos. O isolamento de microrganismos presentes em hospedeiro sadio, de cultivares resistentes ou de locais sem ocorrência da doença consiste em uma boa estratégia como base de um controle biológico (Baker; Cook, 1974). Tradicionalmente, microrganismos com potencial antagonico têm sido isolados em diversos ambientes como o solo, a rizosfera e o filoplano (Keiichiro, 2021) mas poucos estudos direcionam para hospedeiros mais resistentes na cultura de interesse.

Outro aspecto interessante para prospecção de biológicos é explorar o interior dos tecidos vegetais das videiras para encontrar antagonistas com potencial para evitar podridões de cacho, as quais podem vir de infecções em flores ou de formas latentes em frutos em desenvolvimento (Steel *et al.*, 2012; Hamada *et al.*, 2011). Os microrganismos que vivem dentro das plantas sem causar danos são conhecidos como endofíticos, (De Bary, 1866). Eles promovem o crescimento vegetal e podem atuar na proteção contra patógenos ao competir por recursos, produzir substâncias antimicrobianas ou induzir a resistência sistêmica da planta

(Rabbee *et al.*, 2024). Esses organismos, ao estabelecerem relações simbióticas com as plantas, tornam-se aliados importantes na bioproteção, ajudando a reduzir a dependência de pesticidas químicos e promovendo práticas agrícolas mais sustentáveis e ecologicamente corretas (Alabid *et al.*, 2019). Em videira, a diversidade microbiana endofítica é menor em comparação à epífita, contudo, as bactérias endofíticas apresentam maior capacidade de inibir o crescimento micelial de *Phytophthora infestans* e *B. cinerea* em comparação com os presentes no filoplano (Bruissson *et al.*, 2019). *Bacillus velezensis* foi isolado do xilema de brotos de videira e teve eficácia no controle de *Colletotrichum* (Hamaoka *et al.*, 2021).

No caso da videira em relação a podridões de cachos, a prospecção de microrganismos endofíticos de *V. labrusca*, mais resistente a *Colletotrichum* spp. e *B. cinerea* em comparação à *V. vinifera* (Keller, 2010), pode ser promissora para encontrar potenciais antagonistas aos patógenos. Assim, o objetivo deste estudo foi prospectar microrganismos endofíticos de bagas de uva da cultivar ‘Bordô’ isolados em campo de cultivo com e sem aplicação de fungicidas, com potencial efeito antagonista aos patógenos *Colletotrichum* e *Botrytis*, agentes causais das podridões. Os isolados endofíticos, resistentes ao processo de armazenamento, e com efeito sobre ambos patógenos, foram selecionados e identificados molecularmente para serem recomendados em testes subsequentes para controle de podridão da uva madura e podridão cinzenta.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE BAGAS DE *V. labrusca* E DOS PATÓGENOS

#### 2.1.1 Obtenção dos isolados endofíticos de bagas de *V. labrusca*

Os isolados endofíticos foram obtidos de bagas de uva da cultivar ‘Bordô’ colhidas em pomar comercial localizado no município de Campo Largo, Paraná, Brasil, durante a Safra 2019/20. No ponto de colheita ( $^{\circ}\text{Brix} \geq 14^{\circ}$ ), 16 ramos oriundos de poda longa, direcionados para a entrelinha, com 0 aplicações de fungicidas, 16 ramos com 2 aplicações e 16 ramos com 5 aplicações de fungicidas foram selecionados para a coleta de frutos. O primeiro cacho de cada ramo foi colhido e transportado ao laboratório de epidemiologia molecular (LEMID), da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Na sequência, oito bagas de cada cacho foram desinfestadas superficialmente durante um minuto em álcool 70%, um minuto em hipoclorito de sódio (0,5%), seguido de três lavagens sucessivas em água destilada esterilizada (ADE). Um corte foi realizado nas bagas, com auxílio de um estilete, para extração de 50 µL de suco de uva/cacho, os quais foram depositados em placas de Petri contendo meio de cultura.

Três meios de cultura foram utilizados, sendo eles: Batata Dextrose Ágar (BDA) (39 g.L<sup>-1</sup>) contendo fungicida difenoconazol (12 mL.L<sup>-1</sup>), o Nutrient Ágar (NA) (Nutrient Broth 12 g.L<sup>-1</sup>, ágar 20 g.L<sup>-1</sup>) e o Luria Bertani Modificado (LB) (Peptona 10 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup>, cloreto de sódio 1 g.L<sup>-1</sup>, ágar 20 g.L<sup>-1</sup>). As alíquotas foram espalhadas com base no método de estrias, com auxílio de uma alça de Drigalski. As 144 placas (16 cachos x 3 números de aplicação de fungicidas x 3 meios de cultura) foram mantidas em câmara de incubação com temperatura de 28°C ± 1°C e fotoperíodo de 12 horas.

Após 48 horas de incubação do plaqueamento, uma unidade formadora de colônia com aproximadamente 2 mm de diâmetro foi selecionada por placa e transferida para microtubos contendo solução salina composta por água destilada e cloreto de sódio 0,85%. Inicialmente, os isolados foram armazenados pelo Método de Castellani (1939). Após condução dos ensaios de caracterização dos isolados, estes foram armazenados em glicerol 25% a temperatura de -20°C.

#### 2.1.2 Obtenção dos isolados de *Colletotrichum* sp. e de *Botrytis* sp.

Os isolados fúngicos foram obtidos pela técnica de overnight freezing (ONFIT), adaptado de Luo e Michailides (2001). Primeiramente, foi realizada a desinfestação da superfície das bagas, conforme descrito no item 2.1.1. Posteriormente, as bagas foram submetidas a temperatura de -20°C no escuro por um período de 15 horas. Após esse período, as bagas foram transferidas para recipientes Gerbox® com uma grade suspensa com 20 mL de água destilada esterilizada e incubadas em um ambiente com temperatura de 23,5 ± 2,5 °C.

O isolado de *Colletotrichum* sp. (VICnPR20-A1R2) foi obtido de frutos de uva da cultivar 'Bordô' (*V. labrusca*) colhidas em pomar localizado no município de Campo Largo, Paraná, Brasil, durante a Safra 2019/20 (25°24'10,5"S; 49°29'46,7"O). O isolado de *Botrytis* sp. (VvBcSP21-B1) foi obtido em São Roque, São Paulo, Brasil, em pomar de *V. vinifera*, durante a safra 2020/21 (23°35'37,5"S; 47°9'40"O). Após o isolamento inicial, uma colônia monospórica foi obtida de cada um dos fitopatógenos e a patogenicidade de cada isolado confirmada após inoculação em bagas de *V. labrusca* e *V. vinifera*.

Os isolados obtidos foram armazenados na coleção fitopatológica do Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças de Plantas (LEMID), na Universidade Federal do Paraná, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, com o código de referência para a cultura da uva (*V. labrusca* - LEMIDVI ou *V. vinifera* - LEMIDVv). A preservação dos isolados foi realizada pelo método de papel filtro, com sílica gel, armazenados em temperatura de -20°C (Sinclair; Dhingra, 1995).

## 2.2 PROSPECÇÃO DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS ANTAGONISTAS

Uma triagem dos microrganismos endofíticos obtidos das bagas de *V. labrusca* foi realizada para verificar seu potencial antagônico aos patógenos *C. nymphaeae* e *B. cinerea*, agentes causais das podridões de cacho de uva, utilizando a metodologia de pareamento de colônias descrita por Dennis e Webster (1971), com algumas modificações.

Colônias de *C. nymphaeae* (VICnPR20-A1R2) e de *B. cinerea* (VvBcSP21-B1) foram crescidas durante 7 dias em meio de cultura BDA à  $24 \pm 2$  °C, sob fotoperíodo de 12 horas.

Os 52 isolados endofíticos obtidos foram multiplicados durante 3 dias a  $28 \pm 2$  °C em placas de Petri contendo os meios de cultura BDA, LB ou NA, conforme o meio utilizado no isolamento inicial do microrganismo (TABELA 3). Após esse período, foram adicionados 1000 µL de solução salina (ADE e cloreto de sódio a 0,85%) às placas, seguidos pela raspagem das células dos microrganismos endofíticos com o auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida, 100 µL dessa suspensão, contendo os endofíticos, foram transferidos para novas placas de Petri, onde permaneceram a  $28 \pm 2$  °C por mais 24 horas.

Após esse período, discos de micélio de 8 mm de diâmetro de cada patógeno foram centralizados em placas de meio BDA. Em seguida, 5 µL dos isolados endofíticos foram depositados a 15 mm de distância do patógeno, em quatro pontos equidistantes nas bordas da placa. As placas foram incubadas a  $24 \pm 2$  °C, com fotoperíodo de 12 horas. Placas contendo apenas o patógeno foram utilizadas como controle.

Cada isolado endofítico de bagas de *V. labrusca* foi testado em três repetições para cada patógeno. O diâmetro das colônias de *C. nymphaeae* e de *B. cinerea* foi medido após 7 e 4 dias após o pareamento, respectivamente. Porcentagens de crescimento micelial dos patógenos de cada tratamento com relação à testemunha foram obtidas. O experimento foi realizado em duplicata.

As colônias de *C. nymphaeae* e de *B. cinerea* que apresentaram crescimento micelial maior que o da testemunha, foram classificadas como isolados endofíticos favoráveis ao

crescimento do patógeno. Ao contrário, aquelas que apresentaram crescimento micelial menor que o da testemunha, foram classificadas como isolados endofíticos desfavoráveis ao crescimento do patógeno, enquanto que as colônias que não apresentaram diferenças significativas em relação à testemunha, foram classificadas como isolados endofíticos indiferentes ao crescimento do patógeno.

Os isolados endofíticos de *V. labrusca* que apresentaram redução de crescimento micelial dos dois patógenos nas duas repetições experimentais foram considerados com potencial antagônico e foram selecionados para a identificação molecular.

Para a análise dos dados, as homogeneidades das variâncias foram verificadas pelo teste de Bartlett e a normalidade dos resíduos verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando necessário, foram realizadas transformações logarítmicas nos dados para atender esses pressupostos. Depois, foi realizada análise de variância (ANOVA), verificando-se o efeito de tratamentos pelo teste F, seguida do teste de Dunnett, à 5% de significância, para comparação múltipla de médias. Os resultados do teste são intervalos de confiança.

## 2.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS E PATOGÊNICOS

### 2.3.1 Isolamento de DNA

Para os isolados endofíticos de bagas de *V. labrusca* (VA4L, VB5B e PA1N), que foram selecionados após os ensaios descritos no item 2.2., aproximadamente 150 mg de massa celular de levedura ou bacteriana foram utilizadas para extração de DNA com o kit Wizard Magnetic DNA Purification System (Promega), conforme recomendações do fabricante.

O DNA do isolado de *Colletotrichum* sp. (VICnPR20-A1R2) e *Botrytis* sp. (VvBcSP21-B1) foi extraído utilizando a metodologia CTAB, com alguns ajustes (Doyle; Doyle, 1987; Pereira *et al.*, 2019). Um segmento de micélio obtido das culturas fúngicas com sete dias de crescimento foi adicionado em microtubos contendo 800 µL de tampão CTAB (2% CTAB; 100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM EDTA; 1.4 M NaCl, 1% PVP, 2% β-mercaptoethanol). Os tubos foram incubados em banho-maria com temperatura de 65°C por 30 minutos, com agitação intermitente a cada 15 minutos. Em seguida, foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos e 400 µL do sobrenadante resultante de cada amostra transferidos para novos microtubos contendo 400 µL de álcool isoamílico/clorofórmio (24/1). Os tubos foram novamente centrifugados a 13500 rpm por seis minutos e, após centrifugação, o sobrenadante

foi coletado, transferido para microtubos contendo 120  $\mu\text{L}$  de isopropanol, e incubados a  $-20^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 13500 rpm por 22 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet resultante lavado em 1000  $\mu\text{L}$  de 70% de etanol. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 13500 rpm por 12 minutos, o sobrenadante descartado, o pellet seco em temperatura ambiente e, após secagem, ressuspendido em 30  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e armazenado a  $-20^\circ\text{C}$ .

O DNA dos isolados endofíticos e patogênicos foi analisado quanto à concentração e à pureza em nanodrop (Nanodrop One Thermo scientific).

### 2.3.2 Amplificação por PCR

Para a identificação molecular dos isolados utilizados neste estudo, as reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em termociclador Thermo Scientific Arktik Thermal Cycler (Thermo Fischer Scientific Inc.). O volume total de cada reação foi de 12,5  $\mu\text{L}$ , compreendendo 1,5  $\mu\text{L}$  de DNA (10 ng.  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 6,25  $\mu\text{L}$  de Master Mix GoTaq® G2 Colorless (Promega®) e 0,5  $\mu\text{L}$  de cada primer (10  $\mu\text{M}$ ), completando o volume com água estéril (DNA nuclease free). As regiões gênicas amplificadas para cada isolado e seus respectivos primers e referências estão dispostas na Tabela 1.

Para os isolados endofíticos VA4L e VB5B, o programa de amplificação utilizado foi desnaturação inicial a  $96^\circ\text{C}$  por 4 min, seguido de 32 ciclos de desnaturação ( $96^\circ\text{C}$  por 30 s), anelamento ( $58^\circ\text{C}$  por 45 s) e extensão ( $72^\circ\text{C}$  por 45 s) e uma etapa de extensão final a  $72^\circ\text{C}$  por 5 min. Quanto ao isolado PA1N, o programa de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial a  $96^\circ\text{C}$  por 4 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação ( $96^\circ\text{C}$  por 30 s), anelamento ( $60^\circ\text{C}$  por 45 s) e extensão ( $72^\circ\text{C}$  por 90 s) e extensão final a  $72^\circ\text{C}$  por 5 min.

Para a identificação do isolado VICnPR20-A1R2 de *Colletotrichum* sp., utilizou-se inicialmente primers-específicos (TABELA 1) para separação dos complexos. Dois isolados previamente identificados foram usados como controles na reação sendo um de *C. acutatum*, controle positivo, e outro de *C. gloeosporioides*, controle negativo. A amplificação seguiu o protocolo de Freeman *et al.* (2000) para CaInt2/ITS4. Para identificação a nível de espécie foi amplificada a região do ITS-rDNA, e os genes parciais *GAPDH*, e *TUB2*. As condições das PCRs foram elaboradas de acordo com os trabalhos de Weir *et al.* (2012) e Damm *et al.* (2012).

Quanto à identificação do isolado VvBcSP21-B1, de *Botrytis* sp., o gene parcial *G3PDH* foi amplificado em reação multiplex descrita por Li *et al.* (2012).

Após a amplificação, os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5x (44,5 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8,0), corado com GelRed (Invitrogen®).

Os amplicons dos isolados endofíticos foram enviados para sequenciamento na empresa GoGenetic®. Já, fragmentos amplificados para *Colletotrichum* spp. foram armazenados a -20°C e, então, enviados para sequenciamento na empresa biológica BioSeq®.

TABELA 1 - PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DE MATERIAL GENÔMICO PROVENIENTE DE ENDOFÍTICOS DE *Vitis labrusca* E DE ISOLADOS PATÔGENICOS.

	Isolado	Gene <sup>1</sup>	Primer	Referência
Endofíticos	VA4L	ITS	ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG G-3')	White <i>et al.</i> (1990)
			ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT GATATGC-3')	
	VB5B	ITS	ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG G-3')	White <i>et al.</i> (1990)
			ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT GATATGC-3')	
	PA1N	16S	27F (5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3')	Lane (1991)
			1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')	Stackebrandt; Liesack (1993)
Patógenos		CaInt2	CaInt2 (5' – GGGGAAGCCTCTCGCGG – 3')*	Sreenivasaprasad <i>et al.</i> (1996)
			ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')	White <i>et al.</i> (1990)
		ITS	ITS-1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3')	Gardes; Bruns (1993)
			ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')	White <i>et al.</i> (1990)
	VICnPR20-A1R2	GAPDH	GDF1 (5'-GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA-3')	Templeton <i>et al.</i> (1992)
			GDR1 (5'-GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT-3')	Templeton <i>et al.</i> (1992)
	TUB2	T1 (5'-AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT-3')	O'Donnell; Cigelnik (1997)	
		Bt2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3')	Glass; Donaldson (1995)	
VvBcSP21-B1	G3PDH	G3PDH-F1 (5'-GGACCCGAGCTAATTTATGTCACGT-3')* G3PDH-F2 (5'-GGGTGTCAACAACGAGACCTACT-3')* G3PDH-R (5'-ACCGGTGCTCGATGGGATGAT-3')	Li <i>et al.</i> (2012)	

<sup>1</sup>ITS = Internal transcribed spacer; *GAPDH* = Glycerolaldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *TUB2* =  $\beta$ -tubulin 2; *G3PDH* = Glycerolaldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *16S* = DNA ribossômico. Sequências marcadas com \* representam primer-específico.

### 2.3.3 Análise filogenética

As sequências *foward* e *reverse* produzidas foram submetidas à análise e correção manual com base nos eletroferogramas correspondentes, utilizando o programa de software SeqAssem (Hepperle, 2004). Em seguida, as sequências *consensus* de cada isolado foram

obtidas e comparadas com sequências disponíveis no GenBank (NCBI), através da ferramenta BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

As árvores filogenéticas foram elaboradas por alinhamento múltiplo de sequências *consensus* dos isolados com as sequências de espécies-tipo de cada gênero (TABELA 2 – isolados endofíticos e ANEXO I – *Colletotrichum* spp.) acessíveis no LPSN (Lista de nomes procarióticos com nomenclatura permanente) (<https://www.bacterio.net/>), para bactéria e no Mycobank (<https://www.mycobank.org/>), para fungos e leveduras, empregando o programa MAFFT v.7 *online* (Kato; Standley, 2019) e ajustadas manualmente no MEGA 7 (Kumar *et al.* 2016).

As análises filogenéticas de inferência bayesiana (BI) e máxima verossimilhança (ML) foram realizadas utilizando o software PhyloSuite (Zhang *et al.* 2020), incorporando o plugin ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.* 2017) para determinar o modelo evolutivo ideal. A determinação dos valores do modelo e da pontuação foi baseada no Critério de Informação de Akaike corrigido (AICc).

A reconstrução filogenética baseada em BI foi executada empregando o algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC), com probabilidade *posteriori* bayesiana (BPP), com a utilização do plugin MrBayes (Ronquist *et al.*, 2012). Isso envolveu a seleção de “modelos de partição”, com 10.000.000 de iterações para geração de árvores, amostrando as árvores a cada 1.000 gerações, resultando em 10.000 árvores. Uma taxa de descarte de 25% das árvores iniciais (25% de queima) foi implementada para mitigar o impacto inicial do processo iterativo, e os valores de BPP foram derivados da árvore de *consensus* utilizando as 7.500 árvores restantes. As análises foram encerradas quando o desvio padrão médio das frequências divididas caiu abaixo de 0,01.

Em relação à árvore filogenética ML, foi empregado o plugin IQ-TREE versão 1.6.8 (Ronquist *et al.*, 2012), optando pelo bootstrap ultrarrápido com 5000 réplicas, 1000 iterações e um valor mínimo de coeficiente de correlação de 0,99.

Os resultados das árvores filogenéticas foram visualizados utilizando o software FigTree v.1.4.4 (Rambaut, 2018) e exportados para posterior edição em um software gráfico Inkscape ([www.inkscape.org/](http://www.inkscape.org/)).

TABELA 2 – ISOLADOS UTILIZADOS PARA ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE BAGAS DE *V. labrusca* COM POTENCIAL ANTAGONISTA.

Espécie	Código	Fonte	Local	ITS*
<i>Candida citri</i>	CBS 11858 <sup>T</sup>	Limão podre	Brunei	KY102033
<i>Clavispora asparagi</i>	NRRL Y-48714 <sup>T</sup> = CBS 9770 <sup>T</sup>	Fruta de <i>Asparagus filicinus</i>	China	NR_155004
<i>Clavispora carvajalis</i>	NRRL Y-48694 <sup>T</sup> = CBS 11361 <sup>T</sup>	Madeira podre	Equador	KY102022
<i>Clavispora fructus</i>	NRRL Y-17072 <sup>T</sup> = CBS 6380 <sup>T</sup>	Desconhecido	Japão	KY102093
<i>Clavispora lusitaniae</i>	CBS 6936 <sup>T</sup>	Essência de <i>Citrus</i>	Israel	KY102562
<i>Clavispora opuntiae</i>	NRRL Y-11820 <sup>T</sup> = CBS 7068 <sup>T</sup>	Cactus	Austrália	KY102568
<i>Clavispora paralusitaniae</i>	NYNU161120 <sup>T</sup>	Madeira podre	China	MF136066
<i>Clavispora phyllophila</i>	CBS 12671 <sup>T</sup>	Folha de <i>V. vinifera</i>	Tailândia	Não encontrado
<i>Clavispora reshetovae</i>	CBS 11556 <sup>T</sup>	Solo de pastagem	Alemanha	NR_137723
<i>Clavispora santaluciae</i>	A1.5 <sup>T</sup> = A_1.18 <sup>T</sup> = CBS 16465 <sup>T</sup>	Uva <i>V. labrusca</i>	Portugal	MN967319
<i>Clavispora vitiphila</i>	CBS 12672 <sup>T</sup>	Folha de <i>V. vinifera</i>	Tailândia	AB736148
<i>Clavispora xylosa</i>	NYNU 174173 <sup>T</sup>	Madeira podre	China	MG255724
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CBS 767 <sup>T</sup> = JCM 1990 <sup>T**</sup>	Caranguejo brasileiro	Brasil	NR_120016
<i>Sungouiella berkhoutiae</i>	CBS 11722 <sup>T</sup>	Excrementos de inseto de bambu	Tailândia	KY101957
<i>Sungouiella blattae</i>	NRRL Y-27698 <sup>T</sup> = ATCC MYA-4360 <sup>T</sup>	Barata	Panama	NR_111407
<i>Sungouiella dosseyi</i>	NRRL Y-27950 <sup>T</sup> = ATCC MYA-4359 <sup>T</sup>	<i>Corydalus cornutus</i> (fêmea)	Estados Unidos	NR_111406
<i>Sungouiella ecuadorensis</i>	CBS 12653 <sup>T</sup>	Madeira podre	Equador	KY102066
<i>Sungouiella ezoensis</i>	CBS 11753 <sup>T</sup>	Solo	Japão	KY102082
<i>Sungouiella floscolorum</i>	NRRL Y 48258 <sup>T</sup>	Brácteas florais de <i>Helicônia</i>	Brasil	NR_137682
<i>Sungouiella intermedia</i>	CBS 572 <sup>T</sup>	Fezes humanas	Suécia	MW284506
<i>Sungouiella inulinophila</i>	CBS 11725 <sup>T</sup>	Cogumelo não identificado	Tailândia	KY102162
<i>Sungouiella middelhoveniana</i>	CBS 12306 <sup>T</sup>	Rizosfera da cana-de-açúcar	Brasil	KY102213
<i>Sungouiella pseudofloscolorum</i>	CBS 8584 <sup>T</sup>	Planta	Guiana Francesa	KY102341
<i>Sungouiella pseudointermedia</i>	NRRL Y-10939 <sup>T</sup> = CBS 6918 <sup>T</sup>	Comida	Japão	KY102344
<i>Sungouiella sharkensis</i>	NRRL Y-48380 <sup>T</sup> = CBS 11368 <sup>T</sup>	Desconhecido	Estados Unidos	MK503789
<i>Sungouiella suratensis</i>	CBS 10928 <sup>T</sup>	Planta	Tailândia	KY102422
<i>Sungouiella thailandica</i>	CBS 10610 <sup>T</sup>	Inseto	Tailândia	NR_159560
<i>Sungouiella tsuchiyaie</i>	NRRL Y-17840 <sup>T</sup> = CBS 7195 <sup>T</sup>	Planta	Japão	NR_155010
<i>Wickerhamiella vanderwaltii</i>	CBS 5524 <sup>T**</sup>	Desconhecido	Desconhecido	NR_164372
<i>Zygoascus biomembranicola</i>	K61208211 <sup>T</sup>	Tumulo de Kitora	Japão	LC060997
<i>Zygoascus bituminiphilus</i>	CBS 8813 <sup>T</sup>	Alcatrão	Canadá	NR_137545
<i>Zygoascus detingensis</i>	NYNU201087 <sup>T</sup>	Madeira podre	China	MW374088
<i>Zygoascus flipseniorum</i>	CBS 14876 <sup>T</sup>	Solo	Holanda	MF695077
<i>Zygoascus hellenicus</i>	CBS 5839 <sup>T</sup>	Mastite bovina úbere	Alemanha	111258
<i>Zygoascus meyeriae</i>	CBS 4099 <sup>T</sup>	Mosto de uva em fermentação	Grécia	AY447022
<i>Zygoascus ofunaensis</i>	NRRL Y-10998 <sup>T</sup>	Solo	Japão	Não encontrado
<i>Zygoascus polysorbophilus</i>	NRRL Y 27161 <sup>T</sup>	Emulsão de óleo branco e polissorbato	África do Sul	160311
<i>Zygoascus tannicola</i>	CBS 6065 <sup>T</sup>	Fluido de bronzeamento	Espanha	KY106018

Espécie	Código	Fonte	Local	16S*
<i>Citrobacter braakii</i>	CDC 8058 <sup>T</sup>	Cobra	França	AF025368
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30039 <sup>T</sup>	Água de um canal	Desconhecido	AJ233408
<i>Citrobacter murliniae</i>	ATCC 51118 <sup>T</sup>	Desconhecida	Estados Unidos	AF025369
<i>Citrobacter werkmanii</i>	CDC 087658 <sup>T</sup>	Humano	Bélgica	AF025373
<i>Erwinia amylovora</i>	DSM 30165 <sup>T**</sup>	Pêra	Reino Unido	AJ233410
<i>Pantoea agglomerans</i>	NCTC9381 <sup>T</sup>	Humano	Zimbabwe	AJ251466
<i>Pantoea anthophila</i>	LMG 2558 <sup>T</sup>	<i>Impatiens balsamina</i>	Índia	EF688010
<i>Pantoea brenneri</i>	LMG 5343 <sup>T</sup>	Humano	Estados Unidos	EU216735
<i>Pantoea conspicua</i>	LMG 24534 <sup>T</sup>	Humano	França	EU216737
<i>Pantoea deleyi</i>	LMG 24200 <sup>T</sup>	Eucalipto	Uganda	EF688011
<i>Pantoea eucalypti</i>	LMG 24197 <sup>T</sup>	Eucalipto	Uruguai	EF688009
<i>Pantoea septica</i>	LMG 5345 <sup>T</sup>	Humano	Estados Unidos	EU216734
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>idolegenes</i>	LMG 2632 <sup>T</sup>	Milho-raposa	Estados Unidos	Y13251
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	LMG 2715 <sup>T</sup>	Milho	Estados Unidos	Z96080
<i>Pantoea vagans</i>	LMG 24199 <sup>T</sup>	Eucalipto	Uganda	EF688012
<i>Tatumella citrea</i>	JCM 8882 <sup>T</sup>	Tangerina	Japão	AB907782
<i>Tatumella citrea</i>	LMG 22049 <sup>T</sup>	Tangerina	Japão	NR_116111
<i>Tatumella morbirosei</i>	LMG 23360 <sup>T</sup>	Abacaxi	Filipinas	EU344769
<i>Tatumella morbirosei</i>	LMG 23359	Abacaxi	Filipinas	FJ617235
<i>Tatumella morbirosei</i>	S1 438	Jatrofa	China	JQ660050
<i>Tatumella ptyseos</i>	LMG 7888 <sup>T</sup>	Humano	Estados Unidos	EU344770
<i>Tatumella ptyseos</i>	ATCC 33301 <sup>T</sup>	Humano	Estados Unidos	NR_025342
<i>Tatumella punctata</i>	CIP 105598 <sup>T</sup>	Tangerina	Japão	JN175342
<i>Tatumella punctata</i>	LMG 22050 <sup>T</sup>	Tangerina	Japão	NR_116110
<i>Tatumella saanichensis</i>	NML 06-3099 <sup>T</sup>	Humano	Canadá	EU215774
<i>Tatumella terrea</i>	DSM 13701 <sup>T</sup>	Solo	Japão	FJ756353
<i>Tatumella terrea</i>	LMG 22051 <sup>T</sup>	Solo	Japão	NR_116110
<i>Tatumella terrea</i>	JCM 8887 <sup>T</sup>	Solo	Japão	NR_115932

\*Número de acesso no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). \*\*Isolado utilizado como outgroup.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE BAGAS DE *V. labrusca*

Um total de 88 isolados foram obtidos (TABELA 3). Destes, 52 sobreviveram ao armazenamento de 425 dias até a condução dos ensaios de antagonismo. Assim, para a caracterização das interações entre os isolados endofíticos e os fitopatógenos, 18 isolados provenientes de bagas com nenhuma aplicação de fungicida, 12 de bagas com duas aplicações e 22 isolados provenientes de bagas com cinco aplicações foram testados quanto ao efeito antagonico.

TABELA 3 – ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE BAGAS DE *V. labrusca* PROVENIENTES DE ÁREAS COM DIFERENTES MANEJOS DE FUNGICIDAS E EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA DURANTE A SAFRA 2019/2020.

0 aplicações de fungicidas			2 aplicações de fungicidas			5 aplicações de fungicidas		
BDA	LB	NA	BDA	LB	NA	BDA	LB	NA
<b>Códigos dos isolados</b>								
PA1B*	PA1L*	<b>PA1N*</b>	AA4B	AA1L	AA1N	VA1B	VA1L*	VA1N
PA2B*	PA2L	PA2N*	AB2B	AA3L*	AA3N	VA2B*	VA2L*	VA2N
PB2B	PA3L*	PA4N	AC1B	AA4L*	AA4N*	AB1B	VA3L*	VA3N*
PB4B	PA4L*	PB2N*	AC2B	AB2L*	AB1N	VB3B*	<b>VA4L*</b>	VA4N*
PC2B	PB2L	PB3N*	AC3B*	AC1L	AB2N*	<b>VB5B*</b>	VB2L*	VB1N*
PC3B	PB3L*	PC2N*	AC4B*	AC2L*	AB3N	VC1B	VB3L	VB2N*
PC4B*	PB4L*	PC3N*	AD1B	AC3L	AC1N	VC2B	VB4L	VB3N*
-	PC2L*	PC4N*	AD3B	AC4L*	AC2N*	VC3B	VC1L*	VB4N*
-	PD4L*	PD1N	-	AD3L*	AC3N*	VD3B	VC2L*	VC1N*
-	-	PD3N*	-	-	AC4N	VD4B	VC4L	VC2N*
-	-	-	-	-	-	-	VD1L*	VC4N*
-	-	-	-	-	-	-	VD3L*	VD1N
-	-	-	-	-	-	-	-	VD3N*
<b>Nº de isolados sobreviventes em Castellani/Meios de cultivo</b>								
3	7	8	2	6	4	3	9	10
<b>Nº de isolados sobreviventes em Castellani /Manejo com fungicida</b>								
18			12			22		

Fonte: A autora (2021). Isolados marcados com \* sobreviveram no armazenamento em Método de Castellani e foram utilizados nos ensaios para caracterização. BDA – Batata dextrose ágar; LB – Lúria Bertani modificado; NA – Nutrient Ágar. Em vermelho estão os isolados selecionados com potencial antagonístico para *Colletotrichum* e *Botrytis* nos dois ensaios.

### 3.2 PROSPECÇÃO DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS ANTAGONISTAS

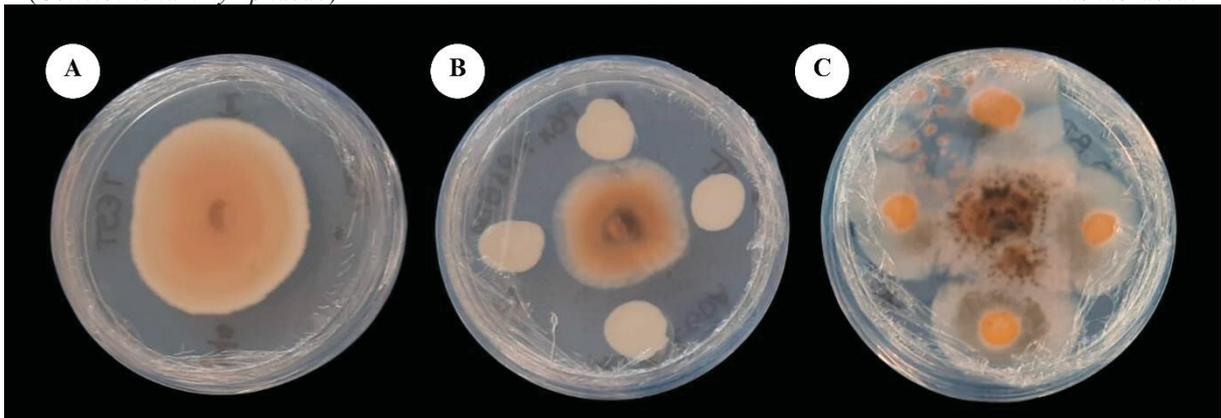
Os endofíticos tiveram respostas variadas para ambos os patógenos testados (*C. nymphaeae* e *B. cinerea*) e não foi observado maior ou menor efeito em relação ao tipo de parcela em relação aos manejos com fungicidas. Dentre os endofíticos obtidos, houve maior número de isolados que desfavoreceram o crescimento micelial dos patógenos do que aqueles que favoreceram, inclusive as médias de crescimento micelial tenderam a ser menores do que a média de crescimento da testemunha (FIGURAS 2 e 3). A Figura 1 ilustra um isolado desfavorável e outro favorável ao crescimento micelial de *Colletotrichum*.

Em relação às interações de *C. nymphaeae* com os isolados endofíticos, no primeiro experimento, 10 isolados foram significativamente ( $\alpha=5\%$ ) desfavoráveis ao crescimento do patógeno, a redução observada foi de 14,9 a 38,5%. No segundo experimento, 13 isolados foram significativamente desfavoráveis ao crescimento micelial do patógeno *in vitro*, com redução de 25,7 a 57,3% (FIGURA 2). No primeiro experimento, os isolados que foram favoráveis ao crescimento micelial do patógeno foram PD4L, VA2B e VB2L. No segundo experimento, os isolados que foram favoráveis foram PD4L, VA2B, PB4L e PD3N.

Nas duas repetições do experimento que confrontou os isolados endofíticos com *B. cinerea*, o isolado VA2B não foi testado, pois não sobreviveu ao armazenamento. Dos 51 isolados endofíticos testados, 28 reduziram significativamente o crescimento micelial de *B. cinerea*, a redução de crescimento observada variou de 16,1% a 67,6%. Neste estudo, não foram constatados isolados endofíticos favoráveis ao crescimento do patógeno (FIGURA 3).

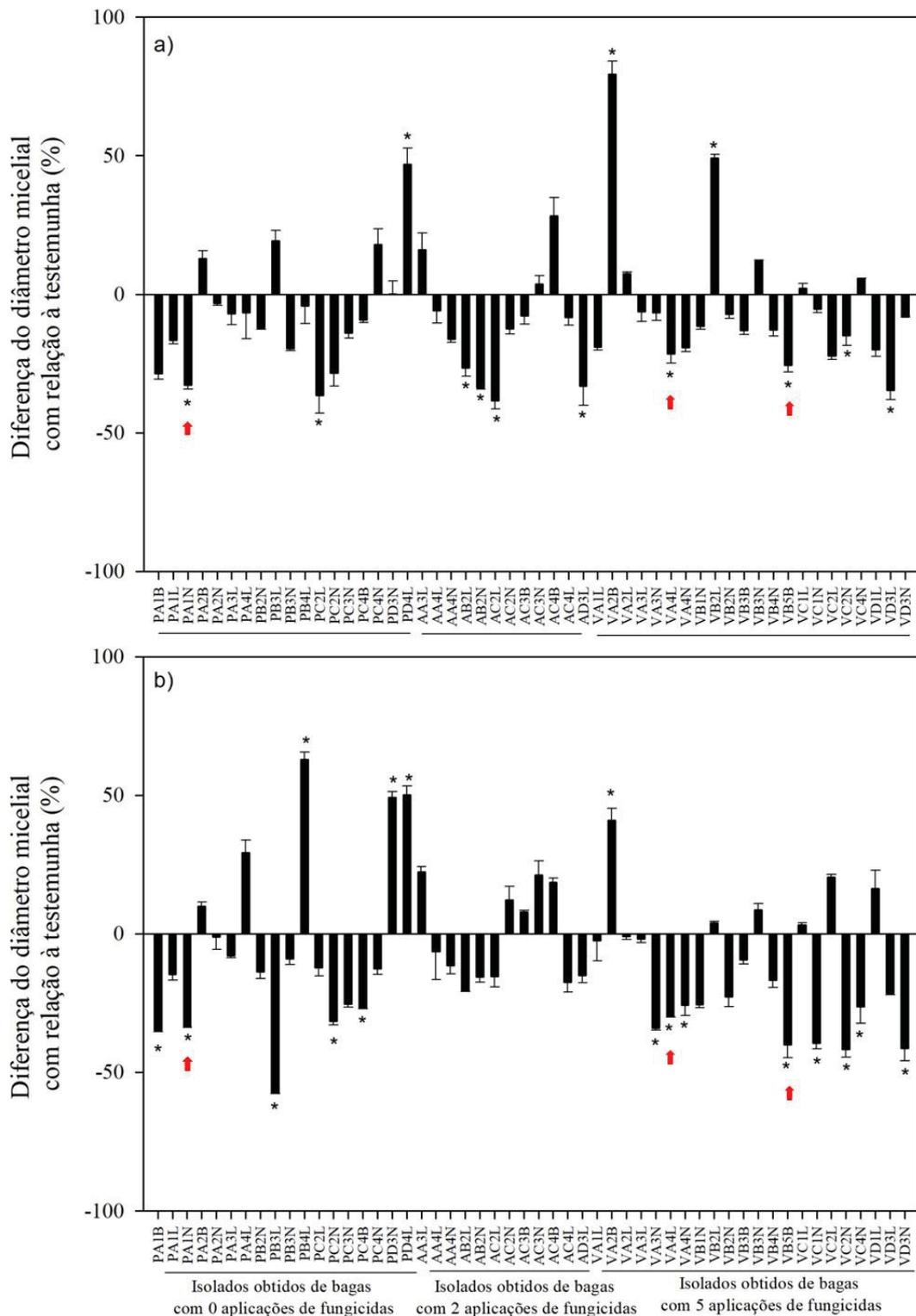
Quatro isolados endofíticos foram desfavoráveis ao crescimento dos patógenos nas duas repetições de cada experimento: PA1N (isolado de baga com nenhuma aplicação de fungicida), VA4L, VB5B e VC2N (isolados de bagas com cinco aplicações de fungicidas). Destes, os três primeiros foram utilizados para a análise filogenética, o critério utilizado para a escolha foi o meio de cultura utilizado, PA1N e VC2N foram isolados em NA, enquanto os demais em LB e BDA.

FIGURA 1 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA CÔLONIA DO ISOLADO VIC<sub>n</sub>PR20-A1R2 (*Colletotrichum nymphaeae*) APÓS PAREAMENTO COM ENDOFÍTICOS DE BAGAS DE *Vitis labrusca*.



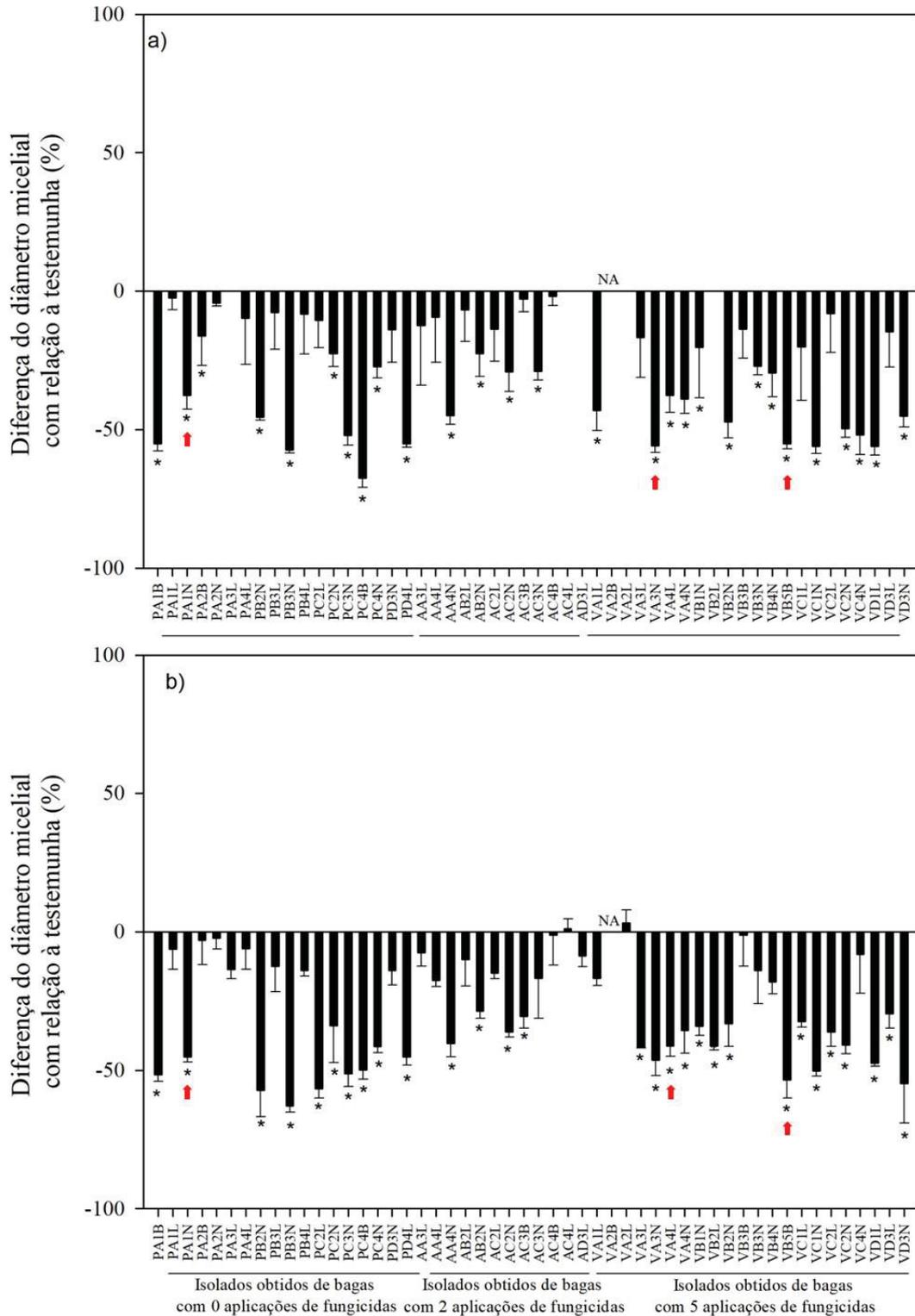
Fonte: A autora (2022). A) Testemunha; B) Interação com isolados endofíticos de bagas de uva desfavoráveis ao crescimento micelial de *C. nymphaeae*; C) Interação com isolados endofíticos de bagas de uva favoráveis ao crescimento micelial de *C. nymphaeae*.

FIGURA 2 – CRESCIMENTO MICELIAL (%) DE *Colletotrichum nymphaeae* EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA PARA ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE BAGAS DE *Vitis labrusca*



Fonte: A autora (2022) Gráfico a) 1º Experimento; b) 2º Experimento. Isolados marcados com \* foram significativamente diferentes da testemunha (Teste de Dunnett,  $\alpha=5\%$ ). As setas em vermelho indicam os isolados selecionados com potencial antagônico para *Colletotrichum* e *Botrytis* nos dois ensaios.

FIGURA 3 – CRESCIMENTO MICELIAL (%) DE *Botrytis cinerea* EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA PARA ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE BAGAS DE *Vitis labrusca*



Fonte: A autora (2022) Gráfico a) 1<sup>o</sup>Experimento; b) 2<sup>o</sup> Experimento. Isolados marcados com \* foram significativamente diferentes da testemunha (Teste de Dunnett,  $\alpha=5\%$ ). As setas em vermelho indicam os isolados selecionados com potencial antagonístico para *Colletotrichum* e *Botrytis* nos dois ensaios.

### 3.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS E PATOGÊNICOS

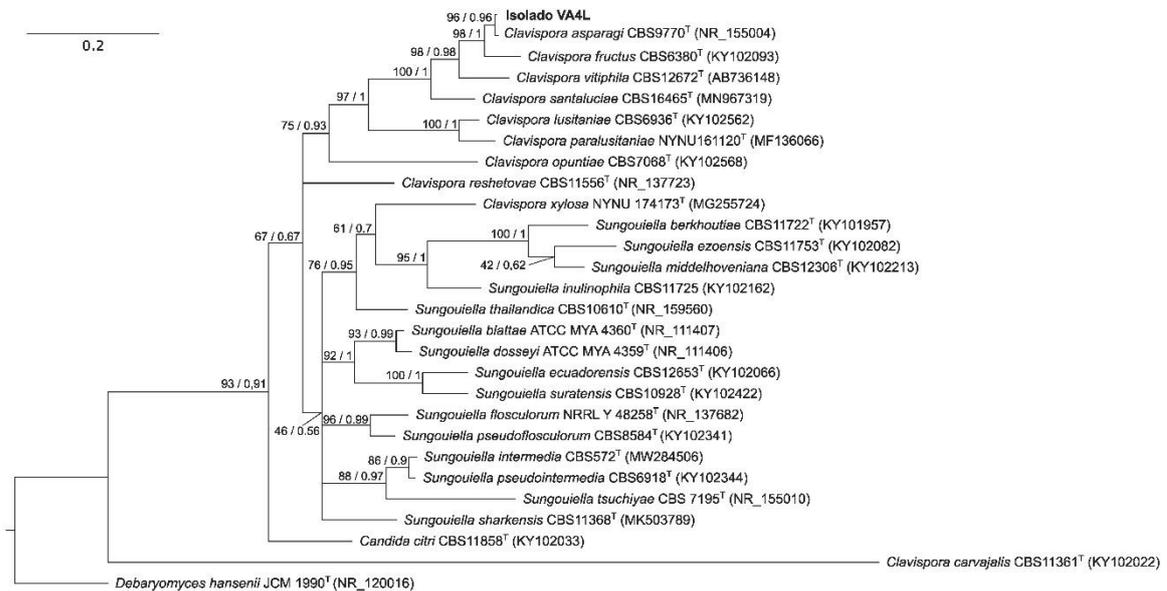
#### 3.3.1 Isolados com potencial antagonico endofíticos de bagas de *V. labrusca*

A amplificação da região ITS-rDNA por PCR dos isolados VA4L e VB5B, provenientes de bagas com cinco aplicações de fungicidas, resultou em amplicons com aproximadamente 560 pb, indicando que os isolados são fungos. Para o isolado PA1N, proveniente de bagas que não receberam aplicação de fungicidas, a amplificação do gene 16S-rDNA por PCR resultou em amplicons de aproximadamente 1500 pb, indicando que o isolado é bactéria.

Quando as sequências dos isolados endofíticos obtidas foram comparadas com as que estão disponíveis no GenBank, os isolados VA4L, VB5B e PA1N apresentaram identidade com os gêneros *Clavispora*, *Zygoascus* e *Tatumella*, respectivamente. Considerando a região ITS-rDNA, o isolado VA4L apresentou 99,5% de identidade com a espécie-tipo *C. asparagi* CBS 9770 (GenBank: NR\_155004). O isolado VB5B apresentou 100,0 % de identidade com as espécies *Z. meyeriae* CBS 4075 (GenBank: KY106012) e *Z. hellenicus* CBS 8647 (GenBank: KY106010). Em relação ao gene 16S-rDNA, o isolado PA1N apresentou 99,0% de identidade com a espécie-tipo *T. morbirosei* LMG 23360 (GenBank: EU344769).

A árvore filogenética da região ITS de leveduras do gênero *Clavispora* (FIGURA 4), incluindo a sequências do isolado VA4L, das espécies-tipo aceitas no gênero e de espécies próximas, além do outgroup *Debaryomyces hansenii* CBS 767 (GenBank: NR\_120016) (Liu *et al.*, 2024), apresentou agrupamento de VA4L com a espécie *C. asparagi* pelos dois métodos testados de ML e BI, formando um grupo monofilético com suporte de 96% de bootstrap ultrarrápido e 0,96 de probabilidade posteriori, respectivamente.

FIGURA 4 - ÁRVORE FILOGENÉTICA POR INFERÊNCIA BAYESIANA (BI) DA REGIÃO ITS-rDNA DO ISOLADO VA4L (EM NEGRITO), COM TODAS AS ESPÉCIES ACEITAS DO GÊNERO *Clavispora*, INCLUINDO O OUTGROUP.

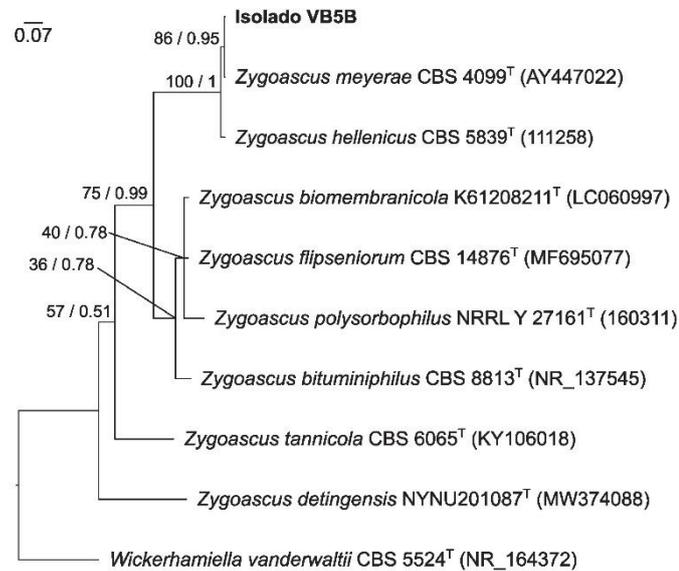


Fonte: A autora (2024). A espécie *Debaryomyces hansenii* foi utilizada como outgroup. As estirpes marcadas com "T" indicam espécies-tipo. A barra de escala representa o número de substituições nucleotídicas por sítio. Os valores de suporte para bootstrap ultrarrápido (Máxima verossimilhança) e probabilidade *a posteriori* (Inferência Bayesiana) estão indicados à esquerda dos nós, nessa sequência.

Quanto à árvore filogenética da região ITS de leveduras do gênero *Zygoascus* (FIGURA 5), na qual foi incluída a sequência do isolado VB5B, com as espécies-tipo aceitas no gênero e o outgroup *Wickerhamiella vanderwaltii* CBS 5524 (GenBank: NR\_164372) (Chai *et al.*, 2022; Groenewald *et al.*, 2018), o isolado VB5B apresentou agrupamento monofilético com *Z. meyeræ* pelos dois métodos testados, com suporte de 86% de bootstrap ultrarrápido e 0,95 de probabilidade posteriori.

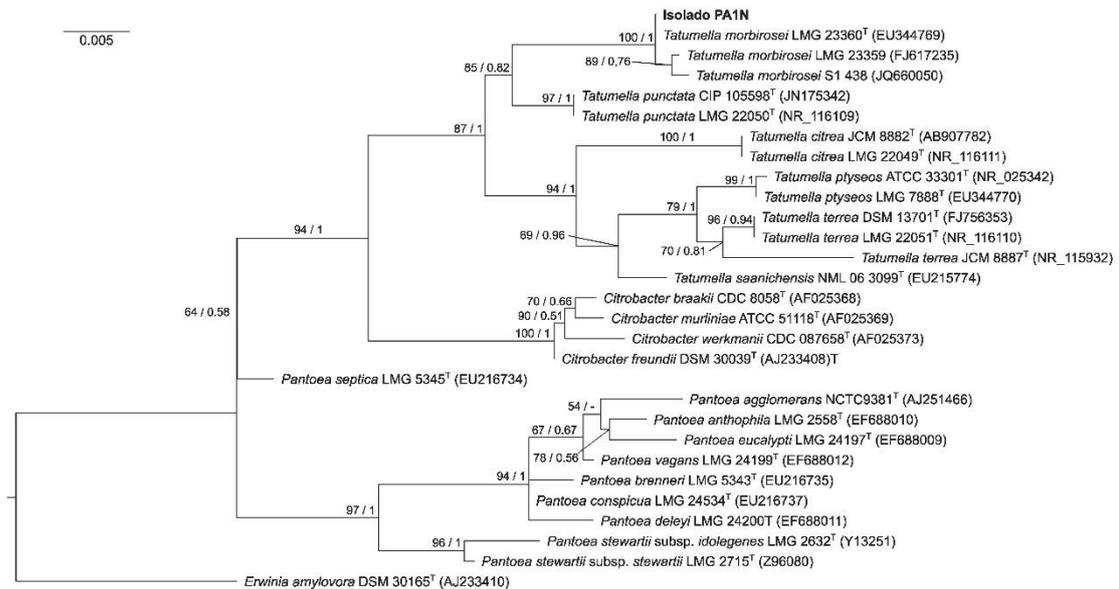
Finalmente, a árvore filogenética da região 16S de bactérias do gênero *Tatumella* (FIGURA 6), na qual foi incluída a sequência do isolado PA1N, com as espécies-tipo aceitas no gênero e sequências de outros gêneros próximos e o outgroup *Erwinia amylovora* DSM 30165 (GenBank: AJ233410) (Brady *et al.*, 2010), apresentou agrupamento monofilético de PA1N com *T. morbirosei* pelos dois métodos testados, com suporte de 100% de bootstrap ultrarrápido e 1 de probabilidade posteriori.

FIGURA 5 - ÁRVORE FILOGENÉTICA POR INFERÊNCIA BAYESIANA (BI) DA REGIÃO ITS-rDNA DO ISOLADO VB5B (EM NEGRITO), COM TODAS AS ESPÉCIES ACEITAS DO GÊNERO *Zygoascus*, INCLUINDO O OUTGROUP.



Fonte: A autora (2024). A espécie *Wickerhamiella vanderwaltii* foi utilizada como outgroup. As estirpes marcadas com "T" indicam espécies-tipo. A barra de escala representa o número de substituições nucleotídicas por sítio. Os valores de suporte para bootstrap ultrarrápido (Máxima verossimilhança) e probabilidade *a posteriori* (Inferência Bayesiana) estão indicados à esquerda dos nós, nessa sequência.

FIGURA 6 - ÁRVORE FILOGENÉTICA POR INFERÊNCIA BAYESIANA (BI) DO GENE 16S-rDNA DO ISOLADO PA1N (EM NEGRITO), COM TODAS AS ESPÉCIES ACEITAS DO GÊNERO *Tatumella*, INCLUINDO O OUTGROUP.



Fonte: A autora (2024). A espécie *Erwinia amylovora* foi utilizada como outgroup. As estirpes marcadas com "T" indicam espécies-tipo. A barra de escala representa o número de substituições nucleotídicas por sítio. Os valores de suporte para bootstrap ultrarrápido (Máxima verossimilhança) e probabilidade *a posteriori* (Inferência Bayesiana) estão indicados à esquerda dos nós, nessa sequência.

### 3.3.2 Identificação dos isolados patogênicos

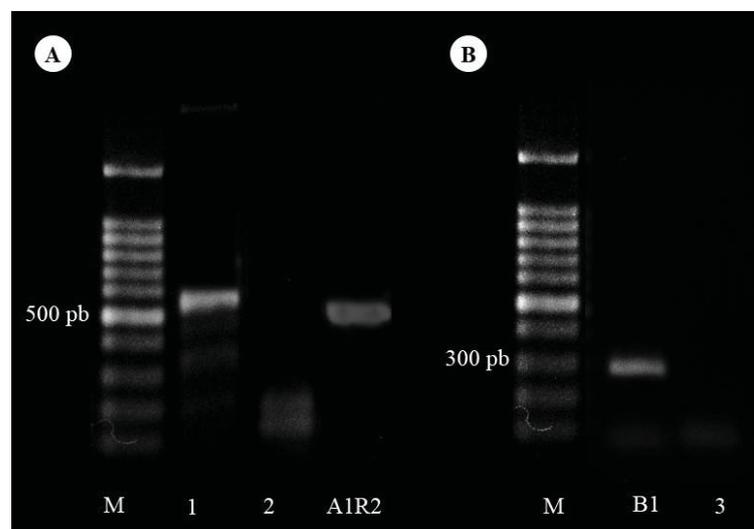
Na caracterização molecular do isolado VICnPR20-A1R2 por PCR, utilizando os primers Caint2 e ITS4 para identificação do complexo *C. acutatum*, foi possível amplificar um fragmento de aproximadamente 490 pb, indicando, portanto, que o isolado pertence a esse complexo (FIGURA 7).

A amplificação da região do ITS-rDNA e dos genes parciais *GAPDH*, *TUB2* do isolado VICnPR20-A1R2 resultou em amplicons com aproximadamente 615 pb, 308 pb e 716 pb, respectivamente. A análise das sequências de todas as regiões amplificadas apresentou identidade acima de 99% somente com espécies do complexo *C. acutatum*.

Na análise filogenética, foram selecionadas 41 espécies aceitas do complexo *C. acutatum* para construção do alinhamento multigênico com o ITS, *TUB2* e *GAPDH*, além do isolado VICnPR20-A1R2 e do outgroup *C. pseudoacutatum* CBS 43677 (GenBank: NR\_111756, JQ950131 e JQ948811). A árvore filogenética (FIGURA 8) apresentou agrupamento de VICnPR20-A1R2 somente com a espécie *C. nymphaeae* formando um grupo monofilético pelos dois métodos testados, com suporte de 100% de bootstrap ultrarrápido e 1 de probabilidade posteriori.

Para o isolado VvBcSP21-B1 houve amplificação de um fragmento com 238 pb, correspondente à *Botrytis cinerea* (FIGURA 7).

FIGURA 7 – GEL DE AGAROSE 1% DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR UTILIZANDO OS OLIGONUCLEOTÍDEOS CaInt2 E ITS4 (A); MULTIPLEX DE G3PDH-F1 E G3PDH-F2 EM CONJUNTO COM O G3PD-R (B), OBSERVADOS EM GEL DE AGAROSE 1,0%.



Fonte: A autora (2022). Amostras 1, controle positivo (*C. acutatum*) e 2 controle negativo (*C. gloesporioides*), AIR2 - isolado VICnPR20-A1R2, B1 - isolado (VvBcSP21-B1), amostra 3 – branco; M - marcador molecular 100 pb (Sinapse).

FIGURA 8 - ÁRVORE FILOGENÉTICA POR INFERÊNCIA BAYESIANA (BI) DA REGIÃO ITS-rDNA E DOS GENES PARCIAIS *GAPDH* E *TUB2* (615 pb, 308 pb e 716 pb, RESPECTIVAMENTE), DO ISOLADO VICnPR20-A1R2 (EM NEGRITO), COM ESPÉCIES ACEITAS DO COMPLEXO *Colletotrichum acutatum*, INCLUINDO O OUTGROUP.



Fonte: A autora (2024). A espécie *Colletotrichum pseudoacutatum* foi utilizada como outgroup. As estirpes marcadas com "T" indicam espécies-tipo. A barra de escala representa o número de substituições nucleotídicas por sítio. Os valores de suporte para bootstrap ultrarrápido (Máxima verossimilhança) e probabilidade *a posteriori* (Inferência Bayesiana) estão indicados à esquerda dos nós, nessa sequência.

#### 4 DISCUSSÃO

Os isolados endofíticos obtidos de bagas de uva de *V. labrusca*, independentemente da aplicação de fungicidas nas parcelas de origem, demonstraram, em sua maioria, ação inibitória sobre o crescimento micelial de *C. nymphaeae* e *B. cinerea*. Dentre os isolados que exibiram efeito inibitório consistente nas duas repetições experimentais, sobre ambos os patógenos, foram identificadas as espécies *Clavispora asparagi* (VA4L), *Zygoascus meyeriae* (VB5B) e *Tatumella morbirosei* (PA1N). Nenhuma dessas três espécies possui produtos registrados para controle de doenças de plantas, o que evidencia seu potencial inexplorado. O efeito inibitório

sobre os gêneros *Colletotrichum* e *Botrytis*, reconhecidos como patógenos importantes para diversas culturas agrícolas (Dean *et al.*, 2012), reforça a relevância desses microrganismos endofíticos no desenvolvimento de novas estratégias de biocontrole, com aplicabilidade potencial além das doenças da cultura da videira.

Além do local de obtenção e condições climáticas da safra, a ação inibitória dos isolados endofíticos no crescimento dos patógenos pode estar relacionada com a cv. 'Bordô' (*V. labrusca*), selecionada para obtenção dos mesmos. Esta cultivar é considerada mais resistente às podridões de cacho em comparação a outras cultivares de *V. labrusca* e *V. vinifera* (Nachtigal; Schneider, 2007). Utilizar esses endofíticos com potencial de redução do crescimento dos patógenos, obtidos de *V. labrusca*, para colonizar os tecidos de cultivares de uva suscetíveis a podridões de cacho, desde a floração, momento em que ocorrem as infecções primárias (Steel *et al.*, 2012; Keller *et al.*, 2003), desponta como uma estratégia promissora no manejo dessas doenças.

Um número maior de isolados endofíticos teve potencial antagônico a *B. cinerea* em comparação a *C. nymphaeae*. Fato interessante é que no pomar em que os isolados endofíticos foram coletados, a presença de podridão cinzenta não foi observada, enquanto que, embora raros, foram constatados sintomas de podridão da uva madura. Isso sugere que os endofíticos podem ter um papel ativo na supressão de *B. cinerea in situ*, reforçando a relevância de se estudar suas interações no ecossistema da videira e suas possíveis aplicações nos sistemas de cultivo.

Os endofíticos obtidos apresentaram alta variabilidade de cores, texturas, bordas e odores. Estas diferenças podem estar relacionadas com uma alta diversidade de microrganismos nas bagas, a qual deve ser confirmada pela identificação de gêneros/espécies. A análise metagenômica do interior das bagas, que permite estudar o ecossistema microbiano numa mesma amostra simultaneamente, incluindo bactérias, vírus e fungos, sem a necessidade de cultivo é importante para verificar as interações presentes na agricultura (John *et al.*, 2024) e recomendada para essa identificação. Além das bagas de uva, alguns estudos já relataram diversidade de microrganismos endofíticos na rizosfera e tronco da videira (Brum, 2006; Giron *et al.*, 2011; Comachio *et al.*, 2017).

No pareamento dos endofíticos com *C. nymphaeae*, houve variação nos resultados entre as duas repetições experimentais. Apesar da padronização das condições de cultivo, o intervalo de tempo entre os ensaios pode ter interferido no potencial antagônico dos endofíticos de bagas de uva. Idealmente, o microrganismo selecionado para controle biológico deve manter

sua eficiência em diferentes condições edafoclimáticas. Afinal, falta de eficácia e o desempenho inconsistente de produtos biológicos em campo têm sido relatados (Bonaterra *et al.*, 2022).

Alguns endofíticos favoreceram o crescimento de *C. nymphaeae* indicando que a presença desses isolados pode eventualmente estimular o patógeno. O isolado PD4L favoreceu o crescimento micelial de *C. nymphaeae*, mas teve efeito inibitório no crescimento de *B. cinerea*. Uma hipótese é que os compostos tóxicos produzidos por esse isolado, na concentração em que *C. nymphaeae* foi exposto, possa ter causado o efeito conhecido como hormese, que é uma supercompensação, em decorrência a uma situação de estresse, e leva a curvas de resposta bifásicas, caracterizadas por estimulação de baixa dose e inibição de alta dose (Stebbing, 1982). Entretanto, para confirmar essa hipótese, diferentes concentrações do isolado devem ser testadas em pareamento com *Colletotrichum*.

Quanto à identificação dos três isolados selecionados no presente estudo sabe-se que a identidade de bases na região ITS-rDNA deve ser igual ou superior a 99% (Inderbitzin *et al.*, 2020), critério atendido neste estudo tanto para o isolado VA4L quanto para o VB5B. Além disso, os autores sugerem que análises filogenéticas apresentem valores de bootstrap iguais ou superiores a 70% e probabilidade a posteriori de, no mínimo, 0,95. Os resultados deste estudo seguiram esses parâmetros, indicando que VA4L pertence à espécie *C. asparagi* e VB5B a *Z. meyeriae*. Além da região ITS-rDNA, recomenda-se a incorporação do domínio D1/D2 do DNA ribossômico da subunidade maior (LSU), que é amplamente utilizado na identificação de leveduras (Limtong *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2019).

A árvore filogenética gerada para VA4L apresentou semelhança com a de Liu *et al.* (2024). Embora seja ideal incluir todas as espécies aceitas no gênero, a sequência da região ITS-rDNA de *C. phyllophila* não foi encontrada. Contudo, na árvore de referência, essa espécie estava mais distante de *C. asparagi* em comparação com as demais analisadas, reforçando a confiabilidade do resultado obtido, mesmo sem sua inclusão. Quanto a análise filogenética de VB5B, houve semelhança à relatada por Groenewald *et al.* (2018). A sequência ITS-rDNA da espécie aceita no gênero *Z. ofunaensis* não foi encontrada nos bancos de dados pesquisados. Essa espécie também não foi incluída nos estudos de Groenewald *et al.* (2018).

Para a delimitação de espécies de bactérias, a identidade de 16S-rDNA deve ser maior ou igual a 98,7%. Além disso, após a análise filogenética, os valores de suporte dos ramos devem ser os mesmos recomendados para identificação de fungos (bootstrap  $\geq 70\%$  e probabilidade a posteriori  $\geq 0,95$ ) (Inderbitzin *et al.*, 2020). O isolado PA1N apresentou identidade acima do limite estabelecido com a espécie *T. morbii* (99,0%). O gênero *Tatumella* possui seis espécies aceitas (LPSN, 2024). A árvore gerada neste trabalho, da região

16S-rDNA discriminou a espécie *T. morbirosei* mesmo após a inclusão de sequências de outros isolados da mesma espécie, adotando conformação semelhante à árvore obtida por Brady *et al.* (2010), além de apresentar altos suportes (100% e 1). O estudo de Brady *et al.* (2010) transferiu algumas espécies do gênero *Pantoea* para o gênero *Tatumella* e reclassificou cepas da espécie *Pantoea citrea* para *T. morbirosei*, baseado na análise filogenética multigênica incluindo 16S rRNA, *atpD* (subunidade  $\beta$  da ATP sintase), *GyrB* (DNA girasse), *rpoB* (subunidade  $\beta$  da RNA polimerase) e *infB* (fator de tradução de iniciação 2). Por isso, espécies do gênero *Pantoea* foram adicionados na análise filogenética do presente trabalho.

O gênero *Clavispora*, ao qual o isolado VA4L foi classificado, já foi associado a diferentes plantas. Por exemplo, *C. lusitaniae* apresentou potencial de biocontrole contra *Penicillium digitatum* na pós-colheita de limão, mesmo sob condições de estresse (Pereyra *et al.*, 2020). *C. phyllophila* e *C. vitiphila* foram obtidas no filoplano de videira na Tailândia (Limtong; Kaewwichian, 2013). A levedura *C. santaluciae*, encontrada em videiras nos Açores, Portugal, apresentou características promissoras, como a incapacidade de crescer a temperaturas superiores a 35°C e a capacidade de converter amido em açúcares fermentáveis. Este isolado também pode evitar a produção indesejável de ácido acético, contribuindo para a obtenção de vinhos de qualidade superior (Drumonde-Neves *et al.*, 2020).

O isolado VB5B foi classificado como *Z. meyeræ*. Esta espécie é associada a uvas em diversos estudos. Na China, uma diversidade de leveduras foi encontrada em *V. davidii* Föex, incluindo *Z. meyeræ* (Wang *et al.*, 2019). No Paraná, *Z. meyeræ* associada à *V. labrusca* produziu a enzima  $\beta$ -glicosidase, que pode ser precursora do resveratrol (Gaensly *et al.*, 2015). O resveratrol é uma fitoalexina presente em *V. labrusca* e *V. vinifera* e híbridos, exibindo propriedades antioxidantes e potenciais benefícios medicinais (Guder *et al.*, 2014). Além desse benefício, *Z. meyeræ* foi relatada recentemente com potencial de biocontrole de *B. cinerea* em videira (Esteves *et al.*, 2023).

Os gêneros de levedura encontrados no presente estudo foram citados como potenciais auxiliares nos processos fermentativos necessários para vinificação (Drumonde-Neves *et al.*, 2020; Gaensly *et al.*, 2015). A microbiota local associada a outros fatores, como o clima, solo e o manejo, influencia na identidade do vinho produzido em uma região (Franco *et al.* 2024). Estudos futuros podem avaliar como as leveduras *C. asparagi* (VA4L) e *Z. meyeræ* (VB5B) aplicadas com determinada frequência nas videiras ao longo do ciclo de cultivo podem afetar a qualidade do vinho após o processamento. Assim, além do potencial biocontrole das podridões de cacho de uva, pode ser que essas leveduras realcem qualidades interessantes nos produtos, como o vinho e o suco.

O isolado PA1N foi classificado como bactéria pertencente à espécie *T. morbirosei*. Estudo conduzido para avaliar a microbiota de uvas sadias e doentes com presença de *B. cinerea*, mostrou que *Tatumella* foi um dos gêneros presentes em frutos sem sintomas aparentes, mas com a presença de *B. cinerea*. O estudo relatou ainda que, a maior parte da microbiota identificada estava associada a microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, a qual pertence o gênero (Nisiotou *et al.*, 2011). O gênero *Tatumella* já foi relatado como o mais expressivo após análise da microbiota bacteriana de vinhos tintos e brancos, o que sugere uma possível associação com a presença dessas bactérias nos vinhedos (Bubeck *et al.*, 2020). A espécie *T. morbirosei* foi relatada como um dos agentes causais da doença rosa em abacaxi, que afeta a qualidade dos produtos após o processamento, embora não apresente sintomas visíveis no campo (Marín-Cevada *et al.*, 2010). Impactos negativos desta bactéria para a cultura da videira não foram encontrados.

Em manejo convencional, a aplicação de bactérias antagonistas na parte aérea é mais interessante do que a aplicação de fungos devido à possibilidade do uso conjunto com a maioria dos fungicidas (Schroth *et al.*, 1991). Então, verificar se fungicidas podem afetar o crescimento das leveduras encontradas neste trabalho é importante. Aplicar as leveduras na florada para que permaneçam nos frutos como endofíticas, visto que foram isoladas de bagas que receberam cinco aplicações de fungicidas, e mesmo assim sobreviveram, pode ser uma boa estratégia para integrar nos métodos de controle.

Os microrganismos antagonistas podem atuar de diferentes maneiras como antibiose, competição e parasitismo, além da indução da resistência sistêmica na planta (Medeiros *et al.*, 2018). Esses diferentes mecanismos podem atuar em sinergia durante a interação antagônica (Punja; Utkhede, 2003). O conhecimento da natureza de cada mecanismo é determinante para auxiliar o controle biológico de doenças (Blakeman; Fokkema, 1982). Então, são recomendados estudos com os isolados VA4L, VB5B e PA1N para verificar sua influência sobre as estruturas infectivas dos patógenos e também sobre o controle das podridões em bagas de uva.

Este estudo demonstrou o potencial da microbiota presente nas bagas de uva da cv. 'Bordô' para o controle de *C. nymphaeae* e *B. cinerea*, reforçando a necessidade do estudo da biodiversidade nos mais diversos nichos ecológicos o que pode garantir maior sustentabilidade da agricultura ao longo do tempo.

## 5 REFERÊNCIAS

- AHMED, I.; HAROON, A.; KHAN, M. N.; ASADULLAH SHAH, H.; NADEEM, A.; SAEED, F.; ULLAH SHAH, S. R.; ABBASI, M. A.; BUZDAR, M. A. Ocorrência e biodiversidade de levedura marinha no ecossistema de manguezal de Shabi Creek, Gwadar-Paquistão. **Pure and Applied Biology**, v. 8, p. 680–687, 2019.
- ALABID, I.; GLAESER, S. P.; KOGEL, K. H. Bactérias endofúngicas aumentam a aptidão de seus fungos hospedeiros e impactam sua associação com plantas cultivadas. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 30, p. 59-74, 2019. DOI: <<https://doi.org/10.21775/CIMB.030.059>>.
- AMIRI, A.; HEATH, S. M.; PERES, N. A. Resistance to fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from strawberry. **Plant Disease**, v. 98, p. 532-539, 2014.
- APPY, M. P. Avaliação de produtos químicos e biológicos no controle da sarna da batata causada por *Streptomyces* spp. 2018. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Biológico, São Paulo. 113 p.
- AYDIN, M.; KUSTIMUR, S.; KALKANCI, A.; DURAN, T. Identification of medically important yeasts by sequence analysis of the internal transcribed spacer and D1/D2 region of the large ribosomal subunit. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 36, n. 3, p. 129-138, 2019. DOI: <10.1016/J.RIAM.2019.05.002>.
- AYTAÇ, G.; KORKMAZ, H.; GÖKCE, H.; BINGÖL, Y.; ALPASLAN, A.; ALPASLAN, G. Isolation, characterization, spectroscopic properties and quantum chemical computations of an important phytoalexin resveratrol as antioxidant component from *Vitis labrusca* L. and their chemical compositions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. DOI: <10.1016/J.SAA.2014.05.056>. 2014.
- BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: Freeman, 1974. 433 p.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 337 p.
- BLAKEMAN, J. P.; FOKKEMA, N. J. Comparative efficacy of *Trichoderma* spp. for the control of powdery mildew of cluster bean. **Annual Review of Phytopathology**, v. 20, p. 167-192, 1982.
- BONATERRA, A.; BADOSA, E.; DARANAS, N.; FRANCÉS, J.; ROSELLÓ, G.; MONTESINOS, E. Bactérias como agentes de controle biológico de doenças de plantas. **Microorganismos**, v. 10, n. 9, 2022. DOI: 10.3390/microorganismos10091759.
- BRUISSON, S.; ZUFFEREY, M.; L'HARIDON, F.; TRUTMANN, E.; ANAND, A.; DUTARTRE, A.; WEISSKOPF, L. Endophytes and Epiphytes From the Grapevine Leaf Microbiome as Potential Biocontrol Agents Against Phytopathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

BRUM, M. C. P. Microrganismos endofíticos da videira niagara rosada (*Vitis labrusca* L.) e o controle biológico de *Fusarium*. 2006. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Mogi das Cruzes, 79 f.

BURANDT, Quentin C.; DEISING, Holger B.; VON TIEDEMANN, Andreas. Further limitations of synthetic fungicide use and expansion of organic agriculture in Europe will increase the environmental and health risks of chemical crop protection caused by copper-containing fungicides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 19-30, 2024.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.

CHAI, C.-Y. *et al.* Four new species of *Trichomonascaceae* (Saccharomycetales, Saccharomycetes) from Central China. **MycoKeys**, v. 90, p. 1–18, 2022. DOI: <10.3897/mycokeys.90.83829>.

COMACHIO, L.; PACINI, B.; TONELLO, J.; ALMANÇA, M. Antagonismo in vitro de bactérias endofíticas contra fungos associados a doenças de tronco de videira. Mostra Técnico-Científica, IFRS - Campus Bento Gonçalves, Brasil, ago. 2017.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, n. 1, p. 37-113, 2012.

DE BARY, Anton. **Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten**. Engelmann, 1866.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

DRUMONDE-NEVES, João; ČADEŽ, Neža; REYES-DOMINGUEZ, Yazmid; GALLMETZER, Andreas; SCHULLER, Dorit Elisabeth; LIMA, Teresa; PAIS, Célia; FRANCO DUARTE, Ricardo. *Clavispora santaluciae* f.a., sp. nov., a novel ascomycetous yeast species isolated from grapes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 70, n. 12, p. 6307-6312, 2020. DOI: <10.1099/IJSEM.0.004531>.

ECHEVERRIGARAY, S. et al. *Colletotrichum* species causing grape ripe rot disease in *Vitis labrusca* and *V. vinifera* varieties in the highlands of southern Brazil. **Plant Pathology**, n. June, p. 1504–1512, 2020.

ESTEVES, Marcos; LAGE, Patrícia; SOUSA, João; CENTENO, Filipe; TEIXEIRA, Maria de Fátima; TENREIRO, Rogério; MENDES-FERREIRA, Ana. Potencial de biocontrole de leveduras de vinho contra quatro fungos fitopatogênicos da uva revelado pelo monitoramento ao longo do tempo das atividades inibitórias. **Fronteiras em Microbiologia**, março de 2023. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1146065.

FREEMAN, S.; MINZ, D.; JURKEVITCH, E.; MAYMON, M.; SHABI, E. Molecular Analyses of *Colletotrichum* Species from Almond and Other Fruits. *Phytopathology*, v.90, n.6, p.608-614, 2000.

- GAENSLY, F., AGUSTINI, B. C., DA SILVA, G. A., PICHETH, G., & BONFIM, T. M. B. Autochthonous yeasts with  $\beta$ -glucosidase activity increase resveratrol concentration during the alcoholic fermentation of *Vitis labrusca* grape must. **Journal of Functional Foods**, 19, 288–295. 2015. doi:10.1016/j.jff.2015.09.041
- GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, n. 2, p. 113-118, 1993.
- GARFINKEL, A. R.; LORENZINI, M.; ZAPPAROLI, G.; CHASTAGNER, G. A. *Botrytis euroamericana*, uma nova espécie de peônia e uva na América do Norte e Europa. **Mycologia**, v. 109, n. 3, p. 495-507, 2017.
- GARRIDO, L. da R.; BOTTON, M. Recomendações técnicas para o manejo das pragas e doenças fúngicas da videira na região sul do Brasil. Bento Gonçalves: **Embrapa Uva e Vinho**. 2015. 28 p. (Circular Técnica 117).
- GIRON, H. Prospecção e seleção de microrganismos antagônicos na rizosfera de videira, com potencial para o controle biológico de doenças de videira. **XIX Encontro de Jovens Pesquisadores**, novembro de 2011. Universidade de Caxias do Sul.
- GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.
- GREER, L. A.; HARPER, J. D. I.; STEEL, C. C. Infection of *Vitis vinifera* (cv Chardonnay) Inflorescences by *Colletotrichum acutatum* and *Greeneria uvicola*. **Journal of Phytopathology**. v. 80, n. Dar 76901, p. 407–410, 2013. DOI:<10.1111/jph.12201>.
- HAMANN, F. A. Aspectos do controle biológico de *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. em videira. 2011. **Dissertação** (Mestrado) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.
- HAMAOKA, K.; AOKI, Y.; SUZUKI, S. Isolamento e caracterização do endófito *Bacillus velezensis* KOF112 do xilema do broto de videira como agente de controle biológico de doenças fúngicas. **Plantas**, v. 10, n. 9, p. 1815, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10091815>.
- HARPER, L. A.; DERBYSHIRE, M. C.; LOPEZ-RUIZ, F. J. Identificação e caracterização de *Botrytis medusae*, uma nova espécie críptica que causa mofo cinzento em uvas para vinho na Austrália. **Plant Pathology**, v. 68, p. 939-953, 2019.
- HEPPERLE, D. **SeqAssem**. A sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version. 2004. Disponível em: <http://science.do-mix.de>.
- INDERBITZIN, P.; ROBBERTSE, B.; SCHOCH, C. L. Species Identification in Plant-Associated Prokaryotes and Fungi Using DNA. **Phytobiomes Journal**, American Phytopathological Society, 23 mar. 2020.

JOHN, Z.; YU, Xiaolong; GUO, C.; LI, [nome completo]. Metagenomics: Advances in Environmental Microbiology, Human Health, and Agriculture. **International Journal of Biology and Life Sciences**, v. 6, n. 2, p. 24-26, 2024. DOI: <10.54097/j4nznvx66>.

KALYAANAMOORTHY, S. et al. **ModelFinder**: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, v. 14, p. 587–589, 2017. DOI: <10.1038/nmeth.4285>.

KATOH, K. et al. **MAFFT online service**: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, v. 20, p. 1160-1166, 2019.

KELLER, M.; VIRET, O.; COLE, F. M. Infecção por *Botrytis cinerea* em flores de videira: reação de defesa, latência e expressão da doença. **Fitopatologia**, v. 93, p. 316-322, 2003.

KELLER, M. **The science of grapevines: anatomy and physiology**. London: Elsevier, 2010. 377 p.

KUMAR, S. et al. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870-1874, 2016. DOI: <10.1093/molbev/msw054>.

KEIICHIRO, WATANABE. Biocontrol Potential of Fungi for Pest and Pathogen Management. *Fungal biology*, 557-575, 2021. DOI: 10.1007/978-981-16-8877-5\_27

LANE, D. J. Sequenciamento de rRNA 16S/23S. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). Técnicas de ácido nucleico em sistemática bacteriana. Nova York: **John Wiley & Sons**, 1991. p. 115-175.

LI, X.; FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; CHAI, W.; WANG, F.; SCHNABEL, G. Identification and prevalence of *Botrytis* spp. from blackberry and strawberry fields of the Carolinas. **Plant Disease**, v. 96, p. 1634-1637, 2012.

LIMTONG, S. et al. *Kazachstania siamensis* sp. nov., an ascomycetous yeast species from forest soil in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 419–422, 2007.

LIMTONG, Savitree; KAEWWICHIAN, Rungluk. *Candida phyllophila* sp. nov. and *Candida vitiphila* sp. nov., two novel yeast species from grape phylloplane in Thailand. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 59, p. 191-197, 2013.

LISTA DE NOMES DE PROCARIOTOS COM STATUS NA NOMENCLATURA. **LPSN**: List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.net/>.

LIU, K. et al. Isolation, identification, and pathogenicity of *Pseudomonas glycinae* causing ginseng bacterial soft rot in China. **Microbial Pathogenesis**, v. 2024. DOI: <10.1016/j.micpath.2023.106497>.

LUO Y, MICHAELIDES TJ. Factors affecting latent infection of prune fruit by *Monilinia fructicola*. **Phytopathology** 91: 864-872. 2001. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.9.864>

MARÍN-CEVADA, V. et al. Tatumella ptyseos, an Unrevealed Causative Agent of Pink Disease in Pineapple. *Journal of Phytopathology*, v. 158, n. 2, p. 93–99, 2010.

MEDEIROS, Flavio H. V.; SILVA, Julio Carlos Pereira; PASCHOLATI, Sérgio Florentino. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIN, Lillian; RESENDE, Jorge A. M.; BERGAMIN FILHO, Armando (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. São Paulo: Ceres, 2018. v. 1, cap. 17, p. 261-274.

MENEGUZZO, J. et al. Efeito de *Botrytis cinerea* na composição do vinho Gewürztraminer. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, Campinas, 2006.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Agrofit**: sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>.

NACHTIGAL, J. C.; SCHNEIDER, E. P. Recomendações para produção de videiras em sistemas de base ecológica. **Documentos 65**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007. 68 p.

NISIOTOU, A. A. *et al.* Espécies bacterianas associadas a uvas sadias e infectadas com *Botrytis* de um vinhedo grego. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 2-3, p. 432–436, 2011.

NOGUEIRA, E. M. C. Doenças fúngicas da videira: sintomas e manejo. Instituto Biológico. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. **Documento Técnico**, n. 32. São Paulo, 2017. p. 1-21.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 103-116, 1997.

PEREIRA, W. V. et al. Multiplex real-time PCR for detection and quantification of *Colletotrichum abscissum* and *C. gloeosporioides* on Citrus leaves. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, p. 1047–1059, 2019.

PEREYRA, M. M. et al. Effect of stress factors associated with postharvest citrus conditions on the viability and biocontrol activity of *Clavispora lusitaniae* strain 146. **PLOS ONE**, v. 15, n. 9, e0239432, 2020. DOI: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239432>>.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v. 21, p. 400-407, 2003.

RABEE, Muhammad Fazle et al. Endophyte mediated biocontrol mechanisms of phytopathogens in agriculture. **Research in Microbiology**, [s.l.], In Press, Corrected Proof, 9 July 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2024.104229>.

RAMBAUT, A. **FigTree** v.1.4.4. 2018. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>. Acesso em: 28 mar. 2024.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. Suco de uva. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2007. 45 p. (Coleção Agroindústria Familiar).

RABBEE, Muhammad Fazle et al. Endophyte mediated biocontrol mechanisms of phytopathogens in agriculture. *Research in Microbiology*, Available online 9 July 2024. In Press, Corrected Proof. DOI:< <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2024.104229>>.

RONQUIST, F. et al. **MrBayes** 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, v. 61, p. 539-542, 2012. DOI: <10.1093/sysbio/sys029>.

SAITO, S. et al. *Botrytis californica*, uma nova espécie críptica no complexo de espécies *B. cinerea* causando mofo cinzento em mirtilos e uvas de mesa. **Mycologia**, v. 108, n. 2, p. 330-343, 2016.

SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. **Biological Control**, v. 50, p. 205-221, 2009.

SINCLAIR, J. B.; DHINGRA, O. D. **Basic plant pathology methods**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R. Uva – Sabor à mofo. *Cultivar HF*, n. 32, p. 40–42, 2005.

SREENIVASAPRASAD, S. et al. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **Plant Pathology**, v. 45, n. 4, p. 650-655, 1996.

STACKEBRANDT, E.; LIESACK, W. Ácidos nucleicos e classificação. In: GOODFELLOW, M.; O'DONNELL, A. G. (Ed.). **Handbook of new bacterian systematics**. Londres: Academic Press, 1993. p. 152-189.

STEBBING, A. R. D. Hormese - a estimulação do crescimento por baixos níveis de inibidores. **A Ciência do Meio Ambiente**, v. 22, p. 213-234, 1982.

STEEL, C. C.; GREER, L. A.; SAVOCCHIA, S. Grapevine inflorescences are susceptible to the bunch rot pathogens, *Greeneria uvicola* (bitter rot) and *Colletotrichum acutatum* (ripe rot). **European Journal of Plant Pathology**, v. 133, p. 773–778, 2012.

TEMPLETON, M. D. et al. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. **Gene**, v. 122, n. 1, p. 225-230, 1992.

WANG, C.; WU, C.; QIU, S. Investigação da diversidade de leveduras de *Vitis davidii* Föex durante fermentações espontâneas usando abordagens de sequenciamento dependentes de cultura e de alto rendimento. **Food Research International**, v. 126, 108582, 2019. DOI: <10.1016/j.foodres.2019.108582>.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. Studies in Mycology. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115–180, 2012.

WHITE, T. M. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Ed.). PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: **Academic Press**, 1990. p. 315-321.

WILLIAMSON, B. et al. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 5, p. 561–580, 2007.

YAMAMOTO, J.; SATO, T.; TOMIOKA, K. Occurrence of ripe rot of grape (*Vitis vinifera* L.) caused by *Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 65, p. 83-86, 1999.

ZHANG, D. et al. PhyloSuite: An integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 20, p. 348–355, 2020. DOI: <10.1111/1755-0998.13096>.

ZHOU, J. et al. Identificação morfológica e filogenética de *Botrytis sinoviticola*, uma nova espécie críptica que causa a doença do mofo cinzento das uvas de mesa (*Vitis vinifera*) na China. **Mycologia**, 2014.

**CAPÍTULO II – MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE BAGA E PRODUTOS  
COMERCIAIS AFETAM ESTRUTURAS INFECTIVAS DE TRÊS ESPÉCIES DE  
*Colletotrichum* sp. E CONTROLAM A PODRIDÃO DA UVA MADURA**

Camila Iavorski Zela, Débora de Oliveira Franco, Louise Larissa May De Mio

**RESUMO**

A podridão da uva madura, causada por *Colletotrichum* spp., é mundialmente importante. Em condições favoráveis, a doença pode causar perdas significativas na produção. *Colletotrichum* é um gênero polífago e possui alta diversidade de espécies patogênicas. No Brasil, *C. nymphaeae*, *C. siamense* e *C. viniferum* são as principais espécies associadas à videira. A resistência destes patógenos a fungicidas tem dificultado o controle da doença. O controle biológico é uma abordagem promissora, mas pouco se sabe da eficácia de produtos comerciais. Além disso, nesta área, microrganismos endofíticos de cultivares resistentes poderiam ser uma opção para manejo da doença. O objetivo deste estudo foi avaliar três isolados endofíticos de bagas de *Vitis labrusca* e produtos comerciais à base de *Bacillus* spp., no controle das estruturas infectivas de isolados das espécies de *Colletotrichum* spp. predominantes no país que causam a podridão da uva madura. Além disso, estudar o efeito desses agentes de controle biológico (ABCs) sobre a doença. Para isso, foram realizados testes *in vitro* e *ex vivo*. Os tratamentos avaliados foram: endofíticos de bagas de uva - VA4L (*Clavispora asparagi*), VB5B (*Zygoascus meyeriae*), PA1N (*Tatumella morbirosei*) e um mix destes três, epífito do filoplano de macieira - C12 (*Bacillus alcalophilus*); produtos comerciais - Duravel® e Zigurat® (*B. amyloliquefaciens*), Serenade® (*B. subtilis*) e o fungicida Prevenil® (clorotalonil). *In vitro*, o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. foi avaliado após testes de pareamento de colônias, de ação de metabólitos termoestáveis e de compostos voláteis antifúngicos. Foi avaliada também a germinação de conídios e sua capacidade em formar colônia após contato com os antagonistas. *Ex vivo*, bagas de uva 'Thompson' foram tratadas com os ABCs e depois inoculadas com isolados de *Colletotrichum* spp. A incidência da doença foi quantificada ao longo de 12 dias. Os tratamentos tiveram resultados variáveis de acordo com a espécie de *Colletotrichum* avaliada. Dentre os produtos comerciais, Serenade® e Duravel® foram os mais eficazes na redução de crescimento micelial em cultivo pareado e na redução da AACP<sub>inc</sub> (área abaixo da curva do progresso da incidência) de podridão da uva madura causada por *C. nymphaeae* e *C. viniferum*. Duravel® teve efeito na viabilidade dos conídios de todas as espécies patogênicas testadas, evidenciado pela inibição da formação de colônias. Serenade® produziu compostos termoestáveis capazes de inibir o crescimento micelial dos patógenos. Dentre os isolados antagônicos, os endofíticos de bagas de uva (VA4L, VB5B e PA1N) reduziram o crescimento micelial dos patógenos. O efeito principal destes isolados foi observado na redução da AACP<sub>inc</sub> da podridão da uva madura, causada pelas espécies de *Colletotrichum* avaliadas (*C. nymphaeae* e *C. viniferum*). O mix destes isolados teve resultados comparáveis aos do fungicida clorotalonil, sendo uma excelente opção a ser incluída no manejo da podridão da uva madura.

Palavras-chaves: Biocontrole; Sustentabilidade, Antagonismo.

## CHAPTER II - ENDOPHYTIC BERRY MICROORGANISMS AND COMMERCIAL PRODUCTS AFFECT INFECTIVE STRUCTURES OF THREE SPECIES OF

### *Colletotrichum* sp. AND CONTROL OF GRAPE RIPE ROT

Camila Iavorski Zela, Débora de Oliveira Franco, Louise Larissa May De Mio

#### ABSTRACT

Grape ripe rot, caused by *Colletotrichum* spp., is important worldwide. Under favorable conditions, the disease can cause significant losses in production. *Colletotrichum* is a polyphagous genus with a high diversity of pathogenic species. In Brazil, *C. nymphaeae*, *C. siamense* and *C. viniferum* are the main species associated with grapevines. The resistance of these pathogens to fungicides has made it difficult to control the disease. Biological control is a promising approach, but little is known about the efficacy of commercial products. Furthermore, in this area, endophytic microorganisms from resistant cultivars could be an option for managing the disease. The aim of this study was to evaluate three endophytic isolates from *Vitis labrusca* berries and commercial products based on *Bacillus* spp. in controlling the infective structures of isolates of the *Colletotrichum* spp. species prevalent in the country that cause grape ripe rot. In addition, to study the effect of these biological control agents (ABCs) on the disease. To this end, in vitro and ex vivo tests were carried out. The treatments evaluated were: grape berry endophytes - VA4L (*Clavispora asparagi*), VB5B (*Zygoascus meyeriae*), PA1N (*Tatumella morbirosei*) and a mix of these three, apple phylloplane epiphyte - C12 (*Bacillus alcalophilus*); commercial products - Duravel® and Zigurat® (*B. amyloliquefaciens*), Serenade® (*B. subtilis*) and the fungicide Prevenil® (chlorothalonil). In vitro, the mycelial growth of *Colletotrichum* spp. was evaluated after colony pairing tests, the action of thermostable metabolites and antifungal volatile compounds. The germination of conidia and their ability to form colonies after contact with the antagonists was also evaluated. Ex vivo, 'Thompson' grape berries were treated with the ABCs and then inoculated with isolates of *Colletotrichum* spp. The incidence of the disease was quantified over 12 days. The treatments had variable results according to the species of *Colletotrichum* evaluated. Among the commercial products, Serenade® and Duravel® were the most effective in reducing mycelial growth in paired culture and in reducing the AACPinc (area under the incidence progress curve) of Grape ripe rot caused by *C. nymphaeae* and *C. viniferum*. Duravel® had an effect on the viability of the conidia of all the pathogenic species tested, as evidenced by the inhibition of colony formation. Serenade® produced thermostable compounds capable of inhibiting the mycelial growth of the pathogens. Among the antagonistic isolates, the endophytes from grape berries (VA4L, VB5B and PA1N) reduced the mycelial growth of the pathogens. The main effect of these isolates was observed in reducing the AACPinc of Grape ripe rot caused by the *Colletotrichum* species evaluated (*C. nymphaeae* and *C. viniferum*). The mix of these isolates had results comparable to those of the fungicide chlorothalonil, making it an excellent option to be included in the management of grape ripe rot.

Keywords: Biocontrol; Sustainability, Antagonism.

## 1 INTRODUÇÃO

A podridão da uva madura, causada por *Colletotrichum* spp., é uma doença mundialmente importante, relatada em vários países (Southworth, 1891; Yokosawa *et al.*, 2020; Duan; Chen, 2022; Chowdappa *et al.* 2009, Yamamoto *et al.* 1999, Greer *et al.*, 2013). A doença é um problema crescente no Brasil desde a década de 1990. A demanda do mercado consumidor por uvas com maior teor de açúcar resultou em tempo de permanência mais longo das frutas no campo, o que aumentou a incidência dessa doença (Garrido; Sônego, 2008). Em condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da podridão da uva madura, produtores relatam perdas superiores a 90% na produção (Batista *et al.*, 2023).

*Colletotrichum* spp. é um dos principais gêneros fitopatogênicos devido ao grande número de hospedeiros e à diversidade de espécies encontradas no gênero (Dean *et al.*, 2012). No Brasil, alta diversidade genética tem sido relatada para o gênero *Colletotrichum* associado às videiras. Na região da Serra Gaúcha, os complexos *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. boninense* foram relatados causando podridão da uva madura (Echeverrigaray *et al.*, 2020). Considerando todas as regiões produtivas do país, treze espécies de *Colletotrichum* spp. foram identificadas, distribuídas nestes complexos, com predomínio das espécies *C. nymphaeae*, *C. siamense* e *C. viniferum* (Steiner *et al.*, 2024).

Fungicidas são frequentemente aplicados na videira para o controle de doenças. A crescente dificuldade de manejo da podridão da uva madura (Garrido; Sônego, 2008, Batista *et al.*, 2023), agravada pela resistência a fungicidas (Steiner *et al.*, 2024), coloca os produtores em um cenário desafiador. O uso contínuo dos fungicidas não apenas aumenta os custos de produção, mas também leva à seleção de isolados resistentes, reduzindo a eficácia do controle químico (Ceresini *et al.*, 2024). Diante desse panorama, o controle biológico surge como uma alternativa para enfrentar essas dificuldades de manejo. O uso de agentes de controle biológico (ABCs), oferece uma abordagem sustentável e eficaz, não apenas devido à sua capacidade de inibir diretamente *Colletotrichum* spp. através da produção de compostos antimicrobianos (Arroyave-Toro *et al.*, 2017), mas também pela possibilidade de reduzir a dependência de produtos químicos, preservando sua eficácia e prolongando a durabilidade dos tratamentos convencionais (Wang *et al.*, 2024).

A influência de ABCs em isolados resistentes ou menos sensíveis a fungicidas poderia fornecer uma vantagem na estratégia de manejo incluindo biológicos em alternância com fungicidas para controle de podridão da uva madura ou mesmo para serem recomendados em períodos de colheita. O uso de *Bacillus* spp. tem se mostrado uma ferramenta promissora no

controle biológico de doenças em frutíferas (Furuya *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2014; Haron *et al.*, 2023). No Brasil, apenas *B. velezensis* teve eficácia comprovada no controle de podridão da uva madura (Russi *et al.*, 2024). Produtos comerciais à base de *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* têm registro para a videira no Brasil (AGROFIT, 2024), contudo, no melhor do nosso conhecimento não existem estudos científicos que relacionam a eficácia desses produtos no controle da podridão da uva madura. Testar outros microrganismos, além dos já registrados pode ser interessante para aumentar as opções disponíveis para o manejo da doença.

No estudo de controle biológico, além da eficácia no controle da doença é fundamental entender os mecanismos de ação envolvidos para melhor posicionar o uso dos ativos em etapas de comercialização (Bonaterra *et al.*, 2022). O entendimento da produção de compostos inibidores à *Colletotrichum* spp. produzidos por ABCs, é importante para a compreensão do mecanismo de ação de tal antagonismo. Assim, o controle da doença pelo uso das substâncias produzidas torna-se uma possibilidade, e, não apenas pela introdução massal desses agentes (Kupper *et al.*, 2003). Além disso, o estudo do potencial antagonístico *in vitro* pode direcionar o posicionamento dos produtos em futuros ensaios de campo.

Isolados endofíticos de bagas de *Vitis labrusca* com potencial antagonístico contra *Botrytis cinerea* e *C. nymphaeae* indicaram três espécies potenciais para controle destes patógenos, que são: *Clavispora asparagi*, *Zygoascus meyeriae* e *Tatumella morbirosei* (Capítulo 1). Esses microrganismos pré-selecionados são potenciais para serem estudados no controle das espécies relevantes de *Colletotrichum* spp. associadas à videira, recentemente relatadas no Brasil (Steiner *et al.*, 2024). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os isolados endofíticos VA4L (*C. asparagi*), VB5B (*Z. meyeriae*) e PA1N (*T. morbirosei*), e produtos comerciais à base de *Bacillus* spp. na redução de estruturas infectivas de três espécies de *Colletotrichum* spp.: *C. nymphaeae*, *C. siamense* e *C. viniferum*, e no controle da podridão da uva madura.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos deste capítulo foram conduzidos no Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças (LEMID), localizado no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná. As coleções de isolados utilizados estão armazenadas neste laboratório.

## 2.1 PROCEDÊNCIA DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp.

Os isolados de *C. nymphaeae*, *C. siamense* e *C. viniferum* utilizados neste trabalho foram obtidos de bagas de uva por Steiner *et al.* (2024). Os isolados foram confirmados como patogênicos em bagas de *V. labrusca* e *V. vinifera* (Tabela 1).

TABELA 1 – DESCRIÇÃO DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. DE BAGAS DE VIDEIRA UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS *in vitro* E *ex vivo*.

Isolado	Complexo	Espécie	Cidade	Estado
VICnPR22-230	<i>C. acutatum</i>	<i>C. nymphaeae</i>	Vera Cruz do Oeste	Paraná
VICnPR22-155	<i>C. acutatum</i>	<i>C. nymphaeae</i>	Lapa	Paraná
VICsPR22-196	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. siamense</i>	Rosário do Ivaí	Paraná
VICsPR22-198	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. siamense</i>	Rosário do Ivaí	Paraná
VICvPR22-106	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. viniferum</i>	Francisco Beltrão	Paraná
VICvPR22-81	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. viniferum</i>	Coronel Domingos Soares	Paraná

Fonte: A autora (2024).

## 2.2 AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO UTILIZADOS NOS TESTES *in vitro* E NO CONTROLE DE PODRIDÃO DA UVA MADURA

Os tratamentos utilizados nos experimentos, descritos na Tabela 2, incluíram os produtos comerciais Duravel® (1 g.L<sup>-1</sup>), Zigurat® (3 mL.L<sup>-1</sup>) (ambos contendo *B. amyloliquefaciens*) e Serenade® (3 mL.L<sup>-1</sup>) (*B. subtilis*). O fungicida Previnil® (clorotalonil) foi utilizado como comparativo nos testes de crescimento micelial em cultivo pareado, germinação de conídios e formação de colônias (50 µL.L<sup>-1</sup>), bem como no controle da podridão da uva madura (2 mL.L<sup>-1</sup>). Os isolados endofíticos de bagas de uva pré-selecionados por seu potencial antagônico (Capítulo 1): VA4L (*Clavispora asparagi*), VB5B (*Zygoascus meyeriae*) e PA1N (*Tatumella morbirosei*). Além disso, foi utilizado um isolado proveniente do filoplano de macieira (Rollemberg *et al.*, 2008): C12 (*Bacillus alcalophilus*). As concentrações dos agentes biológicos prospectados serão detalhadas em cada seção específica. A testemunha consistiu em água destilada esterilizada.

TABELA 2 – TRATAMENTOS UTILIZADOS NOS TESTES *in vitro* E NO CONTROLE DE PODRIDÃO DA UVA MADURA

Tratamento	Espécie/gênero/i.a.	Origem	Estado	Ano	Meio de cultura
Testemunha	Água	-	-	-	-
Previnil®*	Clorotalonil	Comercial	-	-	-
C12	<i>B. alcalophilus</i>	Epífito de filoplano de macieira	Paraná	2008	NA
VA4L	<i>Clavispora asparagi</i>	Endofítico de bagas de uva	Paraná	2020	LB
VB5B	<i>Zygoascus meyeræ</i>	Endofítico de bagas de uva	Paraná	2020	BDA
PA1N	<i>Tatumella morbirosei</i>	Endofítico de bagas de uva	Paraná	2020	NA
Duravel®	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Comercial	-	-	BDA
Zigurat®	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Comercial	-	-	BDA
Serenade®	<i>B. subtilis</i>	Comercial	-	-	BDA
Mix**	VA4L, VB5B e PA1N	Endofítico de bagas de uva	Paraná	2020	LB+BDA+NA

\*Não utilizado nos testes para verificar a presença de compostos voláteis e termoe estáveis. \*\*Não utilizado nos testes *in vitro*, testado apenas para o controle da podridão da uva madura. - Sem informações.

### 2.2.1 Cultivo dos agentes de controle biológico (C12, VA4L, VB5B e PA1N)

Os isolados C12, VA4L, VB5B e PA1N foram cultivados conforme metodologia proposta por Romeiro (2001), com algumas modificações. Três meios de cultivo foram utilizados, conforme o isolado: Batata Dextrose ágar (BDA) (39 g.L<sup>-1</sup>), Nutrient Ágar (NA) (Nutrient Broth 12 g.L<sup>-1</sup>, ágar 20 g.L<sup>-1</sup>) e Luria Bertani Modificado (LB) (Peptona 10 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup>, cloreto de sódio 1 g.L<sup>-1</sup>, ágar 20 g.L<sup>-1</sup>) (TABELA 2).

Inicialmente, os isolados foram recuperados de armazenamento em glicerol a 25% (v/v) a -20°C. Para isso, 100 µL de cada isolado foram inoculados em meio de cultura sólido, utilizando a técnica de estria com auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada. As placas foram incubadas a 28°C por 72 horas. Após o período de incubação, 1 mL de solução salina estéril a 0,85% (p/v) foi adicionado às placas de cultura, e as colônias foram cuidadosamente raspadas da superfície do meio de cultura sólido para a solução salina, formando uma suspensão.

Dessa suspensão, 100 µL foram transferidos para 50 mL de meio de cultura líquido correspondente (sem adição de ágar), e as culturas líquidas foram incubadas a 28°C por 48 horas em agitador a 120 rpm. Após a incubação, as culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos a 5°C, o sobrenadante foi descartado, e a biomassa resultante foi ressuspensa em 50 mL de solução salina estéril a 0,85%.

A concentração da suspensão foi ajustada medindo-se a densidade óptica (DO) a 540 nm em espectrofotômetro, diluindo conforme necessário para obter a DO desejada. O Mix foi preparado utilizando 1/3 de cada isolado endofítico de bagas de uva.

## 2.3 TESTES *in vitro* PARA VERIFICAR O EFEITO DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO (ABCs) NAS ESTRUTURAS INFECTIVAS *Colletotrichum* spp.

### 2.3.1 Efeito dos ABCs sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. em cultivo pareado de colônias

Seguindo metodologia proposta por Dennis e Webster (1971), com adaptações de Petermann *et al.* (2022), para estudar o efeito antagônico dos ABCs no crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum* spp. (TABELA 1), discos de 5 mm de diâmetro obtidos da borda das colônias crescidas por cinco dias de cada isolado patogênico, foram repicadas para o centro de placas de Petri contendo meio BDA.

Depois, quatro discos de papel filtro esterilizados, com 8 mm de diâmetro, foram depositados em pontos equidistantes nas extremidades da placa. Cada disco de papel recebeu 5  $\mu\text{L}$  de cada tratamento (descritos no item 2.2). A suspensão contendo os ABCs prospectados foi padronizada em  $2,5 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>. O fungicida foi incorporado ao BDA fundente, a 50 °C.

As placas foram incubadas a  $25 \pm 2$  °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Utilizou-se delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições, cada placa de Petri constituiu-se em uma unidade experimental. Na avaliação do crescimento micelial, fez-se a medição de dois diâmetros perpendiculares e opostos das colônias aos quatro dias. O experimento foi repetido.

### 2.3.2 Efeito de metabólitos termoestáveis produzidos por ABCs sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.

Para investigar a influência dos metabólitos termoestáveis, foi empregada metodologia estabelecida por Moreira *et al.* (2014), com algumas modificações. Inicialmente, 40  $\mu\text{L}$  de cada tratamento foram transferidos para Erlenmeyers contendo 100 mL de cada meio de cultura, conforme Tabela 2. Após a incubação, a 28°C durante 24 horas e sob agitação de 120 rpm, alíquotas de 10 mL de cada caldo foram transferidas para novos frascos contendo 90 mL de meio BDA. As formulações comerciais foram introduzidas em 100 mL de BDA nas dosagens especificadas na Tabela 2.

Os Erlenmeyers contendo os ABCs e o meio de cultura BDA foram posteriormente esterilizados em autoclave durante 20 min, a 121 °C. Após a autoclavagem, depositou-se 15 mL de cada meio por placa de Petri. Após a solidificação, transferiu-se para o centro de cada

placa um disco de 5 mm de diâmetro, obtido da borda de colônias crescidas por cinco dias de cada isolado de *C. nymphaeae*, *C. siamense* e *C. viniferum* (TABELA 1).

Os tratamentos utilizados estão descritos no item 2.2. As placas foram incubadas a  $25 \pm 2$  °C, sob fotoperíodo de 12 horas.

Utilizou-se delineamento inteiramente ao acaso, com três repetições, em que cada placa de Petri foi considerada uma unidade experimental. Foram medidos dois diâmetros perpendiculares e opostos por colônia após sete dias. O experimento foi repetido.

### 2.3.3 Efeito de compostos voláteis produzidos por ABCs sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.

Para estudar o efeito de compostos antifúngicos voláteis foi utilizada metodologia adaptada por Moreira *et al.* (2014) de Dennis e Webster (1971). Para um dos lados de placas de Petri bipartidas foram repicados os ABCs, utilizando os meios de cultivo conforme descrito na Tabela 2. Após 24 horas, transferiu-se para o outro compartimento da placa de Petri contendo BDA, um disco de micélio de 5 mm de diâmetro, obtido da borda de colônias crescidas por cinco dias de isolados de *C. nymphaeae*, *C. siamense* e *C. viniferum* (TABELA 1). Os tratamentos estão descritos no item 2.2. As placas foram incubadas a  $25 \pm 2$  °C, sob fotoperíodo de 12 horas.

Utilizou-se delineamento inteiramente ao acaso, com três repetições. Na avaliação do crescimento micelial, fez-se a medição de dois diâmetros perpendiculares e opostos das colônias três dias, a partir do momento em que foi colocado o disco de micélio com os isolados no meio de cultura. O experimento foi repetido.

### 2.3.4 Germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. após contato com ABCs

Para avaliar o efeito dos ABCs sobre a germinação de conídios de *C. nymphaeae*, *C. siamense* e *C. viniferum* (TABELA 1), inicialmente foram obtidos conídios dos isolados patogênicos a partir de colônias crescidas por quatorze dias. Então, uma suspensão de conídios foi preparada.

Em seguida, conforme metodologia proposta por Petermann *et al.* (2022), uma gota de 50 µL da suspensão ajustada em  $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> foi depositada em microtubo de 1,5 mL. Depois, foi depositada uma gota de 50 µL contendo o tratamento (TABELA 2), preparados conforme item 2.2.1 e os tubos foram agitados. Para os isolados antagonísticos, as máximas

concentrações obtidas em 48 horas foram utilizadas. VA4L (*Clavispora asparagi*) foi testado na concentração mínima de  $8,3 \times 10^{11}$  UFC.mL<sup>-1</sup>, VB5B (*Zygoascus meyeræ*) na concentração mínima de  $6,4 \times 10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>, PA1N na concentração mínima de  $7,4 \times 10^9$  UFC. mL<sup>-1</sup> e C12 (*B. alcalophilus*) na concentração mínima de  $4,5 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>. As doses das formulações comerciais estão descritas no item 2.2. Os microtubos foram incubados a  $25 \pm 2$  °C, no escuro.

O delineamento foi inteiramente ao acaso, com três repetições, em que cada microtubo constituiu-se em uma unidade experimental. A porcentagem de germinação de conídios foi determinada mediante contagem de 50 conídios do patógeno em cada repetição após 12 horas de incubação, com a interrupção da germinação através da adição de 20 µL de lactofenol. Consideraram-se como germinados os conídios com tubo germinativo maior que o próprio comprimento. O experimento foi repetido.

#### 2.3.5 Formação de colônias de *Colletotrichum* spp. após contato de conídios com ABCs

A fim de avaliar se os conídios de *Colletotrichum* spp., que germinaram após 12 horas em contato com os tratamentos, ainda permaneciam viáveis e formariam colônia em meio de cultura, foi realizado o plaqueamento da suspensão obtida no experimento de germinação de conídios, assim como descrito por Petermann *et al.* (2022),

A metodologia e tratamentos utilizados para a condução desse experimento foram os mesmos descritos do item 2.3.4. Porém, antes de realizar a paralisação da germinação com a adição de lactofenol, três alíquotas de 5 µL foram retiradas dos tubos e, então depositas em placas de Petri contendo o meio BDA. As placas foram incubadas em BOD, sob temperatura de  $25 \pm 2$ °C, e fotoperíodo de 12 horas.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, contendo 3 repetições. A avaliação foi realizada após quatro dias e fez-se a medição de dois diâmetros perpendiculares e opostos das colônias, com auxílio de paquímetro digital. O experimento foi repetido.

## 2.4 AGENTES BIOLÓGICOS NO CONTROLE PREVENTIVO DE PODRIDÃO DA UVA MADURA

Bagas de uva da cultivar ‘Thompson’, previamente desinfestadas, foram submetidas aos tratamentos descritos no item 2.2. As bagas foram submersas por 5 segundos em uma solução contendo os tratamentos, nas concentrações descritas na Tabela 3. Após a secagem dos produtos nas bagas, realizou-se a inoculação com 5 µL de uma suspensão de *Colletotrichum*

spp. ajustada para  $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> contendo 10% de suco de uva. Alíquotas de 30 µL desta suspensão foram depositadas em placas contendo meio AA, permitindo avaliar a capacidade germinativa dos isolados nas mesmas condições de temperatura de incubação das bagas. A germinação foi interrompida 24 horas após a deposição, com a adição de aproximadamente 50 µL de Lactofenol, resultando em taxa de germinação de 100%.

Após a inoculação, as bagas foram mantidas sobre papel filtrado umedecido em caixas do tipo Gerbox®, condicionadas a 25 °C ( $\pm 2$  °C) e sob fotoperíodo de 12 horas. Para a análise da incidência, utilizada para cálculo da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD), o delineamento adotado foi inteiramente casualizado, com três repetições, onde cada Gerbox® constituiu uma parcela. Para análise de sobrevivência, foi considerado um delineamento experimental de blocos ao acaso, onde cada bloco consistiu em uma Gerbox® contendo 8 bagas de uva, totalizando 32 bagas avaliadas por tratamento para cada isolado. A avaliação dos sintomas foi realizada a cada dois dias ao longo de 12 dias. O período de incubação foi obtido. A incidência foi determinada ao final do experimento.

TABELA 3 – NOME, INGREDIENTES ATIVOS E DOSES DE APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS TESTADOS PARA O CONTROLE DA PODRIDÃO DA UVA MADURA EM BAGAS.

Produto comercial ou nome	Empresa	Ingrediente ativo	Composição (UFC.L <sup>-1</sup> )	Dose (mL ou g.L <sup>-1</sup> )	Concentração na dose (UFC.L <sup>-1</sup> )
Testemunha	-	-	ADE	-	-
C12	-	<i>Bacillus alcalophilus</i> LEMID	$3,1 \times 10^5$	500	$1,6 \times 10^5$
VA4L	-	<i>Clavispora asparagi</i> VA4L	$9,5 \times 10^{11}$	500	$4,8 \times 10^{11}$
VB5B	-	<i>Zygoascus meyeræ</i> VB5B	$1,9 \times 10^{11}$	500	$9,5 \times 10^{10}$
PA1N	-	<i>Tatumella morbirosei</i> PA1N	$7,5 \times 10^8$	500	$3,8 \times 10^8$
Mix	-	<i>Clavispora asparagi</i> VA4L	$9,5 \times 10^{11}$	150	$1,5 \times 10^8$
		<i>Zygoascus meyeræ</i> VB5B	$1,9 \times 10^{11}$	150	$2,8 \times 10^7$
		<i>Tatumella morbirosei</i> PA1N	$7,5 \times 10^8$	150	$1,2 \times 10^5$
Duravel®	BASF	<i>B. amyloliquefaciens</i> MBI600	$6,0 \times 10^{12}$	1	$6,0 \times 10^6$
Zigurat®	Inquima	<i>B. amyloliquefaciens</i> CPQBA 040-11DRM 01 CPQBA 040-11DRM 04	$1,1 \times 10^9$	3	$3,3 \times 10^3$
Serenade®	Bayer S. A.	<i>Bacillus subtilis</i> QST713	$1,3 \times 10^{10}$	2	$2,6 \times 10^4$
Previnil®	Helm	Clorotalonil	720 g.L <sup>-1</sup>	2	-

Fonte: A autora (2024). ADE – água destilada esterilizada.

## 2.5 ANÁLISE DOS DADOS

Nos testes *in vitro*, a percentagem de inibição do crescimento micelial e da germinação de conídios ocasionada pelos tratamentos em relação à testemunha foi calculada. Para isso, foi utilizada a fórmula:  $I_{CM/GC} = 100 - (n_i * 100) / \mu T$ , onde:  $I_{CM/GC}$  = Inibição do crescimento micelial ou da germinação de conídios;  $n_i$  = crescimento micelial ou percentagem de conídios germinados da repetição experimental; e  $\mu T$  = média da testemunha.

Para analisar os efeitos dos ABCs no controle preventivo da podridão da uva madura, foi calculada a área abaixo da curva do progresso da incidência ( $AACP_{inc}$ ), somando-se as áreas trapezoidais (Campbell; Madden, 1990), conforme a fórmula:  $AACP_{inc} = \Sigma(y_i + (y_{i+1}))/2 * ((t_{i+1}) - t_i)$ , onde  $AACP_{inc}$  é a área abaixo da curva de progresso da doença, representando o acúmulo de incidência ao longo do tempo;  $y_i$  é o valor da incidência da doença no tempo  $t_i$ ;  $(y_{i+1})$  é o valor da severidade no tempo subsequente  $(t_{i+1})$ ;  $(y_i + (y_{i+1}))/2$  calcula a média da severidade entre os tempos  $t_i$  e  $t_{i+1}$ ; e  $((t_{i+1}) - t_i)$  é o intervalo de tempo entre as duas medições. Nesta análise, foi considerada a média de incidência dos dois experimentos. Considerou-se como período de incubação (PI) o tempo entre a inoculação e o aparecimento dos sintomas em 50% das bagas de cada tratamento.

Para avaliação de todos os ensaios *in vitro* (item 2.3) e para análise da  $AACP_{inc}$  (item 2.4), as homogeneidades das variâncias foram verificadas pelo teste de Bartlett e a normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando necessário, foram realizadas transformações exponenciais nos dados para atender a esses pressupostos.

Para verificar diferenças na inibição do crescimento micelial em cultivo pareado e na inibição da germinação, foi realizada análise de variância (ANOVA), verificando-se o efeito de tratamentos pelo teste F, seguida do teste de Tukey, a 5% de significância para comparação de médias, com arranjo fatorial 9 x 3 (nove tratamentos x três espécies de *Colletotrichum*). O arranjo fatorial 8 x 3 (oito tratamentos x três espécies de *Colletotrichum*) foi utilizado para verificar diferenças na inibição do crescimento micelial após contato com metabólitos termoestáveis e compostos voláteis. Quanto à  $AACP_{inc}$ , foi aplicado o teste de Scott Knott, a 5% de significância para comparação de médias e foi adotado o arranjo fatorial 10 x 3 (dez tratamentos x três espécies de *Colletotrichum*).

Mesmo após transformações, os dados pertencentes ao teste de formação de colônias após o contato dos conídios de *Colletotrichum* spp. com os ABCs, não atenderam aos pressupostos da ANOVA. Então, propôs-se o modelo linear generalizado (GLM) com arranjo fatorial 8 x 3 (oito tratamentos x três espécies de *Colletotrichum*). O modelo de Poisson foi

escolhido para modelar a resposta variável. As médias foram comparadas pelo teste Tukey, aplicado ao nível de 5% de significância.

Foi realizada uma análise de agrupamento hierárquico, usando a distância euclidiana e o método aglomerativo de Ward, para agrupar os ABCs com base nas semelhanças do efeito inibitório sobre cada uma das espécies dos patógenos (*C. nymphaeae*, *C. siamense*, *C. viniferum*). Além disso, foi usada uma análise de componentes principais (ACP) para simplificar a interpretação das interrelações entre os ABCs e o efeito inibitório combinado sobre as espécies dos patógenos (Jolliffe 2002). O número de componentes principais foi definido com base na variância acumulada ( $\geq 70\%$ ) e nos valores próprios ( $\geq 1,0$ ) (Naseri; Sabeti 2021).

Para estimar as funções de sobrevivência, foi empregado o modelo de Kaplan-Meier. A comparação das curvas de sobrevivência entre os tratamentos foi realizada com o teste de log-rank. Resultados significativos ( $p < 0,05$ ) indicam diferenças nas probabilidades de sobrevivência. Os gráficos de Kaplan-Meier foram gerados para visualização (em anexo) e realizou-se ajuste ao modelo semi-paramétrico de Cox para comparar os tratamentos. Os parâmetros do modelo incluíram: tratamento e bloco, gerando uma melhor concordância para o modelo.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o ambiente de programação estatística RStudio® (R CORE TEAM, 2024). O pacote “survival” (Therneau, 2012) do R® foi utilizado para análise de sobrevivência. Para a ACP e análise de agrupamento foram executados com os pacotes agricolae (de Mendiburu 2023), FactoMineR (Lê *et al.* 2008) e factorextra (Kassambara; Mundt, 2017).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 TESTES *in vitro* PARA VERIFICAR O EFEITO DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO (ABCS) NAS ESTRUTURAS INFECTIVAS DE *Colletotrichum* spp.

##### 3.1.1 Efeito dos ABCs sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. após cultivo pareado de colônias

Os resultados referentes ao estudo do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. após cultivo pareado de colônias estão relacionados na Tabela 4 e os aspectos morfológicos da colônia são mostrados na Figura 1.

Todos os ABCs, exceto a bactéria C12 (*B. alcalophilus*) e a levedura VA4L (*C. aspargi*) tiveram efeito inibitório sobre o crescimento micelial de todas as espécies de *Colletotrichum* spp.

Percentagens de inibição superiores a 50% foram observadas após os pareamentos com Duravel® (*B. amyloliquefaciens*) e com Serenade® (*B. subtilis*), de forma consistente em ambos os experimentos e para todas as espécies patogênicas.

Considerando todos as espécies patogênicas, o tratamento com o produto Zigurat® (*B. amyloliquefaciens*) resultou em maior inibição do crescimento micelial do patógeno na segunda repetição de experimento (38,4 a 41,9%), em comparação à primeira repetição, cuja inibição variou de 2,5 a 29,1%.

Neste ensaio, dentre os isolados endofíticos de bagas de uva, o melhor isolado foi a bactéria *T. morbirosei* (PA1N). A inibição do crescimento micelial do patógeno após pareamento com a bactéria variou de 45,6 a 50,9% para a espécie *C. nymphaeae*, 30,9 a 38,6% para a espécie *C. siamense* e de 25,7 a 58,9% para a espécie *C. viniferum*.

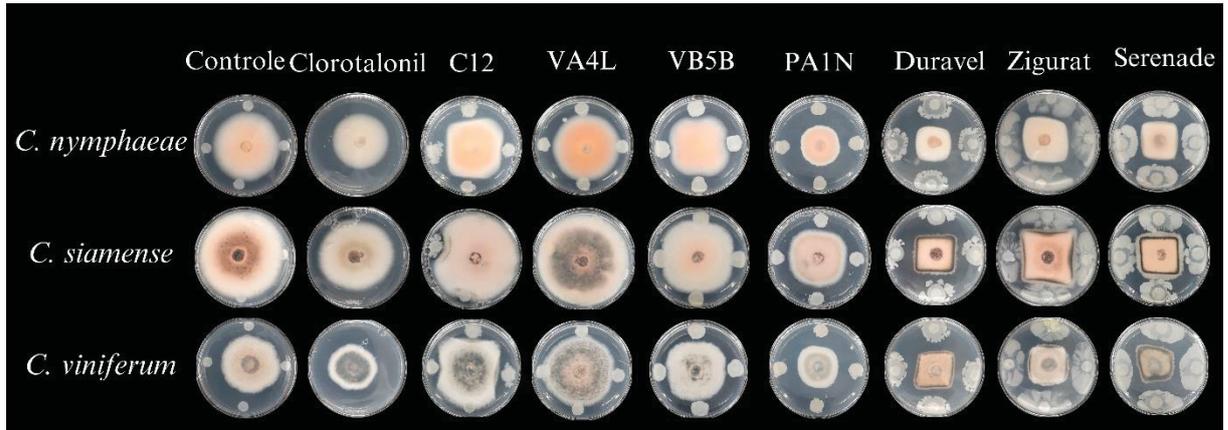
Em geral, os ABCs apresentaram percentagens de inibição semelhantes ou até superiores às encontradas para clorotalonil.

TABELA 4 – INIBIÇÃO (%) DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletotrichum* spp. APÓS CULTIVO PAREADO COM AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

Experimento 1	<i>C. nymphaeae</i>	<i>C. siamense</i>	<i>C. viniferum</i>
C12	10,6 dB	13,1 cAB	20,7 bcA
VA4L	7,4 dA	6,6 cA	11,40 cA
VB5B	22,5 cA	27,7 bA	28,4 bA
PA1N	50,9 bA	38,6 bB	58,9 aA
Duravel®	66,3 aA	56,0 aB	60,8 aAB
Zigurat®	16,0 cdB	2,5 cC	29,1 bA
Serenade®	55,0 abA	54,7 aA	62,9 aA
Previnil®	22,3 cB	36,2 bA	26,9 bB
Experimento 2	<i>C. nymphaeae</i>	<i>C. siamense</i>	<i>C. viniferum</i>
C12	0,0 dA	2,1 dA	-18,8 fB
VA4L	17,0 cB	11,6 cdB	60,3 aA
VB5B	17,0 cA	16,3 cA	1,8 eB
PA1N	45,6 abA	30,9 bA	25,7 dB
Duravel®	52,6 aA	56,0 aA	56,6 aA
Zigurat®	38,4 bA	35,1 bA	41,9 bcA
Serenade®	57,4 aA	52,8 aA	53,7 abA
Previnil®	16,5 cB	15,3 cB	38,7 cA

Fonte: A autora (2024). Médias seguidas da mesma letra minúscula nos tratamentos e maiúscula quanto a espécie, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de significância. O crescimento máximo médio da colônia da testemunha de *C. nymphaeae* foi de 3,5 cm, de *C. siamense* foi de 4,3 cm, e de *C. viniferum* foi de 3,4 cm.

FIGURA 1 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA CÔLONIA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. APÓS CULTIVO PAREADO COM AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO



Fonte: A autora (2024).

### 3.1.2 Efeito de metabólitos termoestáveis produzidos por ABCs sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.

Considerando todas as espécies de *Colletotrichum* spp. avaliadas neste estudo quanto à inibição de crescimento micelial pelo contato com metabólitos termoestáveis antifúngicos, o produto Serenade® (*B. subtilis*) resultou na maior inibição dentre os tratamentos, que variou de 39,8 a 78,1%, dentre as espécies patogênicas avaliadas (TABELA 5).

Metabólitos termoestáveis produzidos por Duravel® (*B. amyloliquefaciens*) também reduziram o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp., com inibição de 7,2 a 30,7%.

Os isolados endofíticos de bagas de uva não produziram compostos termoestáveis capazes de inibir o crescimento de *Colletotrichum* spp.

TABELA 5 – INIBIÇÃO (%) DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletotrichum* spp. APÓS CULTIVO EM MEIO DE CULTURA CONTENDO METABÓLITOS TERMOESTÁVEIS DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

Experimento 1	<i>C. nymphaeae</i>	<i>C. siamense</i>	<i>C. viniferum</i>
C12	3,2 bcA	-3,4 bA	4,8 bcA
VA4L	-1,3 cB	2,8 bAB	21 bA
VB5B	3,0 bcA	-8,9 bA	2,8 bcA
PA1N	-0,3 cA	8,8 bA	7,2 bcA
Duravel®	28,1 bA	10,7 bA	7,2 bcA
Zigurat®	-1,9 cAB	13,5 bA	-17,1 cB
Serenade®	64,2 aA	73,4 aA	78,1 aA
Experimento 2	<i>C. nymphaeae</i>	<i>C. siamense</i>	<i>C. viniferum</i>
C12	-4,1 bA	-3,8 cA	-8,9 cA
VA4L	-1,1 bA	-1,6 cA	5,0 bA
VB5B	1,6 bA	-3,4 cAB	-8,6 cB
PA1N	-0,4 bAB	-6 cB	3,8 bA
Duravel®	30,7 aA	9,6 bB	8,6 bB
Zigurat®	2,7 bA	0,7 bcA	0,3 bcA
Serenade®	39,8 aB	43,7 aB	68,9 aA

Fonte: A autora (2024). Médias seguidas da mesma letra minúscula nos tratamentos e maiúscula quanto a espécie, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de significância. O crescimento máximo médio da colônia da testemunha de *C. nymphaeae* foi de 5,0 cm, de *C. siamense* foi de 6,4 cm, e de *C. viniferum* foi de 5,1 cm.

### 3.1.3 Efeito de compostos voláteis produzidos por ABCs sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.

Os dados referentes ao teste de produção de compostos voláteis antifúngicos sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. estão apresentados na Tabela 6 e as características morfológicas da colônia estão representadas pela Figura 2.

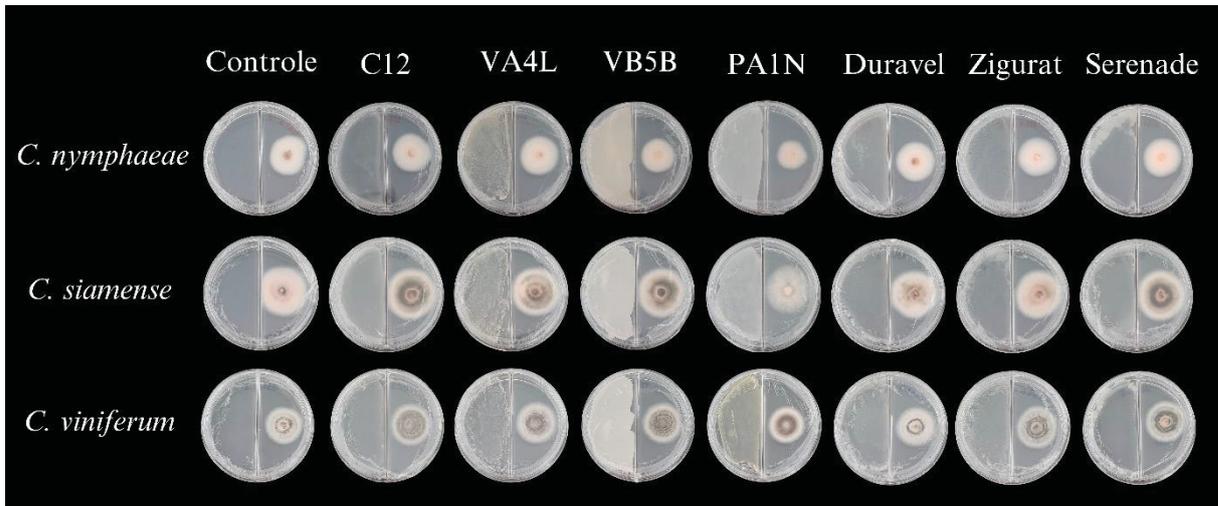
Apenas o isolado PA1N (*T. morbirosei*) foi capaz de produzir compostos voláteis que inibiram o crescimento do isolado de *C. nymphaeae*. A inibição foi de 19,1% no primeiro experimento e de 32,5% no segundo. Nenhum dos demais tratamentos produziu compostos voláteis com efeito inibitório.

TABELA 6 – INIBIÇÃO (%) DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletotrichum* spp. SOB A AÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

Experimento 1	<i>C. nymphaeae</i>	<i>C. siamense</i>	<i>C. viniferum</i>
C12	4,8 b	-2,8 ns	-6,7 ns
VA4L	2,9 b	2,6	-7,2
VB5B	15,0 ab	-0,4	-5,8
PA1N	23,7 a	-1,25	1,2
Duravel®	3,0 b	3,6	-0,3
Zigurat®	1,3 b	-1	-3,6
Serenade®	5,6 b	-1,6	2,7
Experimento 2	<i>C. nymphaeae</i>	<i>C. siamense</i>	<i>C. viniferum</i>
C12	7,0 bc	6,3 ns	4,6 ns
VA4L	-1,3 c	-1,8	2,2
VB5B	18,3 b	3,7	5,6
PA1N	32,9 a	-1,1	11,5
Duravel®	6,4 bc	-0,9	5
Zigurat®	4,7 bc	-1,9	7,6
Serenade®	8,3 bc	-2	-0,5

Fonte: A autora (2024). Médias seguidas da mesma letra minúscula nos tratamentos e maiúscula quanto a espécie, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de significância. ns – não significativo de acordo com o teste F. O crescimento máximo médio da colônia da testemunha de *C. nymphaeae* foi de 2,5 cm, de *C. siamense* foi de 3,1 cm, e de *C. viniferum* foi de 2,6 cm.

FIGURA 2 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA CÔLONIA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. APÓS CULTIVO PAREADO COM AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO



Fonte: A autora (2024).

### 3.1.4 Germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. após contato com ABCs

Os agentes de controle biológico (ABCs) não foram eficazes na inibição da germinação de conídios de todas as três espécies de *Colletotrichum* avaliadas (TABELA 7). Somente os tratamentos com Serenade® e clorotalonil apresentaram efeito sobre *C. nymphaeae* e *C. siamense*, respectivamente.

No caso de *C. siamense*, a inibição da germinação pelo fungicida variou de 21,9 a 41,5%. Enquanto, Serenade® (*B. subtilis*) reduziu de 21,1 a 34,2% da germinação de conídios de *C. nymphaeae*.

Efeitos consistentes dos ABCs sobre a germinação de *C. viniferum* não foram detectados entre as repetições experimentais.

TABELA 7 – INIBIÇÃO (%) DA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum* spp. APÓS 12 HORAS EM CONTATO COM AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

Experimento 1	Concentração	<i>C. nymphaeae</i>	<i>C. siamense</i>	<i>C. viniferum</i>
C12	7,5x10 <sup>5</sup>	4,7 cdA	6,9 cA	1,4 bA
VA4L	8,3x10 <sup>11</sup>	2,7 cdA	0,8 cdA	2,0 abA
VB5B	7,5x10 <sup>10</sup>	0,8 dB	-6,1 deB	11,1 aA
PA1N	8,5x10 <sup>9</sup>	14,8 bA	5,4 cB	6,2 abB
Duravel®	1 g.L <sup>-1</sup>	10,7 bcA	17,7 bA	-1,4 bB
Zigurat®	3 mL.L <sup>-1</sup>	5,4 cdA	8,5 cA	6,2 abA
Serenade®	2 mL.L <sup>-1</sup>	34,2 aA	-9,9 eC	3,5 abB
Previnil®	50 µL.L <sup>-1</sup>	1,3 dB	41,5 aA	1,4 B
Experimento 2	Concentração	<i>C. nymphaeae</i>	<i>C. siamense</i>	<i>C. viniferum</i>
C12	4,5x10 <sup>5</sup>	4,1 bcC	11,0 bB	28,8 aA
VA4L	9x10 <sup>11</sup>	2,7 bcB	5,0 bcB	28,1 aA
VB5B	6,4x10 <sup>10</sup>	4,1 bcB	-3,0 cC	11,6 bA
PA1N	7,4x10 <sup>9</sup>	10,2 bA	5,8 bA	7,5 bcA
Duravel®	1 g.L <sup>-1</sup>	2 bcB	13,1 bA	-0,7 cB
Zigurat®	3 mL.L <sup>-1</sup>	6,1 bcAB	12,4 bA	3,4 bcB
Serenade®	2 mL.L <sup>-1</sup>	21,1 aA	-3,0 cB	0,0 cB
Previnil®	50 µL.L <sup>-1</sup>	-1,3 cB	21,9 aA	3,4 bcB

Fonte: A autora (2024). Médias seguidas da mesma letra minúscula nos tratamentos e maiúscula quanto a espécie, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de significância. A germinação média da testemunha de *C. nymphaeae* foi de 98,7%, de *C. siamense* foi de 89,0%, e de *C. viniferum* foi de 97,0%.

### 3.1.5 Formação de colônias de *Colletotrichum* spp. após contato de conídios com ABCs

A viabilidade dos conídios após o teste de germinação foi avaliada por meio da capacidade desses conídios em formar colônias. As inibições de 100% descritas na Tabela 8 indicam a incapacidade dos conídios em formar colônias após o contato com ABCs.

Todos os tratamentos influenciaram a formação de colônias em pelo menos um dos experimentos para pelo menos uma das espécies de *Colletotrichum* spp., exceto o fungicida clorotalonil que não inibiu completamente a formação de colônias do patógeno.

Duravel® (*B. amyloliquifaciens*) teve efeito notável em todas as três espécies de *Colletotrichum* spp., inibindo completamente a formação de colônias fúngicas. Além de

Duravel®, os tratamentos C12 (*B. alcalophilus*), VB5B (*Zygoascus meyeriae*), Zigurat® (*B. amyloliquefaciens*) e Serenade® (*B. subtilis*) tiveram efeito inibitório em *C. siamense*. Serenade® também inibiu a formação de colônias de *C. nymphaeae*.

Na segunda repetição experimental, após o tratamento com a bactéria C12, a inibição da formação de colônias de todos os isolados de *Colletotrichum* spp. avaliados foi observada.

TABELA 8 – INIBIÇÃO (%) DA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE *Colletotrichum* spp. APÓS 12 HORAS DE CONTATO DOS CONÍDIOS COM AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

Experimento 1	Concentração	<i>C. nymphaeae</i>	<i>C. siamense</i>	<i>C. viniferum</i>
C12	7,5x10 <sup>5</sup>	0,0 dC	100,0 aA	50,7 cB
VA4L	8,3x10 <sup>11</sup>	4,2 cdC	10,9 cB	100,0 aA
VB5B	7,5x10 <sup>10</sup>	5,8 cdB	100,0 aA	4,1 dB
PA1N	8,5x10 <sup>9</sup>	50,0 bB	58,3 bB	68,7 bA
Duravel®	1 g.L <sup>-1</sup>	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA
Zigurat®	3 mL.L <sup>-1</sup>	11,9 cB	100,0 aA	10,1 dB
Serenade®	2 mL.L <sup>-1</sup>	100,0 aA	100,0 aA	9,2 dB
Previnil®	50 µL.L <sup>-1</sup>	6,9 cdA	3,7 dA	4,1 dA
Experimento 2	Concentração	<i>C. nymphaeae</i>	<i>C. siamense</i>	<i>C. viniferum</i>
C12	4,5x10 <sup>5</sup>	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA
VA4L	9x10 <sup>11</sup>	7,3 dA	26,8 bA	14,0 cdA
VB5B	6,4x10 <sup>10</sup>	56,8 bB	100,0 aA	10,7 cdC
PA1N	7,4x10 <sup>9</sup>	53,3 bB	100,0 aA	53,3 bB
Duravel®	1 g.L <sup>-1</sup>	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA
Zigurat®	3 mL.L <sup>-1</sup>	35,2 cB	100,0 aA	23,4 cB
Serenade®	2 mL.L <sup>-1</sup>	100,0 aA	100,0 aA	2,8 dB
Previnil®	50 µL.L <sup>-1</sup>	25,1 cdA	30,9 bA	18,2 cdA

Fonte: A autora (2024). Médias seguidas da mesma letra minúscula nos tratamentos e maiúscula quanto a espécie, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de significância. O crescimento máximo médio da colônia da testemunha de *C. nymphaeae* foi de 2,9 cm, de *C. siamense* foi de 3,8 cm e de *C. viniferum* foi de 2,2 cm.

### 3.2 AGENTES BIOLÓGICOS NO CONTROLE PREVENTIVO DE PODRIDÃO DA UVA MADURA

A área abaixo da curva do progresso da incidência (AACP<sub>inc</sub>) de podridão da uva madura na cultivar ‘Thompson’ variou de acordo com a espécie de *Colletotrichum* inoculada em ambos os experimentos (TABELA 9, FIGURA 3). A análise de sobrevivência que considera o risco relativo para aparecimento de sintomas, após tratamento preventivo e inoculação dos patógenos, em relação à testemunha está na Tabela 11.

A menor AACP<sub>inc</sub> foi observada após a inoculação de *C. siamense*. Aos 12 dias, a incidência média final na testemunha foi de 85% para *C. nymphaeae*, 37% para *C. siamense*, e 95% para *C. viniferum*. Todos os tratamentos testados reduziram a AACP<sub>inc</sub> de podridão da uva madura, causada por *C. nymphaeae* e *C. viniferum*.

Analisando a doença causada por *C. nymphaeae*, a AACP<sub>inc</sub> da testemunha foi de 424,0, destacando-se os tratamentos VB5B (*Zygoascus meyeriae*), PA1N (*T. morbirosei*), Mix (composto pelos 3 endofíticos de bagas de uva), Serenade® (*B. subtilis*) e clorotalonil, que não diferiram significativamente entre si, com AACP<sub>inc</sub> variando de 150,0 a 244,8. Na análise de sobrevivência, considerando o risco relativo para aparecimento de sintomas, além destes tratamentos, Duravel® (*B. amyloliquefaciens*) também atrasou o aparecimento de sintomas após a inoculação de *C. nymphaeae*.

Considerando a espécie *C. siamense*, nas duas repetições experimentais, a testemunha não apresentou PI dentro do período avaliado, pois a incidência foi inferior a 50%. Quanto à AACP<sub>inc</sub>, VA4L (*Clavispora asparagi*), VB5B, Mix e clorotalonil apresentaram a menor AACP<sub>inc</sub> absoluta com variação de 35,4 a 97,9, enquanto a AACP<sub>inc</sub> da testemunha foi de 177,1, contudo não houve diferença estatística entre os tratamentos. Em relação ao risco relativo para aparecimento de sintomas, considerando as duas repetições experimentais, o atraso no aparecimento de sintomas foi detectado apenas após o tratamento com o isolado VB5B.

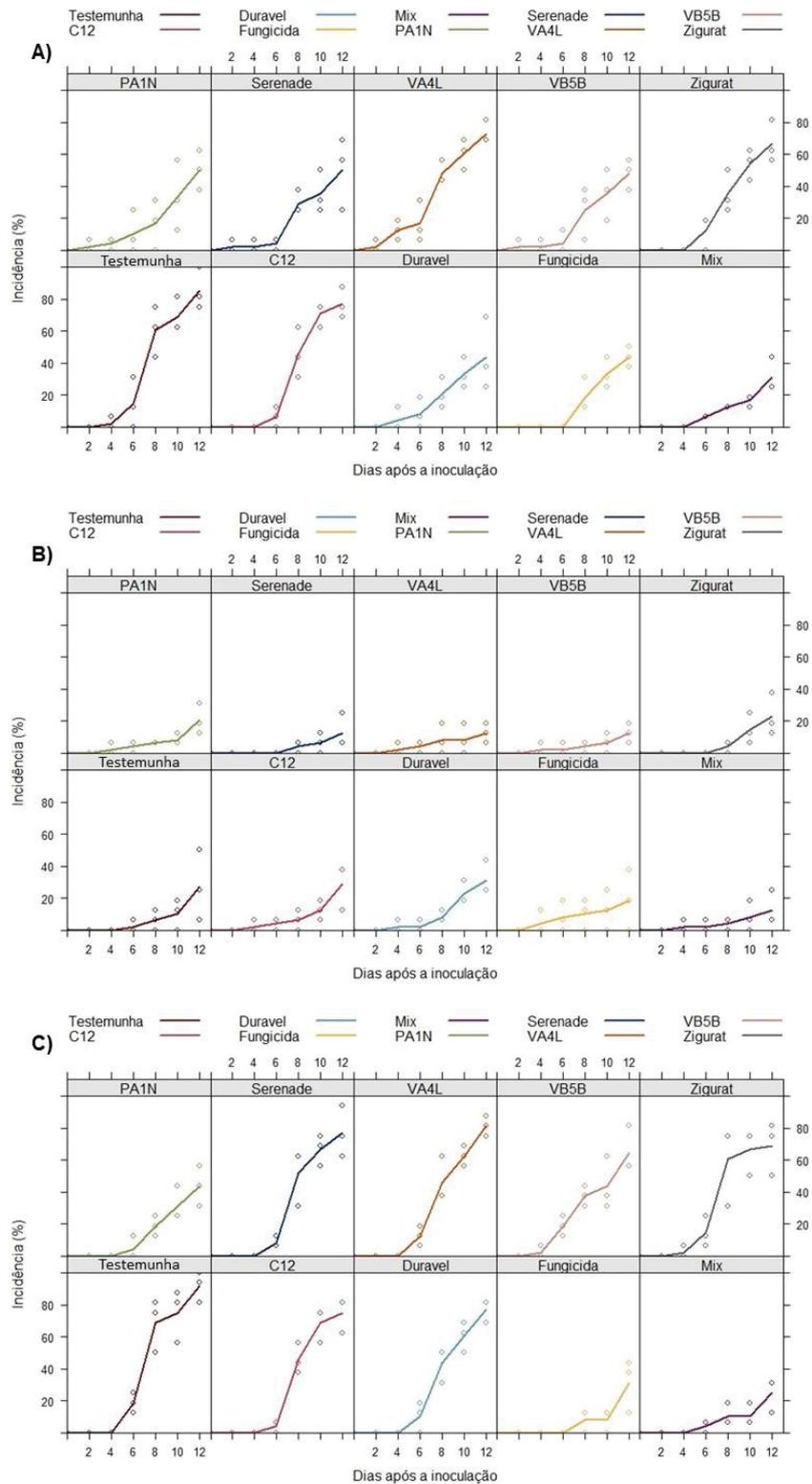
Após a inoculação de *C. viniferum*, a maior AACP<sub>inc</sub> foi encontrada na testemunha, com 463,6. Para esta espécie, os tratamentos preventivos com PA1N, Mix e o clorotalonil foram os mais eficazes na redução da doença, não diferindo entre si, com 96,9 a 194,8 de AACP<sub>inc</sub>. Quanto à análise de sobrevivência, além destes tratamentos, VB5B e Zigurat® (*B. amyloliquefaciens*), também reduziram risco para o aparecimento dos sintomas da doença.

TABELA 9 – ÁREA ABAIXO DA CURVA DO PROGRESSO DA INCIDÊNCIA (AAPD<sub>inc</sub>) DE PODRIDÃO DA UVA MADURA, CAUSADA POR *Colletotrichum* spp. APÓS TRATAMENTO PREVENTIVO COM AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

<b>Tratamento</b>	<b><i>C. nymphaeae</i></b>	<b><i>C. siamense</i></b>	<b><i>C. viniferum</i></b>
Testemunha	424,0 aA	120,8 nsB	463,6 aA
C12	353,1 bA	114,6 B	277,1 bA
VA4L	338,5 bA	78,1 B	349,0 bA
VB5B	212,5 cB	51,0 C	316,7 bA
PA1N	204,2 cA	111,5 A	194,8 cA
Mix	164,6 cA	62,5 A	129,2 cA
Duravel®	280,2 bA	119,8 B	306,3 bA
Zigurat®	335,4 bA	156,3 B	321,9 bA
Serenade®	244,8 cB	84,4 C	334,4 bA
Previnil®	150,0 cA	62,5 A	96,9 cA

Fonte: A autora (2024). Médias seguidas da mesma letra minúscula nos tratamentos e maiúscula quanto a espécie, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott Knott, ao nível de 5% de significância. ns – não significativo de acordo com o teste F.

FIGURA 3 –CURVA DO PROGRESSO DE INCIDÊNCIA DE PODRIDÃO DA UVA MADURA, CAUSADA POR TRÊS ESPÉCIES DE *Colletotrichum* APÓS TRATAMENTO PREVENTIVO COM AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO



Fonte: A autora (2024). Os gráficos incluem as duas repetições experimentais de cada espécie. A) *C. nymphaeae*; B) *C. siamense*; C) *C. viniferum*.

O período de incubação, quando 50% das bagas apresentaram sintomas da doença após a inoculação do patógeno, está disponível na Tabela 10. Esta variável é importante para estimar tempo de prateleira que o fruto fica sem sintoma considerando infecções em pré ou pós-colheita. O período de incubação não determinado (ND) indica que a doença não atingiu 50% dos frutos avaliados dentro do período de avaliação.

Para *C. nymphaeae* e *C. viniferum*, o período de incubação nos frutos avaliados foi de 8 dias, enquanto alguns isolados endofíticos e também produtos comerciais atrasaram o aparecimento de sintomas para até 12 dias. Para *C. siamense*, pouco efeito foi observado devido à menor ocorrência de doença. Não foi possível determinar o período de incubação da doença causada por essa espécie.

TABELA 10 – PERÍODO DE INCUBAÇÃO (PI) DE PODRIDÃO DA UVA MADURA, CAUSADA POR TRÊS ESPÉCIES DE *Colletotrichum* APÓS TRATAMENTO PREVENTIVO COM AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

<b>Experimento 1</b>	<u><i>C. nymphaeae</i></u>	<u><i>C. siamense</i></u>	<u><i>C. viniferum</i></u>
Testemunha	8	ND	8
C12	10	ND	10
VA4L	12	ND	12
VB5B	10	ND	10
PA1N	12	ND	10
Mix	ND	ND	ND
Duravel®	12	12	10
Zigurat®	10	ND	8
Serenade®	ND	ND	10
Previni®	ND	ND	ND
<b>Experimento 2</b>	<u><i>C. nymphaeae</i></u>	<u><i>C. siamense</i></u>	<u><i>C. viniferum</i></u>
Testemunha	8	ND	8
C12	8	ND	8
VA4L	8	ND	8
VB5B	ND	ND	12
PA1N	ND	ND	ND
Mix	ND	ND	ND
Duravel®	ND	ND	12
Zigurat®	10	ND	8
Serenade®	12	ND	8
Previni®	ND	ND	12

Fonte: A autora (2024). O PI foi determinado quando 50% das bagas avaliadas apresentaram sintomas da doença. ND – não determinado até os 12 dias.

TABELA 11 – ESTIMATIVA DE RISCO RELATIVO PARA A EXPRESSÃO DE SINTOMAS DE PODRIDÃO DA UVA MADURA, CAUSADA POR TRÊS ESPÉCIES DE *Colletotrichum*, ESTIMADAS PELO MODELO SEMI-PARAMÉTRICO DE COX, SEGUIDAS DOS INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 95%, APÓS TRATAMENTO PREVENTIVO COM AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO.

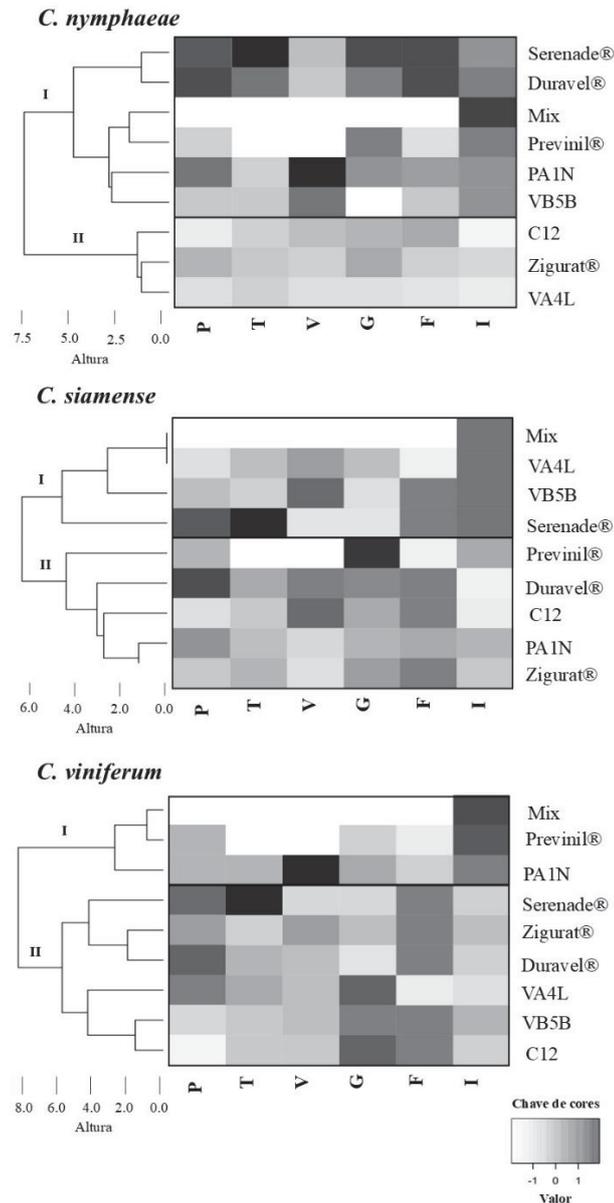
Tratamento	Experimento 1			Experimento 2		
	Risco relativo	IC 95%		Risco relativo	IC 95%	
		LI	LS		LI	LS
<i>C. nymphaeae</i>						
Testemunha	-	-	-	-	-	-
Prevenil®	0,37*	0,216	0,617	0,19*	0,111	0,326
C12	0,78 <sup>ns</sup>	0,498	1,217	0,75 <sup>ns</sup>	0,486	1,161
PA1N	0,41*	0,246	0,682	0,28*	0,168	0,460
VA4L	0,41*	0,245	0,689	0,68 <sup>ns</sup>	0,443	1,055
VB5B	0,38*	0,225	0,641	0,29*	0,173	0,473
Mix	0,33*	0,189	0,555	0,22*	0,127	0,369
Duravel®	0,58*	0,361	0,931	0,49*	0,312	0,797
Zigurat®	0,86 <sup>ns</sup>	0,552	1,343	0,61 <sup>ns</sup>	0,391	0,959
Serenade®	0,32*	0,184	0,543	0,45*	0,285	0,723
<i>C. siamense</i>						
Testemunha	-	-	-	-	-	-
Prevenil®	0,13*	0,043	0,361	0,82 <sup>ns</sup>	0,350	1,879
C12	0,69 <sup>ns</sup>	0,375	1,273	0,81 <sup>ns</sup>	0,351	1,885
PA1N	0,79 <sup>ns</sup>	0,438	1,442	1,09 <sup>ns</sup>	0,495	2,379
VA4L	0,60 <sup>ns</sup>	0,313	1,146	0,15*	0,033	0,663
VB5B	0,37*	0,182	0,758	0,30*	0,098	0,943
Mix	0,37*	0,184	0,771	0,73 <sup>ns</sup>	0,305	1,719
Duravel®	1,22 <sup>ns</sup>	0,697	2,125	0,23*	0,064	0,801
Zigurat®	0,82 <sup>ns</sup>	0,450	1,504	1,55 <sup>ns</sup>	0,740	3,247
Serenade®	0,79 <sup>ns</sup>	0,432	1,445	0,31*	0,099	0,961
<i>C. viniferum</i>						
Testemunha	-	-	-	-	-	-
Prevenil®	0,04*	0,015	0,093	0,27*	0,164	0,438
C12	0,25*	0,153	0,405	0,65*	0,409	0,987
PA1N	0,51*	0,332	0,784	0,13*	0,071	0,238
VA4L	0,41*	0,261	0,634	0,88	0,580	1,334
VB5B	0,62*	0,403	0,951	0,33*	0,206	0,541
Mix	0,24*	0,146	0,395	0,09*	0,045	0,178
Duravel®	0,67 <sup>ns</sup>	0,440	1,031	0,38*	0,237	0,598
Zigurat®	0,32*	0,199	0,515	0,62*	0,399	0,956
Serenade®	0,42*	0,270	0,653	0,77 <sup>ns</sup>	0,502	1,188

Fonte: A autora (2024). - Não se aplica. LI e LS correspondem aos limites inferior e superior do intervalo de confiança para o risco relativo. IC – Intervalo de confiança de 95%. ns – não significativo. Risco relativo marcado com \* foi significativo a, pelo menos, 5% de significância.

No intuito de resumir os resultados encontrados e agrupar os efeitos dos agentes de controle biológico de acordo com sua eficácia no controle tanto das estruturas infectivas de cada uma das espécies de *Colletotrichum* spp. quanto no controle da podridão da uva madura causada por essas espécies, foi realizada análise de componenetes principais dos resultados, conforme Figura 4. Nesta análise, apenas a média das duas repetições experimentais dos isolados sensíveis foi considerada. Para a espécie *C. nymphaeae*, considerando todos os ensaios realizados os destaques foram Serenade®, Duravel®, Mix, Previnil®, PA1N e VB5B, que

formaram um clado. Quanto à *C. siamense*, Mix, VA4L, VB5B e Serenade® tiveram destaque. Por fim, *C. viniferum* foi controlado melhor pelo Mix, Previnil® e PA1N.

FIGURA 4 – MAPA DE CALOR E DENDROGRAMA DE AGRUPAMENTO REPRESENTANDO AS SEMELHANÇAS RELATIVAS ENTRE NOVE TRATAMENTOS COM BASE EM SEIS VARIÁVEIS CONTÍNUAS EM ESCALA RELACIONADAS À INIBIÇÃO DO PATÓGENO.



Fonte: A autora (2024). A altura representa a distância euclidiana entre os grupos. O mapa de calor inclui uma barra de gradiente no canto superior esquerdo, indicando valores variáveis após a transformação da pontuação Z, variando de cinza escuro (valores mais altos) a branco (valores mais baixos). As variáveis são: P – Inibição (%) do crescimento micelial em cultivo pareado; T – Inibição do crescimento micelial após contato com metabólitos termostáveis; V – Inibição do crescimento micelial após contato com compostos voláteis; G – Inibição da germinação de conídios após 12 horas em contato com antagonistas; F – Inibição da formação de colônias para verificar a viabilidade dos conídios após contato com os agentes de controle biológico; e I – Redução da Incidência (%), aos 12 dias após inoculação de *Colletotrichum* spp., de podridão da uva madura através do tratamento preventivo de bagas de uva com agentes de controle biológico. O Mix foi testado apenas quanto à influência sobre a doença. Previnil® não foi testado nos testes de produção de compostos voláteis e termostáveis.

## 4 DISCUSSÃO

Os agentes de controle biológico (ABCs) endofíticos de bagas de uva e os produtos comerciais à base de *Bacillus* foram promissores no controle das estruturas infectivas de três espécies de *Colletotrichum* e alguns foram eficientes no controle da podridão da uva madura em experimentos realizados com bagas da cv. ‘Thompson’. Este é o primeiro estudo que relata a redução de podridão da uva madura pelas espécies antagonistas *C. asparagi*, *Z. meyeriae* e *T. morbirosei*. Observou-se variação de modos de ação dos ABCs indicando potencial para uso combinado dos agentes. O efeito dos ABCs variou entre as espécies de *Colletotrichum* estudadas, comprovando a importância de se conhecer espécies preponderantes numa área para recomendação de controle.

Dentre os produtos comerciais, Duravel® e Serenade® foram os tratamentos mais eficazes na inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. Serenade® produziu metabólitos termoestáveis capazes de inibir o crescimento dos isolados patogênicos e Duravel® afetou a viabilidade dos conídios, inibindo a formação de colônias dos patógenos. Os isolados endofíticos de bagas de uva afetaram as estruturas infectivas de *Colletotrichum* com variações de acordo com a espécie. Todos os tratamentos com ABCs reduziram a AACP<sub>inc</sub> de podridão da uva madura, causada pelas espécies *C. nymphaeae* e *C. viniferum*. O Mix de isolados endofíticos (VA4L, VB5B e PA1N) foi equivalente ao fungicida clorotalonil no controle da podridão da uva madura, sugerindo um efeito sinérgico entre os microrganismos envolvidos.

Os biológicos formulados têm a função principal de manter o ingrediente ativo vivo, facilitando armazenamento, transporte, aplicação e prolongando o efeito residual, o que aumenta a eficácia do controle, pois além do ativo biológico existem ingredientes inertes adicionados. Os ingredientes inertes podem aumentar a estabilidade dos agentes biológicos (Teixidó *et al.*, 2022) o que daria uma vantagem na comparação entre produtos comerciais e agentes prospectados. A formulação representa a etapa mais cara do processo de produção, podendo exceder 50% do custo final e, no geral, são segredos industriais, com informações limitadas disponíveis (Monnerat *et al.*, 2018). Por isso, é esperado que produtos comerciais, como Duravel® e Serenade® apresentem melhor controle em comparação aos isolados sem formulação. Os comerciais aqui testados são à base de *Bacillus* spp. e esse gênero é reconhecido mundialmente devido ao seu potencial de biocontrole. Um exemplo são as diferentes cepas de *Bacillus* epifíticas isoladas de videira em diferentes pomares na Índia, que foram capazes de reduzir o crescimento micelial de *C. gloesporioides* (Sawant *et al.*, 2016). Outros autores

mostraram que *B. subtilis*, isolado de casca de uva foi capaz de inibir a podridão da uva madura e também a podridão cinzenta (Furuya *et al.*, 2010).

Duravel® e Zigurat® são formulados com a mesma espécie – *B. amyloliquefaciens*, mas cepas diferentes. Duravel® apresentou a maior inibição quanto à inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. De forma semelhante, diferentes cepas de *Trichoderma longibrachiatum* tiveram diferentes percentagens de controle micelial para o patógeno *Ceratocystis* (Brito *et al.*, 2020). Outro fato relevante observado foi a diferença na inibição do crescimento micelial pelo Zigurat® entre a primeira e a segunda repetição do experimento. Uma possível explicação para essa variação pode ser o armazenamento do produto em temperatura ambiente, conforme recomendado pelo fabricante, o que pode ter influenciado sua eficácia ao longo do tempo. O intervalo de quinze dias entre as repetições experimentais pode ter sido suficiente para alterar o efeito do produto. Para estudos futuros, recomenda-se realizar a quantificação das unidades formadoras de colônias nos produtos testados, a fim de monitorar sua viabilidade ao longo do tempo.

No cultivo pareado, os isolados endofíticos de bagas de uva, apesar de diferirem da testemunha, apresentaram reduções menores que 50% no crescimento micelial do patógeno. Primeiramente, o método utilizado para avaliar o crescimento micelial não permite o contato imediato entre ABC e patógeno, então ensaios considerando a incorporação desses microrganismos biológicos no meio de cultura podem ser interessantes para avaliar as percentagens de inibição. Outro ponto, pode estar relacionado à concentração utilizada. Novos estudos com concentrações mais elevadas podem ser conduzidos para conferir se o potencial inibitório será superior. O estudo de maiores concentrações para verificar o potencial de *Bacillus* spp. sobre o crescimento micelial de *C. acutatum* foi sugerido em outra pesquisa (Moreira *et al.*, 2014). Não foram encontrados estudos comparando antagonistas em várias concentrações para espécies de *Colletotrichum*.

As interações antagônicas podem ocorrer de formas distintas. A antibiose e competição são os mecanismos mais relatados nas interações entre antagonistas e fitopatógenos. Por exemplo, cepas das leveduras *Candida tropicalis* YZ1, *C. tropicalis* YZ27 e *Saccharomyces cerevisiae* YZ7 apresentaram alto potencial de inibição de *C. musae*, agente causal da antracnose em banana, por meio da antibiose e competição (Zhimo *et al.*, 2017). Bactérias endofíticas das espécies *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* e *B. megaterium*, exibiram atividade antagônica significativa contra *C. gloeosporioides*, inibindo o crescimento micelial em pareamento de colônias produzindo voláteis antifúngicos (Haron *et al.*, 2023).

Neste estudo, Serenade® apresentou metabólitos termoestáveis que inibiram em mais de 50% o crescimento micelial das espécies de *Colletotrichum* avaliadas. Metabólitos termoestáveis produzidos por Serenade® já haviam sido relatados no biocontrole de *C. acutatum* da macieira (Moreira *et al.*, 2014). Em contraste, nas condições estudadas, os endofíticos de bagas de uva não produziram metabólitos termoestáveis e apresentaram resultados pouco promissores em relação à produção de compostos voláteis.

Em relação aos voláteis, o melhor efeito foi com isolado PA1N, mas apenas contra *C. nymphaeae*. Da mesma forma, o antagonista *Staphylococcus sciuri* foi citado produzindo compostos voláteis importantes para o biocontrole de *C. nymphaeae*, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Alijani *et al.*, 2019). Esses compostos podem induzir resistência sistêmica a *B. cinerea* em diversas espécies de plantas (Ongena *et al.*, 2005; Ongena; Jacques, 2008; Wu *et al.*, 2015) e desempenham um papel significativo no controle de doenças no solo (Fernando *et al.*, 2005) e na pós-colheita de frutos (Alijani *et al.*, 2019). No entanto, devido à sua natureza volátil, o efeito desses compostos no controle de doenças de parte aérea no campo pode ser limitado. Portanto, é crucial investigar formulações que possam preservar e potencializar a eficácia dos compostos voláteis em condições de campo.

A inibição da germinação de conídios não foi o principal mecanismo de ação dos biológicos e apenas Serenade® e clorotalonil tiveram efeito nos dois experimentos para *C. nymphaeae* e *C. siamense*, respectivamente. Embora a maioria dos isolados não tenha mostrado efeito na germinação de conídios, todos os tratamentos afetaram a viabilidade dos conídios, inibindo a formação de colônias em pelo menos uma das espécies de *Colletotrichum* avaliadas, destacando-se Duravel® que inibiu a formação de colônias de todos os isolados testados. Fenômeno semelhante foi observado, onde, mesmo com altas porcentagens de germinação de conídios, o produto inibiu a formação de colônias em 100% dos isolados de *Colletotrichum spp.* associados à macieira (Petermann *et al.*, 2022). Isto se deve provavelmente a sensibilidade do tubo germinativo dos conídios de *Colletotrichum* aos antagonistas.

Os biológicos demonstraram percentagens de controle semelhantes ao fungicida clorotalonil. Nas avaliações *in vitro*, utilizou-se a dose padrão de 50 µL.L<sup>-1</sup>, comumente aplicada a fungicidas de contato. No entanto, o efeito inibitório sobre o crescimento micelial foi baixo em todas as espécies analisadas após o tratamento com clorotalonil. Para estudos futuros, recomenda-se o uso de fungicidas que atuem diretamente sobre o crescimento micelial, visando maior eficácia no controle. Em contraste, quanto à redução de podridão da uva madura, com dose recomendada na bula, o clorotalonil foi o tratamento que apresentou as menores

AACP<sub>inc</sub> absolutas após os ensaios, independentemente da espécie de *Colletotrichum* inoculada, comprovando eficiência no controle da doença.

*C. siamense* foi a espécie menos agressiva na cv. ‘Thompson’ em comparação à *C. nymphaeae* e à *C. viniferum*. Alguns autores afirmam que espécies do complexo *C. acutatum* têm preferências pelos frutos, enquanto que as do complexo *C. gloesporioides*, preferem folhas, podendo também infectar os frutos (Dowling *et al.*, 2020). Outro ponto é que existem isolados de *C. gloesporioides* que preferem temperaturas mais altas, próximas aos 30 °C (Dowling *et al.*, 2020), enquanto que a temperatura de incubação utilizada no presente estudo foi de 25 °C. Provavelmente, a dificuldade de perceber os efeitos dos ABCs sobre a podridão da uva madura causada por *C. siamense*, foi devida à baixa incidência da doença nas bagas.

Reduções significativas na área abaixo da curva do progresso da doença, causada por *C. nymphaeae* e *C. viniferum*, foram observadas em todos os tratamentos com biológicos em comparação com a testemunha, indicando potencial para recomendação, em especial do produto Serenade® e do mix de antagonistas que não diferiram do padrão com fungicida. O Mix, composto por VA4L (*Clavispora asparagi*), VB5B (*Zygoascus meyeriae*) e PA1N (*T. morbirosei*) foi superior ao uso isolado de cada antagonista evidenciando efeito positivo entre eles. A primeira hipótese está relacionada ao fato de que esses microrganismos atuam de formas diferentes sobre o patógeno, com diferentes compostos antifúngicos, resultando na redução da doença. Outra hipótese é que eles competem entre si por espaço, o que pode aumentar a velocidade de colonização da baga, protegendo-a mais rapidamente contra a infecção pelo patógeno. Estudos microscópicos para compreender como ocorre a colonização são interessantes para avaliar essa interação. O consórcio de diferentes microrganismos foi considerado promissor no controle biológico de fitopatógenos, sendo capaz de controlar mais de uma doença em tomateiro (Minchev *et al.*, 2021).

As diferentes espécies de *Colletotrichum* spp. podem resultar em variabilidade significativa em termos de preferência por órgãos hospedeiros, agressividade, distribuição geográfica e sensibilidade a fungicidas (Dowling *et al.*, 2020). Após a análise de agrupamento para entender os efeitos dos agentes de controle biológico (ABCs) sobre todas as variáveis avaliadas, foi observado que os ABCs mais eficazes para uma determinada espécie não foram necessariamente os mais eficazes para outras. Nesse contexto, torna-se essencial conhecer as espécies de *Colletotrichum* spp. predominantes na região onde se deseja realizar o controle da doença. Devido à variabilidade nas respostas às medidas de controle, é fundamental adaptá-las de acordo com as espécies prevalentes na área e com o clima da região. Além disso, vale ressaltar que os endofíticos ocupam um nicho ecológico único caracterizado por relações

mutualísticas com seus hospedeiros. Esse nicho é crucial para a saúde das plantas e oferece um potencial significativo para aplicações biotecnológicas (Rabee *et al.*, 2024). Como essas relações são específicas, verificar o efeito em diferentes locais onde a uva é produzida é necessário para viabilizar a produção de novos produtos.

Com essa pesquisa, foi possível um maior entendimento das relações antagônicas entre os agentes de controle biológico e as espécies de *Colletotrichum* spp. prevalentes associadas à videira no Brasil. Futuros estudos de formulações e concentrações que assegurem a estabilidade e a qualidade dos microrganismos endofíticos como controladores biológicos são recomendados. O atraso no aparecimento de sintomas da podridão da uva madura, ocasionado pelos ABCs pode ser importante para que o avanço da doença durante a comercialização seja mais lento, reduzindo os prejuízos da doença. Recomenda-se na sequência estudar a viabilidade do uso dos ABCs no campo em diferentes momentos de aplicação. As flores são os principais órgãos que transferem a microbiota para os frutos (Olimi *et al.*, 2022), então, aplicação durante a floração pode favorecer a colonização dos antagonistas para o ambiente interno do fruto e potencializar o controle da doença em frutos durante a pré e pós-colheita, garantindo assim sucesso desses microrganismos no manejo da podridão da uva madura.

## 5 REFERÊNCIAS

ALIJANI, Z., AMINI, J., ASHENGROPH, M., & BAHRAMNEJAD, B. Antifungal activity of volatile compounds produced by *Staphylococcus sciuri* strain MarR44 and its potential for the biocontrol of *Colletotrichum nymphaeae*, causal agent strawberry anthracnose. **International Journal of Food Microbiology**, 108276. 2019.

AMORIM, L.; KUNIYUKI, H. Doenças da videira. In: KIMATI, H et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p. 639-642.

ARROYAVE-TORO, Juan José; MOSQUERA, Sandra; VILLEGAS-ESCOBAR, Valeska. Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. **Biological Control**, v. 114, p. 195-200, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.014>.

BATISTA, Diógenes da Cruz; VIEIRA, Willie Anderson dos Santos; BARBOSA, Maria Angélica Guimaraes; CÂMARA, Marcos Paz Saraiva. First report of *Colletotrichum siamense* causing grape ripe rot in Brazil. **Plant Disease**, v. 107, n. 9, p. 2881, 2023.

BECKER WF, VON JAGOW G, ANKE T, STEGLICH W. Oudemansin, strobilurin A, strobilurin B and myxothiazol: new inhibitors of the bc1 segment of the respiratory chain with an E-βmethoxyacrylate system as common structural element. **FEBS Lett** 132:329–333, 1981.

BONATERRA, A.; BADOSA, E.; DARANAS, N.; FRANCÉS, J.; ROSELLÓ, G.; MONTESINOS, E. Bactérias como agentes de controle biológico de doenças de plantas. **Microorganismos**, v. 10, n. 9, 2022. DOI: 10.3390/microorganismos10091759.

BRAR, Satinder K.; VERMA, Sr.; TYAGI, R.D.; VALERO, J.R. Avanços recentes no processamento e formulações posteriores de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis*. **Bioquímica de Processos**, v. 41, n. 2, p. 323-342, fev. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.07.015>.

BRITO, R. A. S.; CAVALCANTE, G. P.; STOCK, V. M.; COLMAN, A. A.; DOS SANTOS, D. P.; SERMARINI, R. A.; MAFFIA, L. A. *Trichoderma* species show biocontrol potential against *Ceratocystis* wilt in mango plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 158, p. 781-788, 13 ago. 2020.

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

CERESINI, P.C., SILVA, T.C., VICENTINI, S.N.C. et al. Strategies for managing fungicide resistance in the Brazilian tropical agroecosystem: Safeguarding food safety, health, and the environmental quality. **Trop. plant pathol.** 49, 36–70, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-023-00632-2>

D'ÁVILA, L. S.; FILIPPI, M. C. C. de; CAFÉ-FILHO, A. C. Fungicide resistance in *Pyricularia oryzae* populations from southern and northern Brazil and evidence of fitness costs for QoI-resistant isolates. **Crop Protection**, v. 153, p. 105887, 2022. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105887>>.

DE BARY, Anton. **Morphologie und physiologie der pilze, flechten und myxomyceten**. Engelmann, 1866.

DE MENDIBURU F. Package ‘agricolae’ - Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.3–7. 2023. <https://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/agricolae.pdf>

DEAN, R., VAN KAN, J. A., PRETORIUS, Z. A., HAMMOND-KOSACK, K. E., DI PIETRO, A., SPANU, P. D., et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Mol. Plant Pathol.** 13:414-430. 2012. DOI: <<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>>.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**. Volume 57, Issue 1, Pages 25-39, 1971.

DORIGAN, Adriano Francis *et al.* Higher fitness and competitive advantage of *Pyricularia oryzae* *Triticum* lineage resistant to QoI fungicides. **Pest Management Science**, v. 79, n. 3, p. 1053-1064, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.7144>.

DOWLING, Madeline; PERES, Natalia; VILLANI, Sara; SCHNABEL, Guido. Managing *Colletotrichum* on fruit crops: a “complex” challenge. *Plant Disease*, St. Paul, v. 104, n. 9, p. 2301-2316, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2378-FE>.

DUTRA, Pamela Suellen Salvador; CARRARO, Thiago de Aguiar; NESI, Cristiano Nunes; AMORIM, Lilian; DE MIO, Louise Larissa May. Comparative fitness of *Monilinia fructicola* isolates with multiple fungicide-resistant phenotypes. **Plant Disease**, v. 108, n. 7, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1094/PDIS-12-23-2549-RE>>.

FERNANDO, W. G. D.; HAMARATH, R.; KRISHNAMOORTHY, A. S.; SAVCHUK, S. Identification and use of potential bacterial organic volatile in biological control. *Soil Biology and Biochemistry*, v.37, p.955-964, 2005.

FURUYA, S.; MOCHIZUKI, M.; AOKI, Y.; KOBAYASHI, H. TAKAYANAGI, T.; SHIMIZU, M.; SUZUKI, S. Isolamento e caracterização de *Bacillus subtilis* KS1 para o biocontrole de doenças fúngicas da videira, *Biocontrol Science and Technology*, 2011.

GARRIDO, L. R.; SONEGO, O. R. Podridão da uva madura ou podridão de glomerella. *AGAPOMI*, edição 171, agosto de 2008.

HARON, Farah Farhanah; REWARD, Nurul Farisa; NEJIS, Aman; NORZAIMAWATI; HAMZAH, Halizah. Antagonistic potential of endophytic bacteria from shallot against *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose disease. *Agrotech–Food Science, Technology and Environment*, v. 2, n. 2, p. 01-06, 2023. DOI: <https://doi.org/10.53797/agrotech.v2i2.1.2023>.

ISHII, H. Stability of resistance. In: ISHII, H.; HOLLOMON, D. W. (Eds.). *Fungicide resistance in plant pathogens: principles and a guide to practical management*. Tokyo: Springer, 2015. p. 35-48.

JOLLIFFE, I. T. *Principal Component Analysis*. 2nd ed. **Springer Verlag**, New York. 2002.

KASSAMBARA, A., MUNDT, F. factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.5. 2017.

KUPPER, Katia C.; GIMENES-FERNANDES, Nelson; GOES, Antonio de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000300005>.

LÊ, S., JOSSE, J., HUSSON, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J.Stat. Soft.* 25:1-18. 2008.

LU, Hui-Zhong; JIA, Jian-Hua; WANG, Qi-Ming; BAI, Feng-Yan. *Candida asparagi* sp. nov., *Candida diospyri* sp. nov. e *Candida qinlingensis* sp. nov., novas espécies de leveduras anamórficas, ascomicéticas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 4, p. 1639-1643, 01 jul. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.03055-0>.

MINCHEV, Z. et al. Consórcios Microbianos para Biocontrole Efetivo de Doenças Raiz e Foliar em Tomate. *Frente. Plant Sci.*, 05 de novembro de 2021

MONNERAT SOLON DE PONTES, Rose Gomes; PRAÇA, Lilian Botelho; SILVA, Ester Yoshie Yosino da; MONTALVÃO, Sandro Coelho Linhares; MARTINS, Erica Soares;

SOARES, Carlos Marcelo Silveira; QUEIROZ, Paulo Roberto. Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* para uso na agricultura. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2018. 34 p. il. color. (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 0102-0110; 360).

MOREIRA, R. R.; NESI, C. N.; MAY-DE-MIO, L. L. *Bacillus* spp. e *Pseudomonas putida* como inibidores do grupo *Colletotrichum acutatum* e potencial no controle da mancha foliar de *Glomerella*. **Biological Control**, v. 72, p. 30-37, 2014.

NASERI, B.; SABETI, P. Analysis of the effects of climate, host resistance, maturity and sowing date on wheat stem rust epidemics. **J. Plant Pathol.** 103:197-205. 2021.

OLIMI, E., KUSSTATSCHER, P., WICAKSONO, W. A. et al. Insights sobre a montagem do microbioma durante diferentes estágios de crescimento e armazenamento de plantas de morango. **Microbioma Ambiental** 17, 21. 2022.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology** 16, 115–125. 2008.

ONGENA, M.; JACQUES, P.; TOURE, Y.; DESTAIN, J.; JABRANE, A.; THONART, P. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 69, 29–38. 2005.

PETERMANN, Débora. Uso de bactérias do gênero *Bacillus* spp. no controle biológico de *Colletotrichum* spp., agente causal da podridão amarga na macieira. 2022. 1 recurso online: PDF. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), Curitiba, 2022. Orientadora: Profª Drª Louise Larissa May De Mio. Coorientadora: Drª Rafaele Regina Moreira.

RABBEE, Muhammad Fazle *et al.* Endophyte mediated biocontrol mechanisms of phytopathogens in agriculture. **Research in Microbiology**, Available online 9 July 2024. In Press, Corrected Proof. DOI:< <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2024.104229>>.

ROLLEMBERG, C. L. Mancha das folhas da macieira: caracterização fisiológica dos agentes causais, controle biológico com bactérias residentes de filoplano e sensibilidade dos antagonistas a fungicidas e inseticidas. 124 f. **Dissertação** (Mestrado em produção vegetal) - Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, 2008.

ROMEIRO, Reginaldo da Silva. Métodos em Bacteriologia de Plantas. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2001. 279 p. ISBN 9788572690973.

RUSSI, Alessandra; GRANADA, Camille Eichelberger; SCHWAMBACH, Joséli. Supressão de *Colletotrichum* spp. em bagas de uva, folhas de videira e plantas usando endósporos de *Bacillus velezensis* S26. **Ciência Horticulturae**, v. 326, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112696>.

SAWANT, S. I.; WADKAR, P. N.; RAJGURU, R. Y.; MHASKE, N. H.; SALUNKHE V. P.; SAWANT, S. D.; UPADHYAY, A. Potencial de biocontrole de duas novas cepas de *Bacillus* associadas à videira para o manejo da doença da antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, *Biocontrol Science and Technology*, 26:7, 964-979, 2016.

- STEINER, D. *et al.* Asymptomatic grapevine leaves harbor inoculum for *Colletotrichum* spp. Resumo apresentado no: **13th International Epidemiology Workshop**, Foz do Iguaçu, PR, 2024. p. 74.
- TAO, Huaping; FANG, Chanlin; XIAO, Yingping; JIN, Yuanxiang. The toxicity and health risk of chlorothalonil to non-target animals and humans: A systematic review. *Chemosphere*, v. 358, p. 142241, 2024.
- TEIXIDÓ, Neus; USALL, Josep; TORRES, Rosario. Insight sobre o desenvolvimento bem-sucedido de agentes de biocontrole: produção, formulação, embalagem e prazo de validade como aspectos-chave. **Horticulturae**, v. 8, n. 4, p. 305, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/horticulturae8040305>.
- THERNEAU T. A Package for Survival Analysis in S. R package version 2:36-12. Disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=survival>. 2012.
- WANG, Weizhen et al. Increasing the tolerance of *Trichoderma harzianum* T-22 to DMI fungicides enables the combined utilization of biological and chemical control strategies against plant diseases. **Biological Control**, v. 192, 105479, maio 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2024.105479>.
- WU, L.; WU, H.J.; QIAO, J.; GAO, X.; BORRIS, R. Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. *Frontiers in Microbiology* 6, 1395. 2015.
- ZHIMO, V. Yeka; DILIP, Darsana; STEN, Jessica; RAVAT, Vikas Kumar; BHUTIA, Dawa Dolma; PANJA, Birendranath; SAHA, Jayanta. Antagonistic yeasts for biocontrol of the banana postharvest anthracnose pathogen *Colletotrichum musae*. *Journal of Phytopathology*, Hoboken, v. 165, n. 1, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/jph.12533>.

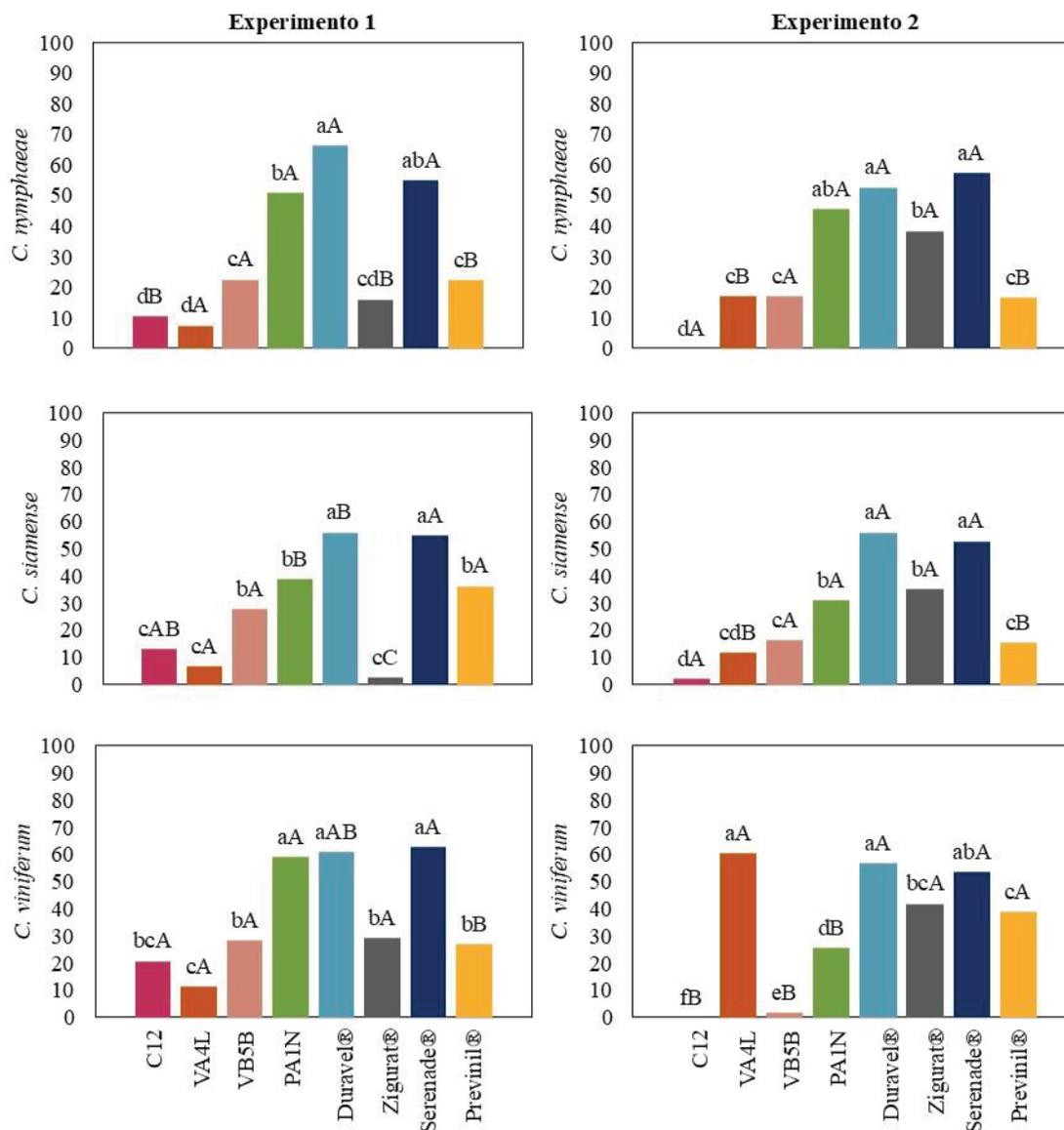
## ANEXOS

I – ISOLADOS UTILIZADOS PARA ANÁLISE FILOGENÉTICA DE *Colletotrichum acutatum*.

Espécie	Isolado	ITS*	TUB2*	GAPDH*
<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	CBS 119294	JQ948205	JQ949856	JQ948535
<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	CBS 125973	JQ948232	JQ949883	JQ948562
<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	CBS 115408	JQ948212	JQ949863	JQ948542
<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	CBS 125961	MH863842	JQ949900	JQ948579
<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	CBS 129945	MH865694	JQ949852	JQ948531
<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	CBS 51578 <sup>T</sup>	NR_111736	JQ949848	JQ948527
<i>Colletotrichum chrysanthemi</i>	CBS 126518	MH864141	JQ949922	JQ948601
<i>Colletotrichum scovillei</i>	CBS 126529 <sup>T</sup>	NR_111737	MH618321	JQ948597
<i>Colletotrichum guajavae</i>	IMI 350839 <sup>T</sup>	NR_111738	JQ949921	JQ948600
<i>Colletotrichum cosmi</i>	CBS 85373 <sup>T</sup>	NR_111739	JQ949925	JQ948604
<i>Colletotrichum walleri</i>	CBS 125472 <sup>T</sup>	NR_111740	JQ949926	JQ948605
<i>Colletotrichum brisbanense</i>	CBS 29267 <sup>T</sup>	NR_111746	JQ949942	JQ948621
<i>Colletotrichum sloanei</i>	IMI 364297 <sup>T</sup>	NR_111743	JQ949938	JQ948617
<i>Colletotrichum chrysanthemi</i>	IMI 364540	JQ948273	JQ949924	JQ948603
<i>Colletotrichum laticiphilum</i>	CBS 112989 <sup>T</sup>	NR_111745	JQ949940	JQ948619
<i>Colletotrichum indonesiense</i>	CBS 127551 <sup>T</sup>	NR_111744	JQ949939	JQ948618
<i>Colletotrichum paxtonii</i>	IMI 165753 <sup>T</sup>	NR_111742	JQ949936	JQ948615
<i>Colletotrichum simmondsii</i>	CBS 122122 <sup>T</sup>	NR_111741	JQ949927	JQ948606
<i>Colletotrichum cf melonis</i>	CBS 134730	KC204997	KC205065	KC205031
<i>Colletotrichum limeticola</i>	CBS 11414	NR_111733	JQ949844	JQ948523
<i>Colletotrichum costaricense</i>	CBS 33075	NR_111731	JQ949831	JQ948510
<i>Colletotrichum melonis</i>	CBS159 84 <sup>T</sup>	NR_111734	JQ949845	JQ948524
<i>Colletotrichum melonis</i>	COL20	KC204986	KC205054	KC205020
<i>Colletotrichum melonis</i>	LEMID18 11	MK209080	MK216323	MK216322
<i>Colletotrichum tamarilloi</i>	CBS 129814 <sup>T</sup>	NR_111732	JQ949835	JQ948514
<i>Colletotrichum lupini</i>	CBS 109225	MH862821	JQ949806	JQ948485
<i>Colletotrichum cuscudae</i>	IMI 304802 <sup>T</sup>	NR_111735	JQ949846	JQ948525
<i>Colletotrichum acutatum</i>	CBS 112996 <sup>T</sup>	NR_144794	JQ005860	JQ948677
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	CBS 128517 <sup>T</sup>	NR_111747	JQ949943	JQ948622
<i>Colletotrichum acerbum</i>	CBS 128530 <sup>T</sup>	NR_111754	JQ950110	JQ948790
<i>Colletotrichum rhombiforme</i>	CBS 129953 <sup>T</sup>	NR_111753	JQ950108	JQ948788
<i>Colletotrichum kinghornii</i>	CBS 19835 <sup>T</sup>	NR_111751	JQ950105	JQ948785
<i>Colletotrichum phormii</i>	CBS 118194 <sup>T</sup>	NR_111750	JQ950097	JQ948777
<i>Colletotrichum australe</i>	CBS 116478 <sup>T</sup>	NR_111752	JQ950106	JQ948786
<i>Colletotrichum salicis</i>	CBS 60794	JQ948460	JQ950111	JQ948791
<i>Colletotrichum godetiae</i>	CBS 125972	JQ948416	JQ950067	JQ948747
<i>Colletotrichum johnstonii</i>	CBS 128532 <sup>T</sup>	NG_069988	JQ950095	JQ948775
<i>Colletotrichum godetiae</i>	CBS 13344 <sup>T</sup>	NR_103691	JQ950053	JQ948733
<i>Colletotrichum orchidophilum</i>	CBS 63280 <sup>T</sup>	NR_111729	JQ949802	JQ948481
<i>Colletotrichum pyricola</i>	CBS 128531 <sup>T</sup>	NR_111749	JQ950096	JQ948776
<i>C. pseudoacutatum</i> **	CBS 43677 <sup>T</sup>	NR_111756	JQ950131	JQ948811

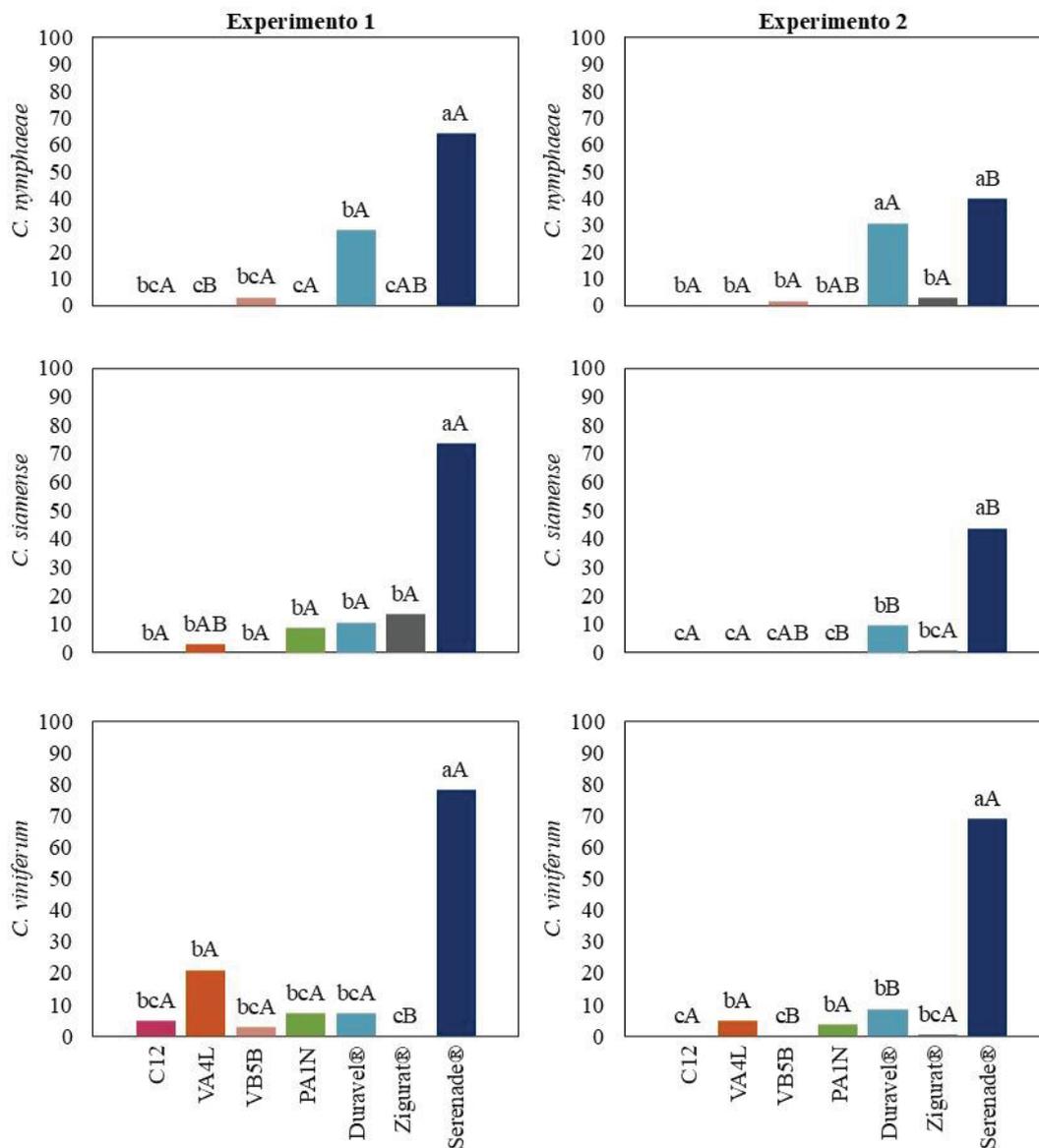
\*Número de acesso no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). \*\*Isolado utilizado como outgroup.

II – INIBIÇÃO (%) DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletotrichum* spp. APÓS CULTIVO PAREADO COM AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO



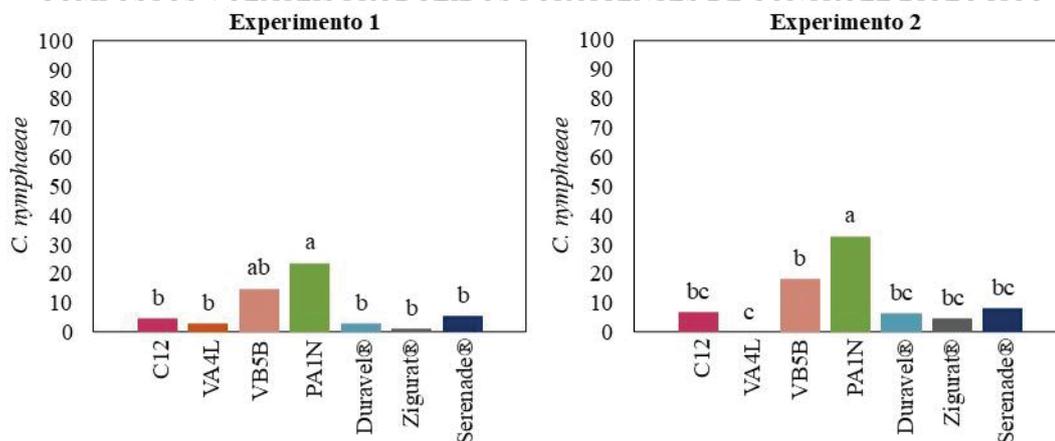
Fonte: A autora (2024). Médias seguidas da mesma letra minúscula nos tratamentos e maiúscula quanto a espécie, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de significância.

III – INIBIÇÃO (%) DO CRESCIMENTO MICIAL DE *Colletotrichum* spp. APÓS CULTIVO EM MEIO DE CULTURA CONTENDO METABÓLITOS TERMOESTÁVEIS DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO



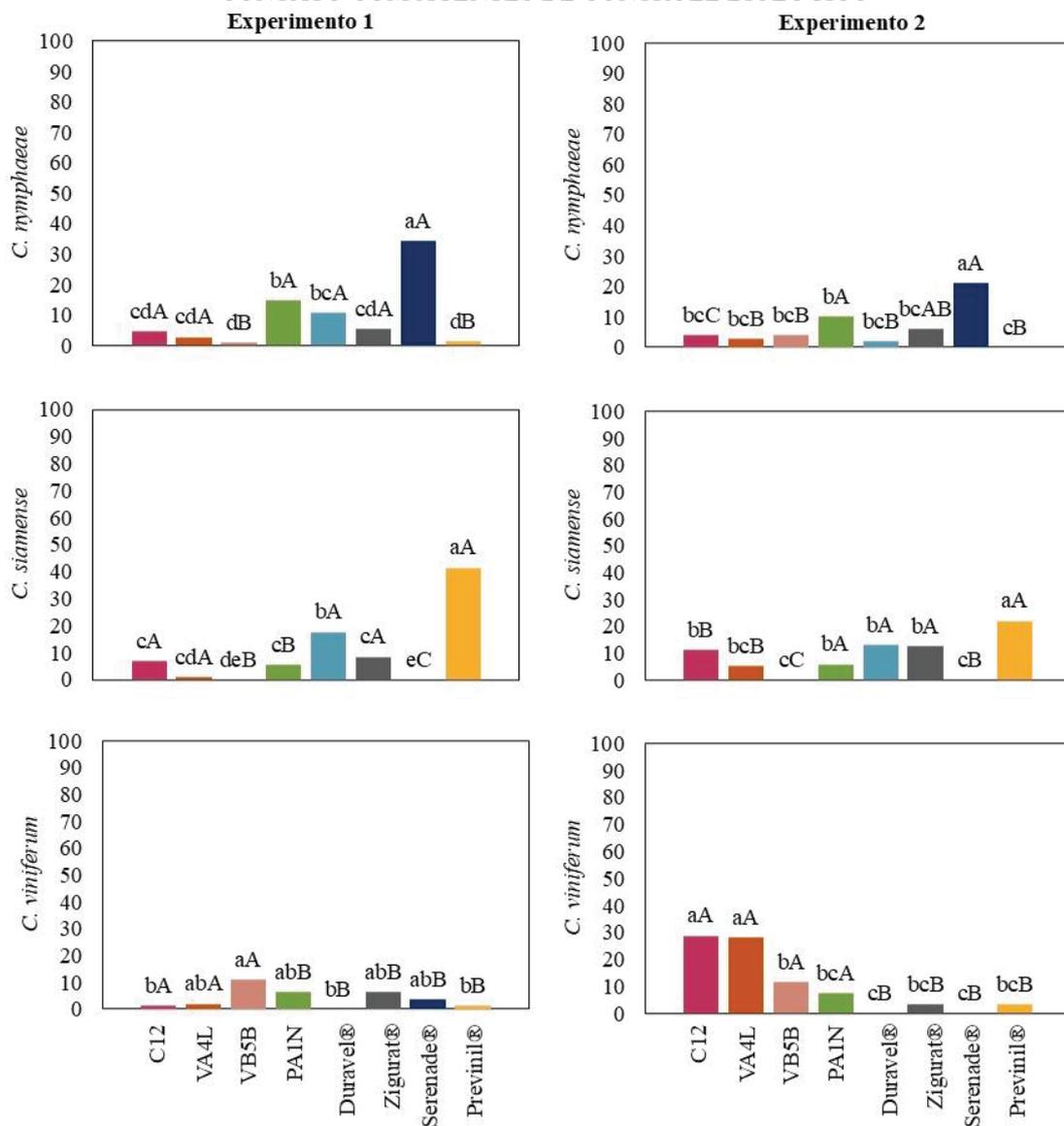
Fonte: A autora (2024). Médias seguidas da mesma letra minúscula nos tratamentos e maiúscula quanto a espécie, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de significância.

IV– INIBIÇÃO (%) DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletotrichum* spp. SOB A AÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO



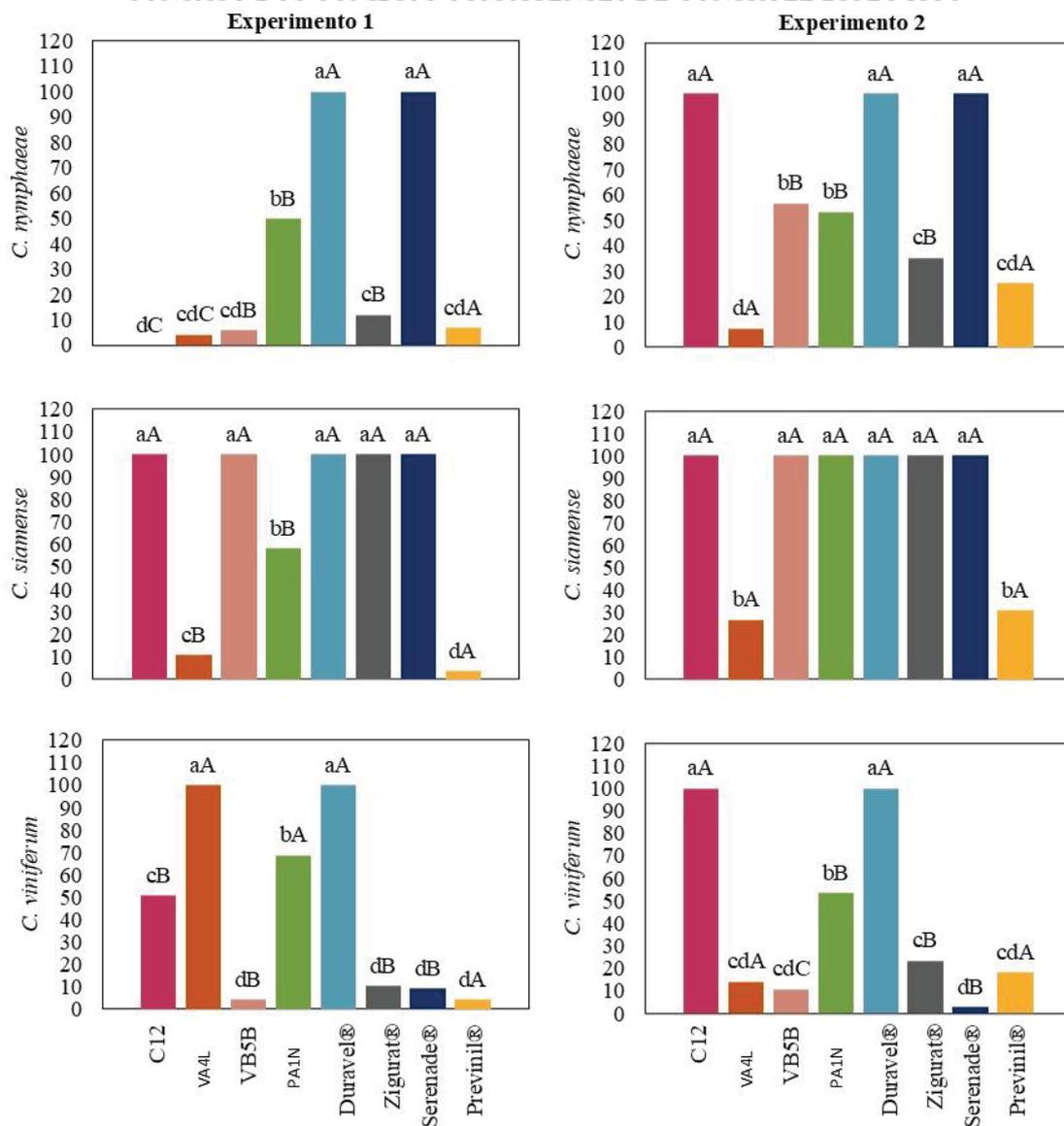
Fonte: A autora (2024). Médias seguidas da mesma letra minúscula nos tratamentos e maiúscula quanto a espécie, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de significância. Tratamentos só diferiram significativamente após contato com *C. nymphaeae*, por isso outras espécies não são mostradas.

V – INIBIÇÃO (%) DA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum* spp. APÓS 12 HORAS EM CONTATO COM AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO



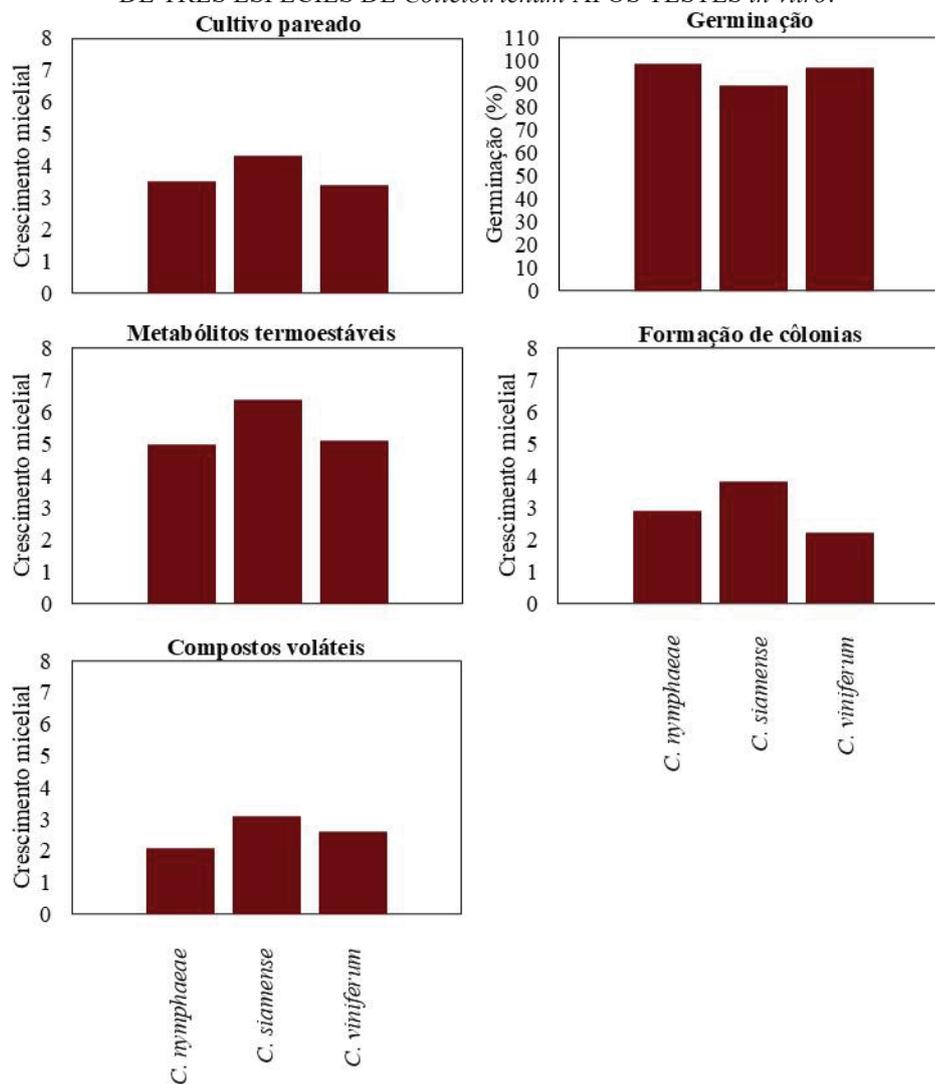
Fonte: A autora (2024). Médias seguidas da mesma letra minúscula nos tratamentos e maiúscula quanto a espécie, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de significância.

VI – INIBIÇÃO (%) DA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE *Colletotrichum* spp. APÓS 12 HORAS DE CONTATO DOS CONÍDIOS COM AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO



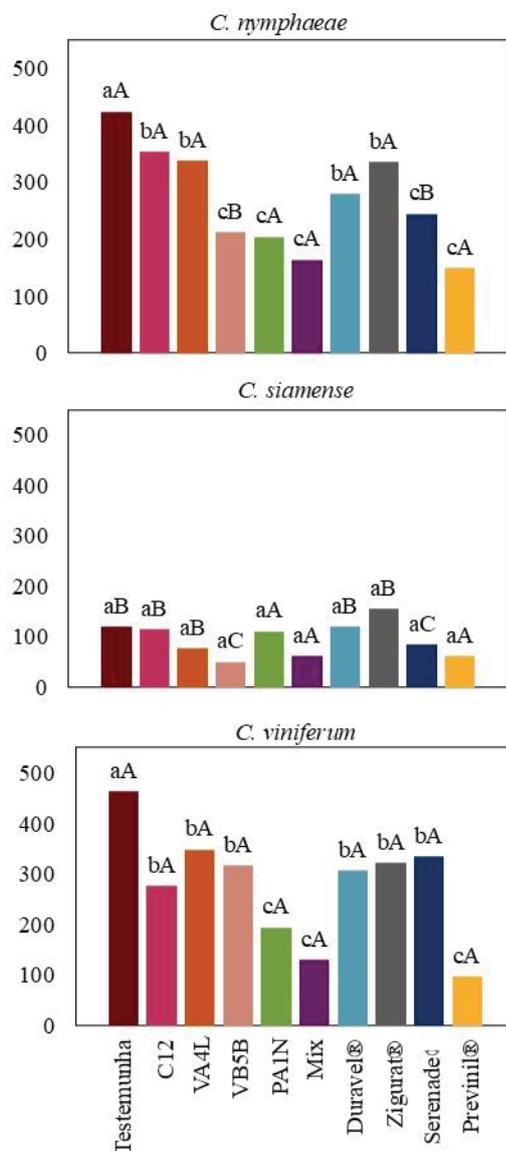
Fonte: A autora (2024). Médias seguidas da mesma letra minúscula nos tratamentos e maiúscula quanto a espécie, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de significância.

VII – MÁXIMO CRESCIMENTO DA CÔLONIA (cm) OU MÁXIMA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS (%)  
DE TRÊS ESPÉCIES DE *Colletotrichum* APÓS TESTES *in vitro*.



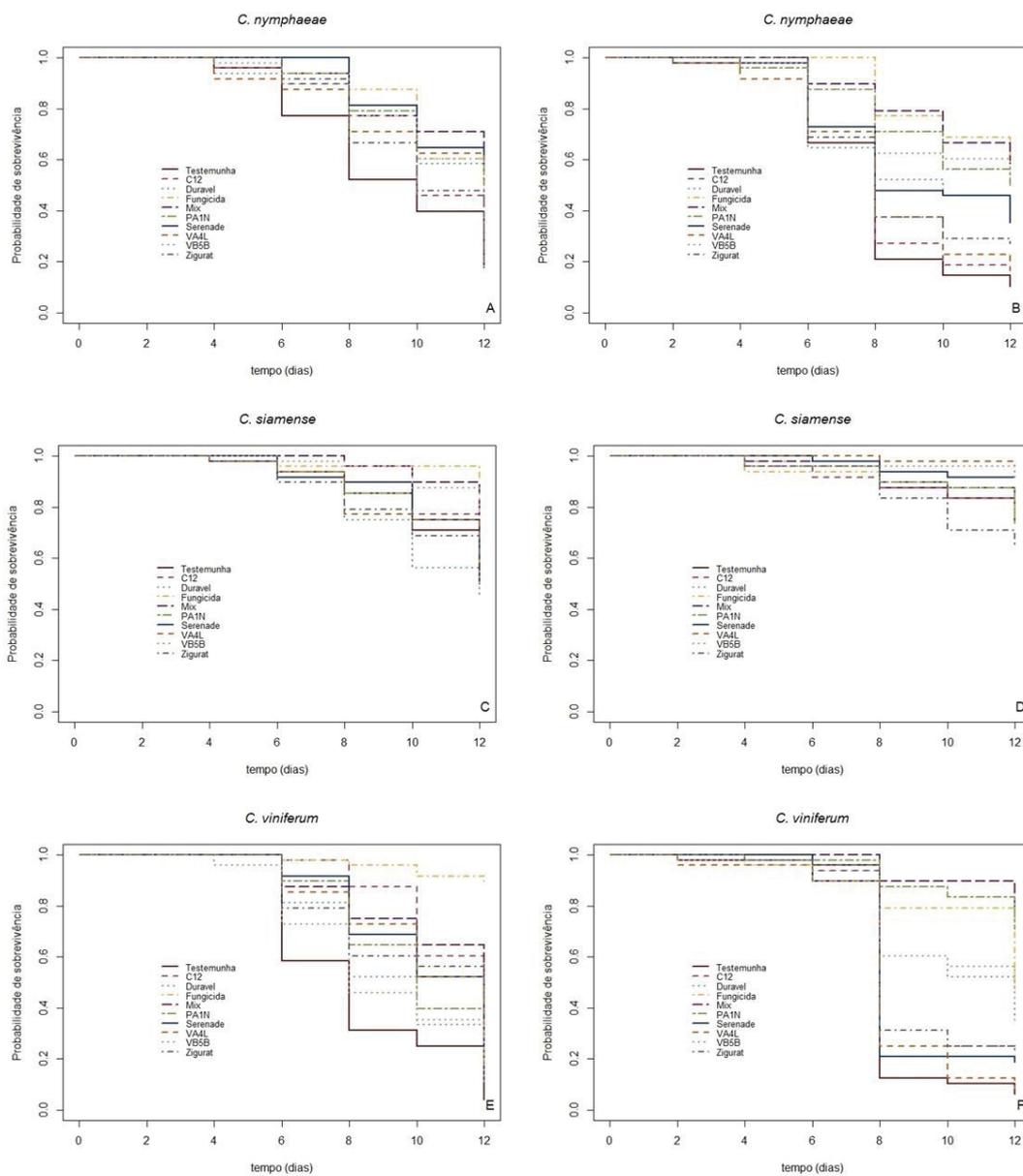
Fonte: A autora (2024). Os gráficos representam a média das duas repetições experimentais.

VIII – ÁREA ABAIXO DA CURVA DO PROGRESSO DE INCIDÊNCIA DE PODRIDÃO DA UVA MADURA, CAUSADA POR TRÊS ESPÉCIES DE *Colletotrichum* APÓS TRATAMENTO PREVENTIVO COM AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO



Fonte: A autora (2024). Os gráficos incluem as duas repetições experimentais de cada espécie. Médias seguidas da mesma letra minúscula nos tratamentos e maiúscula quanto a espécie, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott Knott, ao nível de 5% de significância.

IX - ESTIMATIVA DAS CURVAS DE KAPLAN-MEIER PELA ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA, DESCRIVENDO A PROBABILIDADE AO LONGO DO TEMPO DA BAGA SE MANTER SEM A OCORRÊNCIA DOS SINTOMAS DE PODRIDÃO DA UVA MADURA APÓS INOCULAÇÃO DE (A) E (B) *C. nymphaeae*, 1ª E 2ª REPETIÇÃO EXPERIMENTAL; DE (C) E (D) *C. siamense* 1ª e 2ª repetição experimental; E DE (E) E (F) *C. viniferum*, 1ª e 2ª REPETIÇÃO EXPERIMENTAL, NA CULTIVAR 'THOMPSON' APÓS DIFERENTES TRATAMENTOS COM AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO.



Fonte: A autora (2024).