



VANESSA FORESTI PEREIRA

**FOSFITOS NO MANEJO DO MÍLDIO
(*Plasmopara viticola*) e Indução de resistência em
videira cv. *Merlot Noir*.**

LAVRAS – MG

2013

VANESSA FORESTI PEREIRA

**FOSFITOS NO MANEJO DO MÍLDIO (*Plasmopara viticola*) e Indução de
resistência em videira cv. *Merlot Noir*.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de Doutor.

Orientador

PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende

Coorientador

PhD. Murillo Albuquerque Regina

LAVRAS

MINAS GERAIS-BRASIL

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Pereira, Vanessa Foresti.

Fosfitos no manejo do míldio (*Plasmopara viticola*) e indução de resistência em videira cv. *Merlot noir* / Vanessa Foresti Pereira. – Lavras : UFLA, 2013.

136 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.

Bibliografia.

1. Fosfitos de potássio. 2. qRT-PCR. 3. Fenilpropanóides. 4. Controle alternativo. 5. *Vitis vinifera*. 6. Míldio da videira. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.824

VANESSA FORESTI PEREIRA

**FOSFITOS NO MANEJO DO MÍLDIO (*Plasmopara viticola*) e Indução de
resistência em videira cv. *Merlot Noir*.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 20 de setembro de 2013.

Dr. Murillo de Albuquerque Regina

Epamig/Caldas

Dra. Renata Vieira da Mota

Epamig/Caldas

Prof. Dr. Mario Sobral de Abreu

UFLA

Dra. Sandra Mathioni

Pesquisadora Visitante INCT-Café/UFLA

Prof. Dr. PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende
(Orientador)

LAVRAS/MG

2013

*Aos meus pais, Virgínia e José Fidélis, pelo grande exemplo de vida e incentivo
em todos os momentos.*

*Aos meus filhotes, Puka e Toy, por estarem sempre ao meu lado, a minha espera
e pelo amor incondicional.*

Dedico!

Aos meus irmãos, Anderson e Viviane, pela amizade e apoio constante.

*Ao meu noivo, André Guilherme, pelo carinho, compreensão, apoio e
companheirismo.*

Ofereço!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, proteção e força, tornando meus caminhos mais tranquilos para alcançar meus objetivos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao professor Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende, pela oportunidade, orientação, e confiança na realização do presente trabalho.

Ao Dr. Murillo de Albuquerque Regina e Dra. Renata Vieira da Mota, pela orientação, apoio, auxílio nos experimentos e pela participação na banca.

Aos participantes da banca, Dr. Mário Sobral de Abreu e Dra. Sandra Mathioni, pelas valiosas sugestões e contribuições.

Aos demais professores do Departamento de Fitopatologia, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial, Ana Maria, Cleber, Edson, Heloísa, Rute, D' Lourdes e Tarley, pela agradável convivência e atenção, durante o transcorrer do curso.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo do DFP, Pedro, Moisés, Ana Cristina, Bruno, Joyce, Sandra, Manoel, Dayane, Josi, Eliane, Deila, pela convivência e auxílio nos experimentos.

À equipe deste trabalho: Pedro, Ana Cristina, Rodolpho, Thaís, Marcinha e funcionários da Epamig de Caldas, especialmente, Evaldo, Daniel e D' Isa, pelo importante apoio oferecido.

Aos amigos, Lucas, Grazielle, Eduardo, especialmente Júnea, minha irmã do coração, que mesmo longe, estavam sempre presentes me dando força para continuar e aguentando os meus desabafos.

À minha cunhada, Cristina, pela amizade, momentos de diversão e degustação de comidas típicas.

Aos colegas do Departamento de Fitopatologia pela convivência e trocas de experiências.

Ao laboratório de Biologia Molecular e Laboratório de Análises Avançadas e Biotecnologia (LAAB) da UFLA, pelo espaço e aparelhos disponibilizados para realização de análises durante o desenvolvimento da tese.

Ao Renato, André e Fabrício, por colaborarem e ajudarem em algumas análises da tese.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) pelo suportetécnico e área cedida para realização dos experimentos.

À Agroteste – Pesquisa e Consultoria, por acreditar nos meus conhecimentos e me oferecer a primeira oportunidade de trabalho.

Meu agradecimento especial a todas as pessoas cujos nomes foram omitidos, mas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO GERAL

Neste estudo objetivaram-se avaliar o efeito de doses de fosfitos de potássio (Phi) na severidade do míldio da videira cv Merlot, na produtividade e nas características físico-químicas de uvas, dos teores de *trans*-resveratrol de bagas e vinhos e caracterizar eventos bioquímicos e moleculares envolvidos na resposta de defesa durante a interação de plantas tratadas com Phi e inoculadas com *Plasmopara viticola*. Avaliar, também, a aplicação alternada de Phi com fungicida no controle dessa doença. Observou-se efeito linear das doses dos Phi na redução da severidade do míldio, em condições de campo, sendo a dose com teor de 2,1g de P₂O₅, a que proporcionou maior controle da doença. Phi alterou as características físico-químicas das bagas, além dos teores de compostos fenólicos, porém não alterou os teores de antocianinas. A aplicação de Phi, alternado com fungicidas, proporcionou menor severidade do míldio, além de maior produtividade, de forma semelhante ao tratamento apenas com fungicida e influenciou os teores de *trans*-resveratrol nas cascas e nos vinhos. Além disso, o Phi proporcionou aumento da atividade das enzimas PAL, POD e SOD, principalmente, de 12 a 48 horas após inoculação (HAI) e, também, induziu a expressão do gene *PAL*, *STS* e *CHS* às 48 e 144 HAI. Em folhas tratadas e não inoculadas, foi observada indução do gene *STS* das 12 as 144 HAI e para folhas tratadas e inoculadas, apenas as 48 HAI. A expressão do gene *CHS* foi maior das 144 as 240. O controle do míldio da videira pelo Phi ocorreu pela ativação das respostas de defesa nas plantas pela indução de genes e enzimas da rota dos fenilpropanoides. O Phi, um produto de baixo impacto ambiental, é uma alternativa eficaz no controle do míldio da videira, com resposta similar à proporcionada por fungicidas.

Palavras chaves: Fosfitos de potássio, *Plasmopara viticola*, *Vitis vinifera*, Compostos fenólicos, *Trans*-resveratrol, Fenilpropanoides, Indução de resistência, Controle alternativo, qRT-PCR.

GENERAL ABSTRACT

This study aimed at evaluating the effect of doses of potassium phosphite (Phi) in the severity of downy mildew in grapevine cv Merlot, productivity and the physicochemical characteristics of grapes, the levels of trans-resveratrol of berries and wines, and characterizing biochemical events and molecular mechanisms involved in the defense response during the interaction of plants treated with Phi and inoculated with *Plasmopara viticola*. It was also evaluated the application of alternating Phi and fungicides for the control of this disease. There was a linear effect of doses of Phi in reducing the severity of downy mildew in field conditions, and the dose level of 2.1 g of P₂O₅, provided the best control of the disease. Phi alter the physico-chemical properties of berries, besides the content of phenolic compounds, but does not changed the content of anthocyanins. The application of Phi alternated with fungicides provided less severity of downy mildew, and improved productivity, similar to the treatment with fungicide only, and can influence the concentration of trans-resveratrol in the fruit peels and wines. Also, Phi increased the activity of the enzymes PAL, POD and SOD, especially 12 to 48 hours after infection (HAI) and also induced the expression of the gene *PAL*, *CHS*, *STS* and at 48 and 144 HAI. In leaves treated with Phi A but not inoculated, an induction in the expression of *STS* was observed from 12 to 144 HAA, whereas for treated and inoculated leaves, the induction was at 48 HAI only. The control of downy mildew by Phi occurred by activation of the plant defense response through the activation of genes and enzymes involved in the phenylpropanoid pathway.. The Phi, a product with low environmental impact, is an effective alternative for the control of downy mildew, with a similar response to that provided by fungicides.

Keywords: Potassium Phosphites. *Plasmopara viticola*. *Vitis vinifera*, phenolic compounds. *Trans*-resveratrol. Phenylpropanoids. Induced resistance. alternative control. qRT-PCR.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	13
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 VITICULTURA.....	16
2.2 MÍLDIO DA VIDEIRA.....	19
2.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	22
2.3.1 METABOLISMO DOS FENILPROPANOÍDES NA VIDEIRA.....	28
2.3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	30
2.4 FOSFITO NO CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS.....	32
REFERÊNCIAS.....	35
ARTIGO 2.....	46
FOSFITO DE POTÁSSIO NO CONTROLE DO MÍLDIO DA VIDEIRA E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE UVAS MERLOT.....	47
INTRODUÇÃO.....	49
MATERIAL E MÉTODOS.....	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
CONCLUSÕES.....	59
AGRADECIMENTOS.....	59
REFERÊNCIAS.....	59
ARTIGO 3.....	69
CONTROLE DO MÍLDIO DA VIDEIRA: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E TEORES DE TRANS-RESVERATROL DAS BAGAS E VINHOS.....	70
RESUMO.....	70
ABSTRACT.....	72
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	75

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
4 - CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	93
ARTIGO 4.....	99
INDUÇÃO DE RESPOSTAS DE DEFESA EM VIDEIRA CONTRA PLASMOPARA VITICOLA POR FOSFITO DE POTÁSSIO	100
RESUMO.....	100
ABSTRACT	101
1 INTRODUÇÃO.....	102
2 MATERIAL E MÉTODOS	104
2.1 MATERIAL VEGETAL E ISOLADO DO PATÓGENO	104
2.2 FOSFITO DE POTÁSSIO NA PROTEÇÃO DE MUDAS DE VIDEIRA CONTRA O MÍLDIO	105
2.3 FOSFITO DE POTÁSSIO NA ATIVIDADE DE ENZIMAS E NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À DEFESA EM MUDAS DE VIDEIRA	106
2.3.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	106
2.3.1 ANÁLISE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL DA EXPRESSÃO DOS GENES DE DEFESA	108
2.3.1.1 TRATAMENTO COM DNASE.....	109
2.3.1.2 SÍNTESE DE CDNA	109
2.3.1.3 DESENHO DE PRIMERS PARA OS GENES RELACIONADOS À DEFESA DA VIDEIRA	110
2.3.1.5 ANÁLISE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL DA EXPRESSÃO DE GENES DE DEFESA	111
2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE DOS DADOS	112
3 RESULTADOS	112
3.1 FOSFITO DE POTÁSSIO NA PROTEÇÃO DA VIDEIRA CONTRA O MÍLDIO ..	112
3.2 FOSFITOS DE POTÁSSIO PHI A NA ATIVIDADE DE ENZIMAS RELACIONADAS A DEFESA EM FOLHAS DE VIDEIRA	113

3.2 FOSFITOS DE POTÁSSIO PHI A NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A DEFESA EM FOLHAS DE VIDEIRA.....	116
4 DISCUSSÃO	122
5 CONCLUSÃO	126
REFERÊNCIAS.....	127
CONSIDERAÇÕES FINAIS	133
ANEXOS	134

PRIMEIRA PARTE

Fosfitos na proteção e na indução de resistência em videira contra o míldio

1 INTRODUÇÃO GERAL

A ampla adaptabilidade da videira a uma gama diversificada de climas, os benefícios do controle da irrigação em climas de pluviosidade baixa ou estacional, a maior facilidade de controle de doenças em períodos de pouca incidência de chuvas, dentre outros fatores, têm impulsionado o cultivo de uvas para regiões de clima tropical, de tal modo que, atualmente, as regiões Nordeste e Sudeste do Brasil respondem por grande parte da produção de uvas no País (MELO et al., 2005).

Dentre as doenças fúngicas de maior importância para os vinhedos, o míldio, doença cujo agente etiológico é *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt) é o responsável pelos maiores danos para a viticultura, não só no sul do Brasil (GALLOTTI; GRIGOLETTI JUNIOR, 1990; GRIGOLETTI JUNIOR; SÔNEGO, 1993), bem como para outras regiões vitícolas do mundo, que possuem elevada precipitação durante o desenvolvimento vegetativo da planta (GALET, 1977; MAGAREY; WACHTEL; WICKS, 1990; PEARSON; GOHEEN, 1988). Essa doença é especialmente séria em anos com elevada precipitação pluviométrica, alta umidade relativa do ar e longos períodos de umidade sobre folhas e frutos, com perdas que podem atingir a 100% da produção de um vinhedo, tornando-se uma das maiores restrições à produção de uvas (MADDEN et al., 2000).

A pulverização de fungicidas, tratos culturais adequados e cultivares resistentes são alguns dos métodos de controle, usualmente, recomendados no manejo do míldio (AMORIM; KUNIYUKI, 1997). Todavia, o método de controle adotado com maior intensidade pelos produtores é a pulverização com fungicidas de contato e sistêmicos (SONEGO; GARRIDO, 2005).

No mercado, está disponível uma diversidade de princípios ativos para o controle do míldio da videira, porém, apesar de sua eficiência, a utilização de alguns desses princípios ativos apresenta algumas restrições, tais como: risco de

seleção de populações resistentes do patógeno aos fungicidas, contaminação ambiental, intoxicação dos agricultores, alto custo, entre outros fatores.

Atualmente, o sistema produtivo agrícola sofre pressão da sociedade pela produção de alimentos de forma sustentável e sem resíduos (STADINIK; TALAMINI, 2004). Por essa razão existe uma busca contínua por alternativas que sejam capazes de auxiliar no controle de doenças, mas que não representem risco ao homem e meio ambiente. Uma tecnologia para o controle de doenças de plantas promissoras e que vem sendo muito estudada é a indução de resistência.

A indução de resistência é baseada na ativação do sistema próprio de defesa da planta contra patógenos pela aplicação de formulações bióticas ou abióticas. Dentre as formulações abióticas, os fosfitos estão sendo utilizados no controle de doenças de plantas, principalmente causadas por oomicetos, com grande potencial de uso na agricultura (GALVÃO et al., 2006; PERUCH; SILVA, 2005). Sua ação aparentemente se deve à ativação do sistema natural de defesa da planta e da atividade antifúngica direta sobre o hospedeiro (SMILLIE; GRANT; GUEST, 1989).

Os fosfitos têm apresentado resultados satisfatórios no controle do míldio da videira (DALBÓ; SCHUCK, 2003; PEREIRA et al., 2012), inclusive com resultados similares aos dos fungicidas (SONEGO; GARRIDO, 2005). Atualmente os fosfitos vêm sendo bastante utilizados em diversas culturas para controlar doenças, porém em videira, ainda não foi evidenciado seu modo de ação contra o míldio.

Em videira, vários estudos relatam a indução de genes que codificam proteínas PR e enzimas da rota de fenilpropanoides, após a indução com diferentes eliciadores e diferentes tipos de patógenos (BÉZIER; LAMBERT; BAILLIEUL, 2002; KORTEKAMP, 2006). As respostas de defesa em videira incluem formação de compostos antimicrobianos de baixo peso molecular

(fitoalexinas), deposição de fenóis, de lignina e de calose no local da infecção, além do aumento da atividade das proteínas PR com atividade hidrolítica (quitinases e glucanases) (KORTERKAMP, 2006; TROTEL-AZIZ et al., 2006).

Diante disso, objetivou-se neste trabalho avaliar doses dos fosfitos na proteção da videira contra o míldio e avaliar o efeito destes produtos na ativação de respostas bioquímicas e moleculares de defesa em videiras contra *P. viticola*. Este estudo é de grande importância para a elucidação de seu modo de ação, contribuindo, assim, para o manejo integrado desta doença, pois os fosfitos apresentam baixo impacto ambiental e menor custo que os fungicidas tradicionalmente utilizados pelos produtores para o controle dessa doença na cultura da videira.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 VITICULTURA

A videira, uma angiosperma da família *Vitaceae*, originou-se na atual Groelândia e após difundiu-se para duas direções: Américo-asiática e Eurasiática, sendo, hoje, conhecidas mais de 200 mil espécies. De acordo com a União Brasileira de Viticultura - UVIBRA (2013), em 2012 o Brasil produziu 76.322.707 Kg de uvas viníferas e 620.612.033 Kg de uvas comuns.

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística mostram que no ano de 2012 ocorreu uma redução na produção de uvas no Brasil, em relação ao ano de 2011. Porém, nos estados de Pernambuco, Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, verificou-se um aumento na produção de uvas e, em Minas Gerais, esse aumento foi de 3,09% em relação ao ano anterior. As uvas destinadas à elaboração de vinhos, sucos e derivados em 2012, representaram 57,07% da produção nacional, enquanto que o restante, 42,93%, foi destinado ao consumo *in natura*. Na safra 2012/2013, Minas Gerais apresentou uma área de 762 hectares de videiras plantadas.

Em Minas Gerais, a produção de vinhos concentra-se na região sul do Estado, nos municípios de Andradas e Caldas, onde predomina o cultivo das videiras americanas, que, por serem mais rústicas, estão bem adaptadas às condições de clima da região, principalmente ao período chuvoso, época em que ocorre a maturação das uvas (REGINA et al., 2006).

As espécies de videira de maior importância econômica para a agricultura são: *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera*, seja para a produção de vinhos, seja para o consumo “*in natura*” das frutas. *V. labrusca* é uma espécie de origem americana e apresenta características mais rústicas quanto à suscetibilidade às doenças, e *V. vinifera* é uma espécie de origem europeia, mais sensível às doenças fúngicas e responsável por mais de 90% dos vinhos fabricados no mundo (GIOVANNINI, 2008).

As cultivares da espécie *V. vinifera* são as mais cultivadas no mundo e produzem uvas para mesa, vinho, passas e outros derivados. Apesar de produzir uvas de alta qualidade, são bastante sensíveis às doenças fúngicas que podem ocasionar a redução da quantidade, qualidade de uvas e derivados produzidos além da elevação de custos de produção e colheita (CAMARGO, 2012; CHAMPAGNOL, 1984; GARRIDO; SÔNIGO; GOMES, 2004).

A cultivar Merlot é uma importante variedade europeia vinífera tinta. Apresenta bagas esféricas e pequenas, que darão origem a um vinho de coloração vermelho-violáceo (RIZZON; MIELE, 2003). É utilizada para a elaboração dos melhores vinhos tintos finos do sul do Brasil, sendo, inclusive, referência como variedade emblemática para a criação de denominações de origem na Serra Gaúcha. É uma cultivar produtiva, bastante requerida pelo setor industrial brasileiro, porém, é muito suscetível ao míldio, inclusive, nas inflorescências (CAMARGO, 2012).

Cultivada na tradicional zona vitícola da região sul do Estado de Minas Gerais, a videira inicia sua brotação em setembro, floresce em outubro e inicia

sua maturação em dezembro para ser colhida entre janeiro e fevereiro(SOUZAet al., 2002), período em que os índices de precipitação pluviométrica mensal ultrapassam facilmente os 200 milímetros, condição que não permite uma boa maturação das uvas, além de torná-las bastante suscetíveis à ocorrência de diversas doenças e pragas.

A videira está sujeita a uma série de doenças, as quais poderão acarretar graves prejuízos se não forem devidamente controladas (SÔNEGO; GARRIDO; CZERMAINSKI, 2003) e em regiões com condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento destas, tais como ocorrem no sul do estado de Minas Gerais, o uso de produtos para seu controle pode atingir até 30% do custo de produção(SÔNEGO; GARRIDO, 2005). Dentre estas doenças, destaca-se o míldio.

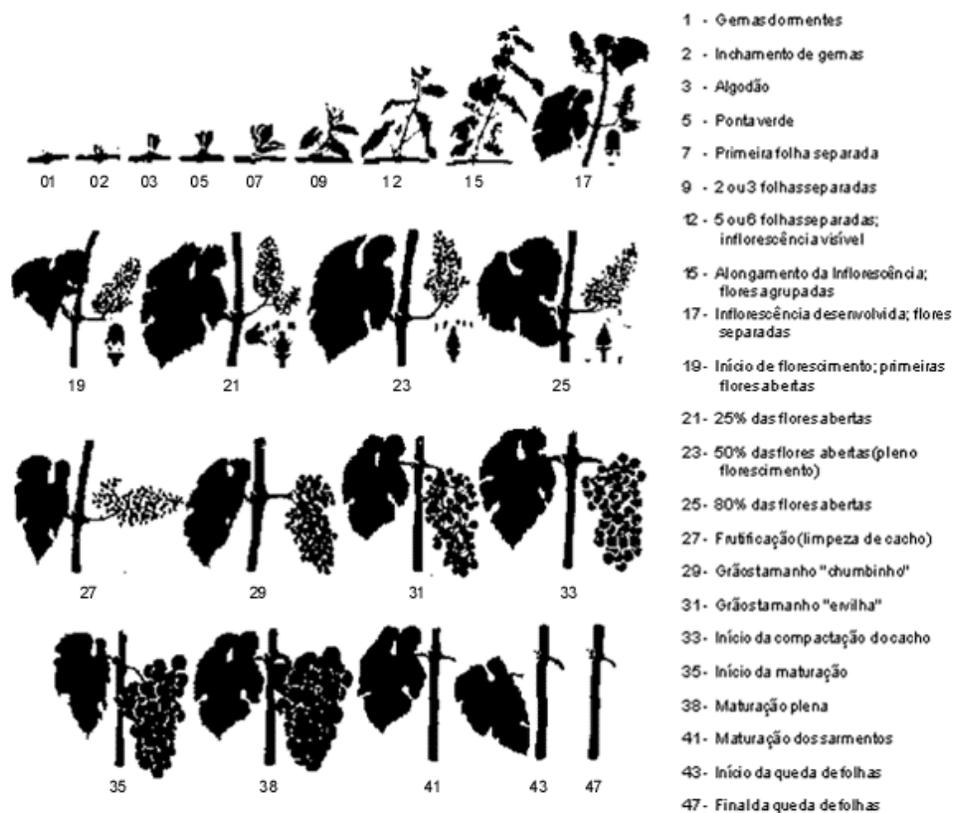


Figura 1: Estádios fenológicos da videira, de acordo com Eichorn e Lorenz (1977).

2.2 MÍLDIO DA VIDEIRA

O míldio, causado pelo oomiceto *Plasmopara viticola* [(Berk. & Curt) Berl. & de Toni] é uma das doenças mais prejudiciais aos vinhedos (GRIGOLETTI JÚNIOR; SÔNEGO, 1993), principalmente em regiões subtropicais, como é o caso da zona vitícola do sul de Minas Gerais. Nessa região a videira inicia sua brotação em setembro, floresce em outubro e inicia a maturação em dezembro para ser colhida entre janeiro e fevereiro (SOUZA et al., 2002), período em que os índices de precipitação pluviométrica mensal

ultrapassam facilmente os 200 milímetros, sendo estas condições altamente favoráveis ao míldio.

Esse patógeno pode infectar todos os órgãos vegetativos da videira, tornando-se crítico, quando infecta a planta no início do florescimento até a frutificação, pois ocasiona infecção de bagas jovens, levando a uma redução da produtividade, principalmente se no período de florescimento ocorrer condições de alta umidade, o que pode causar perdas de até 100% da produção quando não forem tomadas medidas eficientes de controle (HOFMANN, 2011; MADDEN et al., 2000; SÔNEGO; GARRIDO, 2005).

P. viticola é um parasita obrigatório e, em regiões de clima temperado ou subtropical, sobrevive durante o inverno na forma de oósporos. Essas estruturas de sobrevivência tornam-se maduras e germinam em solo encharcado, em temperatura superior a 11°C, produzindo macrosporângios dos quais saem os zoosporângios que, por meio dos respingos da chuva e do vento, são transportados até os tecidos das plantas, causando as infecções primárias (GALET, 1977). A partir dessas infecções, em condições climáticas favoráveis como alta umidade e temperaturas acima de 11°C, serão produzidos os ciclos secundários da doença. Todos os fatores que contribuem para o aumento da umidade favorecem o desenvolvimento da doença. Portanto, a chuva é o principal fator na promoção das epidemias, enquanto a temperatura exerce um papel moderador, acelerando ou retardando o desenvolvimento do patógeno (PEARSON; GOHEEN, 1988; RONZON, 1987). A temperatura ideal para o desenvolvimento do patógeno na videira é de 20 °C a 25 °C e a umidade ótima acima de 95 %. As cultivares de uvas europeias (*V. vinifera* L.) são mais suscetíveis ao míldio do que as americanas (*V. labrusca* L.) (SÔNEGO; GARRIDO; CZERMAINSKI, 2003).

Segundo Unger et al. (2007), foi observada formação de haustórios em cultivar suscetível de videira, algumas horas após a inoculação com *P. viticola* e

após três dias, os espaços intercelulares foram totalmente preenchidos com micélio, resultando em esporulação abundante na face inferior das folhas, quando colocadas em condições favoráveis.

Estudos com microscopia mostraram que o processo de infecção de *P. viticola* inicia com a formação de haustórios e hifas alongadas que invadem o espaço do mesófilo em até 24 horas após a inoculação com o patógeno tanto em cultivares resistentes, quanto em suscetíveis (DIEZ-NAVAJAS et al., 2008; UNGER et al., 2007).

Como a maioria das cultivares de *V. vinifera* L. são suscetíveis ao míldio, o método de controle dessa doença, adotado com maior intensidade pelos produtores, é a pulverização com fungicidas de contato e sistêmicos, que requer várias aplicações, durante o período de crescimento das brotações, podendo começar tão cedo, como no estágio 17 de Eichhorn Lorenz (Figura 1), fase de inflorescência desenvolvida e flores separadas (MADDEN et al., 2000; SÔNEGO; GARRIDO, 2005). Assim, várias aplicações destes produtos geram altos custos econômicos e impactos ambientais negativos, além de que o uso constante de fungicidas pode favorecer o surgimento de populações resistentes do patógeno (SONEGO; GARRIDO, 2005).

Com o aumento de uma sociedade mais exigente em produtos com baixo ou nenhum índice de resíduos de pesticidas, torna-se necessária a busca de medidas alternativas para o manejo dessa doença. Para a redução da aplicação de fungicida, existe a tentativa de uma previsão eficiente da infecção do míldio, por meio de sistemas de previsão de doenças, que permitem a utilização de práticas culturais como o manejo integrado de doenças, além da integração de novos compostos que não representem risco à saúde do homem e ao meio ambiente (VIRET et al., 2001).

Para contornar esse problema, a busca de estratégias alternativas que envolvem a ativação do próprio sistema de defesa das plantas contra

patógenos, vem sendo amplamente estudado em diversas culturas apresentando resultados satisfatórios (AZIZ et al., 2006; BAYSAL; TURGUT; MAO, 2005; DANIEL; GUEST, 2006; GODARD et al., 2009; JACKSON et al., 2000).

2.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Com a co-evolução, os patógenos levaram as plantas a selecionarem uma série de mecanismos de defesa e esses mecanismos identificados em plantas resistentes estão, também, presentes nas suscetíveis. Entretanto, a diferença entre resistência e suscetibilidade é o resultado de uma variação de tempo, autonomia celular ou intensidade das respostas de defesa das plantas (MORAES, 1998). As interações planta-patógeno são classificadas em compatíveis (patógeno virulento e hospedeiro susceptível) e em incompatíveis (patógeno avirulento e hospedeiro resistente). Nas interações incompatíveis, o sistema de defesa da planta é eficientemente ativado, conduzindo à resistência, enquanto que nas compatíveis não ocorre ativação de defesa, ou esta é tardia, condicionando a doença.

As plantas apresentam a capacidade de reconhecer potenciais patógenos invasores e desenvolvem mecanismos de defesa elaborados para proteção ao ataque dos mesmos. Esses mecanismos de defesa são eficientes, uma vez que as plantas são resistentes à maioria dos patógenos. Por outro lado, os patógenos desenvolvem estratégias para evitar seu reconhecimento ou conter os mecanismos de defesa das plantas (STASKAWICZ, 2001). Alguns desses mecanismos são constitutivamente expressos e fornecem barreiras físicas e químicas, enquanto outros são induzidos somente após o contato com o patógeno, o qual envolve vias interligadas de transdução de sinal e a rápida ativação da expressão de genes relacionados à defesa (HEATH, 2000).

Essa percepção das plantas envolve o reconhecimento de moléculas patogênicas ou originadas dos danos na planta, sendo chamadas elicitores, que podem ser peptídeos, proteínas, esteroides ou de outra natureza química

(DURRANT;DONG, 2004). Elicitores têm baixo peso molecular, são encontrados em baixas concentrações e podem apresentar diversas estruturas. Essas moléculas são reconhecidas por proteínas transmembrana, que apresentam domínios extracelulares e citoplasmáticos, responsáveis pelo processo de transdução do sinal de reconhecimento (PECK, 2003). Observa-se que ocorrem numerosas mudanças celulares e que a ativação de cascatas de sinalização na membrana plasmática leva à indução de redes interligadas de moléculas sinalizadoras, tais como ácido salicílico, ácido jasmônico e óxido nítrico, para a formação rápida de respostas de defesa para limitar ou inibir a dispersão do patógeno pela planta (HARRISON; BALDWIN, 2004).

Os mecanismos de defesa podem ser estruturais ou bioquímicos e são classificados em pré-formados e pós-formados. Os estruturais atuam como barreiras físicas que impedem a entrada e a dispersão do patógeno nos tecidos vegetais, enquanto os bioquímicos estabelecem condições adversas ao crescimento do patógeno ou produzem substâncias tóxicas ao mesmo (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Dentre os pré-formados estruturais, destacam-se presença de cutícula, acúmulo de lignina, cálcio e silício na parede celular, formação de tricomas e modificação da forma dos estômatos e dos vasos condutores (ALVES, 2007). As barreiras químicas incluem fenóis, alcaloides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, fitotoxinas, inibidores proteicos, entre outros. Nos pós-formados ou induzíveis estruturais pode ocorrer formação de papilas, tiloses, acúmulo de minerais no sítio de infecção, camadas de cortiça e abscisão, entre outros. Entre os mecanismos de defesa pós-formados bioquímicos, destacam-se as fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), formação de espécies ativas de oxigênio (ROS) e resposta de hipersensibilidade (HR) (PASCHOLATI;LEITE, 1995; RESENDE, 1996).

Os principais tipos de resistência são: a resistência local, a resistência

sistêmica adquirida, conhecida como *systemic acquired resistance* (SAR) e a resistência sistêmica induzida, denominada *induced systemic resistance* (ISR).

A resistência local, conhecida como reação de hipersensibilidade (HR), pode levar à morte local das células situadas onde o elicitor ou indutor é reconhecido. A resistência local, ou resposta de hipersensibilidade (HR), apresenta-se como um sistema de defesa localizado, caracterizado pela rápida necrose das células nas proximidades do local de invasão de patógenos (vírus, bactérias, nematoides e fungos). As células vegetais necróticas não são as únicas responsáveis pela contenção do desenvolvimento do patógeno; nelas ocorre acúmulo de metabólitos tóxicos, como fitoalexinas e fornecedores de elicitores secundários, os quais estimulam mecanismos de defesa nas células vegetais nas proximidades do local de infecção (KEEN, 1990). Associada a HR há maior produção de calose, deposição de compostos fenólicos e lignificação da parede celular na célula infectada, limitando o crescimento do haustório (SILVA et al., 2002).

Em muitas interações biotróficas ou hemibiotróficas entre plantas e patógenos fúngicos, imediatamente após o contato com o patógeno ocorre desintegração do núcleo celular. Ao mesmo tempo, grânulos marrons formam-se no citoplasma, inicialmente ao redor do ponto de penetração do patógeno e, posteriormente, em todo o citoplasma. A morte celular ocasiona degeneração da hifa do fungo e essa é a principal característica estrutural celular detectada na HR (AGRIOS, 2005).

Nesse tipo de resposta ocorre aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, conhecidas como *reactive oxygen species* (ROS), tais como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila e óxido nítrico (NO), entre outros. ROS participam como sinalizadores de respostas de defesa e podem atuar direta ou indiretamente sobre o patógeno, acarretando efeito tóxico (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

Na SAR, a resistência desenvolve-se de forma sistêmica em resposta a um patógeno que causa uma lesão necrótica (HR) ou por aplicação exógena de ácido salicílico ou compostos sintéticos, como o acibenzolar-S-metil (ASM), fosfitos de potássio e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), entre outros. No fenômeno SAR, a ativação do estado de latência contra doenças é induzida sistematicamente e a resistência expressa, geralmente, é efetiva contra um amplo espectro de patógenos e está associada à produção de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) em resposta à infecção por um patógeno (RAMAMOORTHY et al., 2001). Muitas PRPs possuem atividade antimicrobiana e são excelentes marcadores moleculares para a resposta de resistência.

As PRPs são proteínas de plantas que se acumulam rapidamente nos tecidos vegetais após o contato com patógenos ou em resposta ao tratamento com determinados compostos elicitores ou a outros tipos de estresse (LOONet al., 1994). Localizam-se no espaço intercelular, no vacúolo e na parede celular e estão presentes em diversas espécies de plantas pertencentes a diferentes famílias. A maioria dessas proteínas possui um peptídeo-sinal na região N-terminal, responsável por sua translocação pela membrana do retículo endoplasmático para o vacúolo ou para o espaço intercelular (LOONet al., 1997).

Essas proteínas apresentam propriedades físico-químicas típicas, como baixo peso molecular, estabilidade em meio ácido e resistência a proteases, uma vez que, nos locais para os quais elas são translocadas, encontram-se muitas enzimas com atividade de protease ácida. Atualmente, são classificadas em 17 famílias diferentes, com base na similaridade das sequências de aminoácidos e atividade enzimática ou biológica (LOON; STRIEN, 1999).

Diversos estudos confirmam que o acúmulo dessas proteínas está associado com a SAR, por serem induzidas por patógenos. Enzimas que são

constitutivamente expressas, mas que têm sua concentração aumentada na presença do patógeno ou por outra forma de estresse, como fatores ambientais, tratamento com eliciadores endógenos e exógenos e reguladores de crescimento, também são consideradas PRPs, como, por exemplo, PR1, quitinases (FERREIRA et al., 2007).

Entre as PRPs, encontram-se as peroxidases (POX; EC 1.11.1.7) que são uma importante classe de proteínas relacionadas à patogênese. Pertencem à família PR-9 e participam de vários processos fisiológicos importantes. Catalisam a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio, originando lignina. Esse processo reforça a parede celular das plantas em resposta ao ataque de patógenos (LOON; STRIEN, 1999). Essas enzimas também participam da biossíntese de etileno e da oxidação de compostos fenólicos acumulados em resposta à infecção (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Peroxidases, também, estão envolvidas na geração de espécies reativas de oxigênio e na oxirredução de vários substratos, usando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KAWAOKA et al., 2003).

Dentre os fenômenos relevantes da resistência induzida, além do aumento da expressão de genes relacionados à defesa, estão a HR, a produção de compostos antimicrobianos, a explosão oxidativa e a ativação da rota dos fenilpropanoides, que é a via biossintética da formação da lignina e outros metabólitos secundários como as fitoalexinas.

Durante a resposta de defesa, o primeiro passo da geração de ROS, a partir do oxigênio molecular (O_2), é a formação do radical ou ânion superóxido em um processo mediado, geralmente, pelas enzimas NADPH-oxidase ligada à membrana plasmática ou peroxidase ligada à parede celular (GRANT; LOAKE, 2000; OLMOS et al., 2003). O radical superóxido é altamente tóxico e pode rapidamente regenerar o oxigênio molecular ou ser convertido a peróxido de

hidrogênio pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Figura 2). As enzimas catalases atuam, posteriormente, detoxificando o peróxido de hidrogênio (APEL;HIRT, 2004).

As catalases (CAT) são enzimas que convertem o H_2O_2 em H_2O e O_2 (Figura 2). As plantas possuem várias isoformas de catalase, as quais estão presentes nos peroxissomas e glioxissomas. São as principais enzimas de detoxificação do H_2O_2 em plantas e podem dismutar diretamente o H_2O_2 ou oxidar substratos, tais como metanol, etanol, formaldeído e ácido fórmico. As enzimas CAT funcionam como canal de limpeza do H_2O_2 celular (BREUSEGEMet al., 2001).

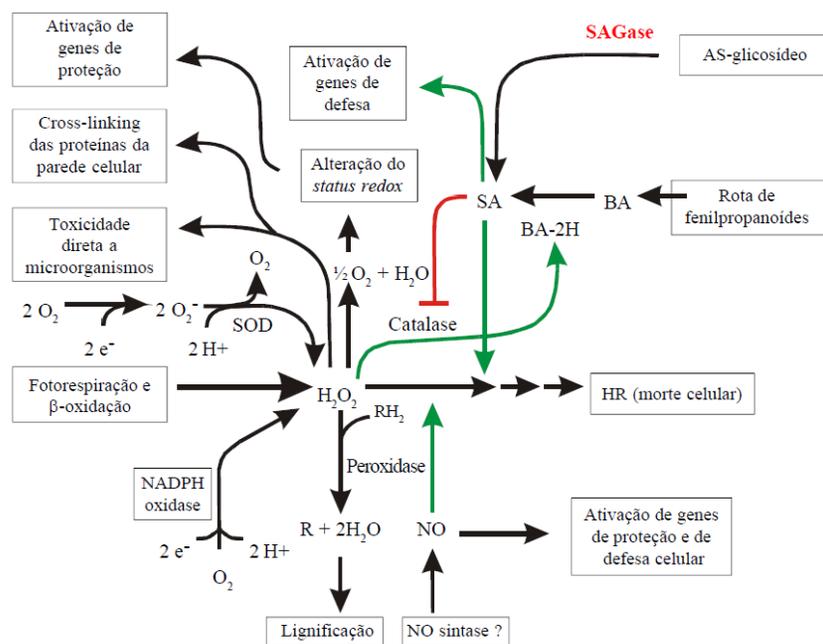


Figura 2. Interconexões do H_2O_2 , óxido nítrico (NO) e ácido salicílico (AS) para a ativação e coordenação das múltiplas reações de defesa das plantas. SOD (superóxido dismutase), SAGase (AS glicosiltransferase) e BA-2H (ácido benzoico 2-hidrolase). Adaptado de Hammond-Kosack e Jones (2000).

Avanços nas pesquisas, envolvendo indução de resistência em plantas, vêm sendo acompanhados pelo surgimento de novos produtos comerciais que apresentam maior eficácia, estabilidade e menor impacto ao ambiente, sendo capazes de propiciar melhora na produtividade agrícola, em decorrência da redução de perdas ocasionadas por patógenos e, em alguns casos, incrementos no desenvolvimento vegetativo (RESENDE et al., 2006).

2.3.1 METABOLISMO DOS FENILPROPANOIDES NA VIDEIRA

O metabolismo dos fenilpropanoides leva a uma série complexa de caminhos bioquímicos que proporcionam às plantas milhares de combinações. Muitos destes são intermediários na síntese de substâncias estruturais das células, como a lignina (BOATRIGT et al., 2004). Estes caminhos se ramificam gerando várias substâncias com funções essenciais no desenvolvimento da planta e interações ambientais, atuando enzimas fundamentais para a biossíntese da lignina (ALLINA et al., 1998). A biossíntese da lignina envolve uma série de enzimas, dentre elas a fenilalanina amônio-liase (PAL).

A PAL está relacionada com a resistência de plantas a patógenos, notadamente, por estar envolvida no primeiro passo da síntese dos fenilpropanoides, com participação de fenilalanina e sua conversão em ácido-transcinâmico, catalizada pela PAL, resultando em compostos como fitoalexinas e, principalmente, lignina (Figura 3), que confere maior resistência à parede celular das plantas aos patógenos (NAKAZAWA; NOZUE; YASUDA, 2001).

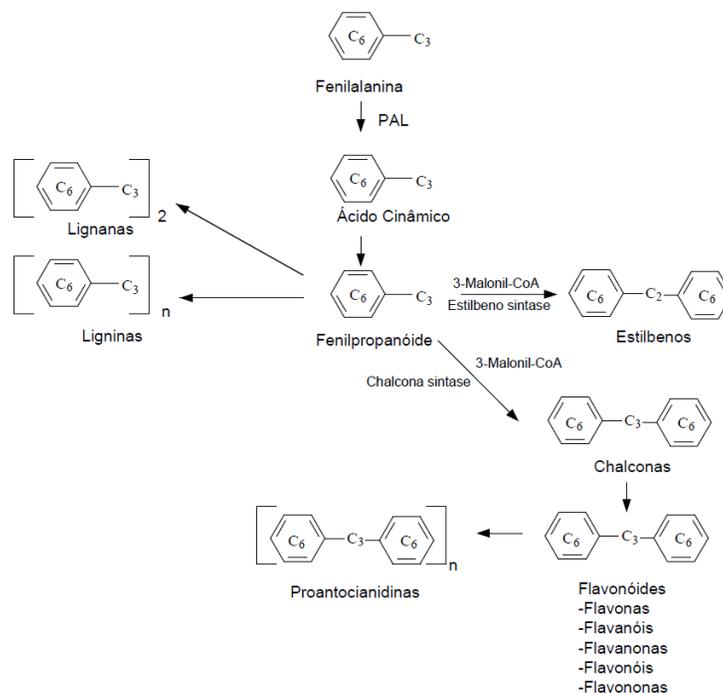


Figura 3. Diagrama da via de compostos fenólicos em plantas (CRUZ, 2008).

Em videira, as respostas de defesa geralmente induzidas são a acumulação de compostos fenólicos, tais como fitoalexinas e a síntese de proteínas PR (BÉZIER; LAMBERT; BAILLIEUL, 2002; BUSAM; KASSEMAYER; MATERN, 1997; COUTOS-THÉVENOT et al., 2001; JEANDET et al., 2002). Alguns autores relatam que as fitoalexinas da videira, *Trans-resveratrol* e *viniferina*, podem ser fungitóxicas para patógenos como *B. cinera*, além de aumentar a resistência de videira contra *P. viticola* (DAÍ et al., 1995; PEZET et al., 2004). Autores observaram que o aumento dessas fitoalexinas foram ativadas por produtos que funcionaram como indutores de resistência, tais como cloreto de alumínio, jasmonatos e irradiação UV (BONOMELLI et al., 2004; BUSSAM; KASSEMAYER; MATERN, 1997; TASSONI et al., 2005).

Trotel-Aziz et al. (2006) observaram que quitosana na dose de 75 mg L⁻¹ proporcionou aumento da atividade da enzima PAL, em folhas de videira cv. Chardonnay, com picos as quatro, seis e 12 horas após a pulverização. Jackson et al. (2000) verificaram que mudas suscetíveis de *Eucalyptus marginata*, tratadas com fosfito e inoculadas com *P. cinnamomi*, apresentaram elevada atividade de enzimas, envolvidas na resposta de defesa, incluindo fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamil álcool desidrogenase (CAD) e, conseqüentemente, a elevada síntese de compostos fenólicos. Aziz et al. (2006) observaram que quitosana e sulfato de cobre foram capazes de induzir reações de defesa em folhas de videira cv. Chardonnay, pelo aumento de fitoalexinas, *trans* e *cis*-resveratrol.

2.3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

As videiras sintetizam compostos fenólicos quando submetidas a uma desordem metabólica causada por estresses bióticos ou abióticos, tais como infecções por patógenos, danos mecânicos, irradiações ultravioleta, temperaturas extremas, substâncias químicas, entre outros (ADRIANet al., 1996; CANTOS et al., 2000; DAÍ et al., 1995; SAUTTER, 2003). Dessa forma, produtos que são capazes de induzir resistência contra patógenos, podem, também, contribuir para a síntese dos compostos fenólicos em videiras.

O resveratrol é um polifenol, fitoalexina pertencente à classe dos estilbenos (ABEet al., 2007) sintetizado naturalmente pela videira. É uma molécula que possui dois isômeros ópticos, *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol, sendo o isômero *trans* a forma mais comumente encontrada e fotossensível, transformando-se no isômero *cis*-resveratrol (MELZOCHet al., 2001). De acordo com Cantos et al. (2000), a biossíntese do resveratrol pode ser induzida em resposta a vários estímulos.

Os compostos fenólicos são componentes importantes nos derivados da uva, como sucos e vinhos, e contribuem para a expressão de características sensoriais como cor, sabor, adstringência e estrutura do vinho, por ação direta ou por interação com proteínas polissacarídeos ou outros compostos fenólicos (ABEet al., 2007). As antocianinas constituem a maior porcentagem de compostos fenólicos em uvas tintas e são muito importantes para a produção de vinhos tintos, pois contribuem para os atributos sensoriais e coloração do vinho (MUNÕZ-ESPADAet al., 2004). Além dos compostos fenólicos apresentarem grande importância para a qualidade de mosto e vinho, também podem exibir ação contra fitopatógenos (IRITiet al., 2011).

A formação de flavonoides e antocianinas são desencadeadas pela enzima chalcona sintase (CHS, EC 2.3.1.74) e os estilbenos, outra família de polifenóis que tem como precursor o resveratrol, são catalisados pela estilbeno sintase (STS), cujas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 4 (KANG; SALTVEIT, 2003).

As fitoalexinas, o resveratrol parecem ser uma importante reação de defesa. Genes da estilbeno sintase (enzima chave na síntese do resveratrol) isolados do genoma da videira já foram transferidos para outras plantas como tabaco, arroz, trigo e tomate. Foram relatados aumentos significantes na tolerância dessas plantas a vários patógenos como *B. cinerea*, *Pyriculariaoryzae* e *Phytophthora infestans*. O gene citado foi, também, transferido para videiras geneticamente modificadas, cujas folhas foram inoculadas com esporos de *Botrytis*, provocando aumento da expressão de até 100 vezes em relação à planta controle (BUCHANAN; GRUISSEN; JONES, 2000).

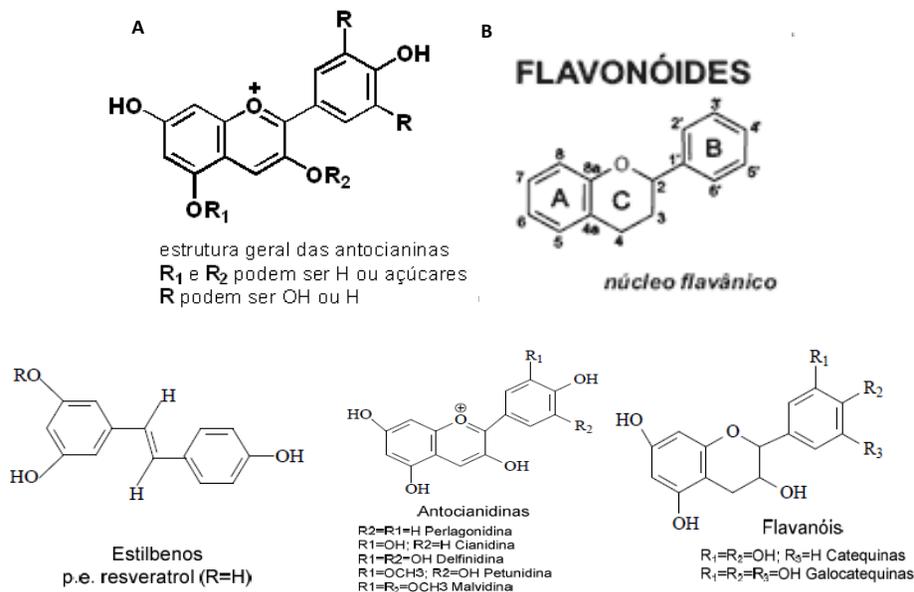


Figura 4: Estruturas químicas dos compostos estilbenos, antocianidinas e flavanóis. A: Estrutura geral das antocianinas; B: Estrutura geral de flavonoides (CRUZ, 2008).

2.4 FOSFITO NO CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS

Os fosfitos são fertilizantes foliares que, além de apresentarem ação fungitóxica, induzem resistência em plantas, com rápida indução dos mecanismos de defesa, otimizando a capacidade das plantas de contra-atacarem os patógenos (COHEN; COFFEY, 1986; DALIO et al., 2012).

Estes produtos estão sendo muito utilizados na agricultura para o controle de diversas doenças em diferentes culturas (DALBÓ; SCHUCK, 2003; JACKSON et al., 2000; MOREIRA; MAY-DE-MIO, 2009; PEREIRA et al., 2012; SILVA et al., 2011), como alternativa ao controle químico convencional. Fosfitos podem atuar de várias maneiras nas plantas, seja como fertilizante, atuando diretamente contra patógenos (DELIOPOULOS;

KETTLEWELL;HARE, 2010) ou indiretamente ativando os mecanismos de defesa das plantas (ESHRAHGI et al., 2011). Além de apresentarem boa compatibilidade com fungicidas, serem absorvidos rapidamente pelos tecidos da planta e apresentarem uma maior segurança ambiental (SÔNEGO; CZERMAINSKI, 1999), os fosfitos podem aumentar a resistência das plantas, o que é relevante, porque além da infecção pelo míldio, os vinhedos são constantemente ameaçados por outras doenças causadas por outros patógenos (SÔNEGO; GARRIDO, 2005).

O aumento da resistência nas plantas proporcionado pelos fosfitos ocorre por SAR, por meio de mudanças físico-químicas no tecido vegetal, tais como lignificação da parede celular com formação de barreiras à penetração do patógeno e acúmulo de substâncias tóxicas ao patógeno, como fitoalexinas ou proteínas relacionadas à patogênese, como peroxidases, quitinases e β -1,3-glucanases (ESHRAHGI et al., 2011).

Hukkanen et al. (2007) verificaram o controle do míldio (*P. sparsa*) em folhas de amora tratadas com fosfitos, além de identificarem vários compostos fenólicos nas plantas, oito dias após a inoculação com o patógeno. Tavares et al. (2009) observaram aumento da atividade da enzima β -1,3 glucanase em mamoeiro tratadas com fosfito de potássio, cinco dias após a inoculação com *Phytophthora palmivora*, além de verificarem a sobrevivência de 35% das plantas inoculadas com o patógeno. Pereira et al. (2012) observaram em folhas de plantas adultas de videira no campo, tratadas com fosfito de potássio, controle do míldio em 60,5% na severidade da doença.

De acordo com Guest e Grant (1991), o fosfito está relacionado com a rápida mudança citológica pela migração nuclear, deposição de papila e aumento da resposta de hipersensibilidade levando à morte celular. No hospedeiro, pode ocorrer, também, a biossíntese de etileno, aumento da respiração, ativação da

fenilalanina amônia-liase, lignificação, ativando o metabolismo dos fenilpropanoides.

Jackson et al.(2000) observaram em eucalipto, que, quando a concentração de fosfito é alta, o modo de ação é direta sobre o fungo e que, quando a concentração é baixa, a planta tem um incremento em sua resistência natural. Estes autores verificaram, também, que mudas suscetíveis de *Eucaliptus marginata*, tratadas com fosfito e inoculadas com *P. cinnamomi*, apresentaram elevada atividade de enzimas, envolvidas na resposta de defesa, incluindo fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamil álcool desidrogenase (CAD) e, conseqüentemente, a elevada síntese de compostos fenólicos.

Os fosfitos vêm sendo utilizados apresentando eficiência seletiva contra oomicetos (COFFEY; OUIMETTE, 1989) e podem estimular a produção de substâncias de defesa naturais das plantas, como as fitoalexinas, quando infectadas por algum patógeno. Os fosfitos têm sido aplicados com êxito no controle de míldio da videira (DALBÓ; SCHUCK, 2003), inclusive com resultados similares aos fungicidas (SÔNEGO; GARRIDO, 2005).

REFERÊNCIAS

ABE, L.T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n. 2, p.394-400, abr./jun. 2007.

ADRIAN, M. et al. Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminium chloride (AlCl₃). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 8, p. 1979-1981, Aug. 1996.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5thed. New York: Academic, 2005. 922 p.

ALLINA, S.M. et al. 4-coumarate:coenzyme A ligase in hybrid poplar: properties of native enzymes, cDNA cloning, and analysis of recombinant enzymes. **Plant Physiology**, Bethesda, v.116, n. 2, p.743-754, Feb. 1998.

ALVES, E. Mecanismos estruturais na resistência de plantas a patógenos. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 33, n. 2, p. 154-156, abr./jun. 2007.

AMORIM, L.; KUNIYUKI, H. Doenças da videira. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p.736-757.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biotechnology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.

AZIZ, A. et al. Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. **Phytopathology**, Saint Paul, v.96, n. 11, p.1188-1194, Nov. 2006.

BAYSAL, Ö.; TURGUT, C.; MAO, G. Acilbenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves: acilbenzolar-S-methyl induces. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v.49, n.4, p.599-604, 2005.

BÉZIER, A.; LAMBERT, B.; BAILLIEUL, F. Study of defense-related gene expression in grapevine leaves infected with *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 2, p. 111-120, Feb. 2002.

BOATRIGT, J. et al. Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 135, n. 4, p. 1993-2011, Aug. 2004.

BONOMELLI, A. et al. Response of grapevine defenses to UV-C exposure. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 55, n. 1, p. 51-59, Jan. 2004.

BREUSEGEM, F. V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Shannon, v. 161, n. 3, p. 405-414, May 2001.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSSEN, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367 p.

BUSAM, G.; KASSEMEYER, H. H.; MATERN, U. Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 115, n. 3, p. 1029-1038, Nov. 1997.

CAMARGO, U.A. **Porta-enxertos e cultivares de videira**. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura>>. Acesso em: 1 jul. 2012.

CANTOS, E. et al. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 10, p. 4606-4612, Sept. 2000.

CHAMPAGNOL, F. **Eléments de physiologie de la vigne et de viticulture générale**. Montpellier: Déhan, 1984. 351 p.

COFFEY, M.D.; OUIMETTE, D.G. Phosphonates: antifungal compounds against oomycetes. In: BODDY, L.; MARCHANT, R.; REED, D. J. (Ed.). **Nitrogen, phosphorus and sulphur utilization by fungi**. Cambridge: Cambridge University, 1989. p. 107-129.

COHEN, M. D.; COFFEY, M. D. Systemic fungicides and the control of oomycetes. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 311-338, 1986.

COUTOS-THEVENOT, P. et al. In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen inducible PR10 promoter. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 358, p. 901-910, May 2001.

CRUZ, A. P.G. **Avaliação da influência da extração e microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante**. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

DAI, G. H. et al. Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, n. 3, p. 177-188, Mar. 1995.

DALBÓ, M. A.; SCHUCK, E. Avaliação do uso de fosfitos para o controle do míldio da videira. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 16, n. 3, p. 33-36, 2003.

DALIO, R. J. D. et al. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 206-243, 2012.

DANIEL, R.; GUEST, D. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 67, n. 3/5, p. 194-201, Sept./Dec. 2006.

DELIOPOULOS, T.; KETTLEWELL, P. S.; HARE, M.C. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 10, p. 1059-1075, May 2010.

DIEZ-NAVAJAS, A. M. et al. Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the tissue level. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 7, p. 776-780, July 2008.

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

EICHORN, K.W.; LORENZ, H. Phaenologische entwicklungsstadien der rebe. **Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes**, Stuttgart, v. 29, p. 119-120, 1977.

ESHRAGHI, L. et al. Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 60, n. 6, p. 1086-1095, Dec. 2011.

FERREIRA, R. B. et al. The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 8, n. 5, p. 677-700, 2007.

GALET, P. **Les maladies et les parasites de la vigne**. Montpellier: Paysan du Midi, 1977. 871 p.

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

GALVÃO, S. et al. Avaliação de eficiência de produtos alternativos para o controle do míldio e da antracnose em videira, cultivar Niágara Branca. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 19, n. 2, p. 91-93, set. 2006.

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, Brasília, v.29, n. 3, p.322-324, maio/jun. 2004.

GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. 3.ed. Porto Alegre: Renascença, 2008. 362 p.

GODARD, S. et al. Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin- and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 47, n. 1, p. 827-837, Jan. 2009.

GRANT, J. J.; LOAKE, G. J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiology**, Bethesda, v.124, n.1, p.21-30, 2000.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SÔNEGO, O. R. **Principais doenças fúngicas da videira no Brasil**. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPV, 1993. 36 p. (Circular Técnica, 17).

GUEST, D.; GRANT, B. R. The complex action of phosphonates as antifungal agents. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, Cambridge, v. 66, p. 159-187, May 1991.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiology, 2000. p. 1102-1156.

HARRISON, M. J.; BALDWIN, I. T. Biotic interactions: play and counter-play in the biotic interactions of plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, n. 4, p. 353-355, Aug. 2004.

HEATH, M. C. Nonhost resistance and non-specific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 4, p. 315-319, Aug. 2000.

HOFMANN, U. **Optimisation of downy mildew (*Plasmopara viticola*) control in organic viticulture with low copper doses, new copper formulations and plant strengtheners, results of 20 years of on farm research.** Geisenheim: International Consultancy of Organic Viticulture, 2011. Disponível em: <<http://www.eco-consult.net>>. Acesso em: 16 ago. 2011.

HUKKANEM, A.T. et al. Benzothiadiazole induces the accumulation of phenolics and improves resistance to powdery mildew in strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.55, n. 5, p.1862-1870, Feb. 2007.

IRITI, M. et al. New chitosan formulation prevents grapevine powdery mildew infection and improves polyphenol content and free radical scavenging activity of grape and wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Melbourne, v.17, n. 2, p.263-269, June 2011.

JACKSON, T. J. et al. Action of the fungicide phosphonate on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 147-154, Feb. 2000.

JEANDET, P. et al. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 10, p. 2731-2741, Apr. 2002.

KANG, H. M.; SALTVEIT, M. E. Wound-induced PAL activity is suppressed by heat-shock treatments that induce the synthesis of heat-shock proteins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.119, n. 3, p.450-455, Nov. 2003.

KAWAOKA, A. et al. Ectopic expression of a horseradish peroxidase enhances growth rate and increases oxidative stress resistance in hybrid aspen. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 3, p. 1177-1185, July 2003.

KEEN, N. T. Phytoalexins and their elicitors. In: HOAGLAND, R. E. (Ed.). **Microbes and microbial products as herbicides**. Washington: American Chemical Society, 1990. p. 114-129.

KORTEKAMP, A. Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 44, n. 1, p. 58-67, Jan. 2006.

LOON, L. C. van. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 9, p. 753-765, Dec. 1997.

LOON, L.C. van et al. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 12, n. 3, p. 245-264, June 1994.

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

MADDEN, L.V. et al. Evaluation of a disease warning system for downy mildew of grapes. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, n. 5, p.549-554, May 2000.

MAGAREY, P. A.; WACHTEL, M. F.; WICKS, T.J. Downy mildew a major disease. **The Australian Grapegrower & Winemaker**, Broadview, v. 321, n. 1, p.19-23, Jan. 1990.

MELO, G. W. B. et al. **Sistema de produção de uva de mesa do norte de Minas Gerais**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/MesaNorteMinas>>. Acesso em: 7 mar. 2013.

MELZOCH, K. et al. Resveratrol in parts of vine and wine originating from bohemian and moravian vineyard regions. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, Zagreb, v. 66, n. 1, p.53-57, 2001.

MORAES, M. G. Mecanismos de resistência adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia Vegetal**, São Paulo, v. 6, p. 261-284, 1998.

MOREIRA, L. M.; MAY-DE-MIO, L. L. Controle da podridão parda do pessegueiro com fungicidas e fosfitos avaliados em pré e pós-colheita. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 405-411, mar./abr. 2009.

MUÑOZ-ESPADA, A.C.et al. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch grapes and wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.52, n. 23, p.6779-6786, 2004.

NAKAZAWA, A.; NOZUE, M.; YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, n. 3, p. 323-328, Sept. 2001.

OLMOS, E. et al. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells: by-2 line. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.54, n. 381, p. 291-301, Jan. 2003.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Org.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 417-453.

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

PECK, S. C. Early phosphorylation events in biotic stress. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, n. 4, p. 344-338, Aug. 2003.

PEREIRA, V.F.et al. Fosfito de potássio no controle do míldio da videira e características físico-químicas de uvas Merlot. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.47, n.11, p.1581-1588, nov. 2012.

PERUCH, L. A. M.; SILVA, A. C. F. Fungicidas alternativos para o manejo da queima do tomateiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 3., 2005, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 2005. 1 CD-ROM.

PEZET, R. et al. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. **Vitis**, Siebeldingen, v. 43, n. 2, p. 145-148, May 2004.

RAMAMOORTHY, V. et al. Induction of systemic resistance by plant growth promoting Rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2001.

REGINA, M.A. et al. Avaliação de híbridos de videira destinados à elaboração de vinhos brancos em Caldas, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 262-266, ago. 2006.

RESENDE, M. L. V. Mecanismos de resistência a doenças fúngicas vasculares. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 329-351, 1996.

RESENDE, M. L. V. et al. Produtos comerciais a base de bioindutores de resistência em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 14, n. 1, p. 361-380, jan. 2006.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, mar./abr. 2003.

RIZZON, L.A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Merlot para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, p. 156-161, dez. 2003. Suplemento.

RONZON, C. **Modelization du comportement epidemique du mildiou de la vigne**: etude du role de la phase sexue de *Plasmopara viticola*. 1987. 119 p.

Thèse (Doctorat en Phytopathologie) - Université de Bordeaux II, Bordeaux, 1987.

SAUTTER, C. K. **Avaliação da presença de resveratrol em suco de uva.** 2003. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F. et al. (Org.). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular.** Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 227-248.

SILVA, M. C. et al. Hypersensitive cell death and post-haustorial defense responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, n. 4, p. 169-183, Apr. 2002.

SILVA, O.C. et al. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. **Crop Protection**, Guildford, v.30, p.598-604, Feb. 2011.

SMILLIE, R.; GRANT, B. R.; GUEST, D. The mode of action of phosphite: evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp in plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 9, p. 921-926, Sept. 1989.

SÔNEGO, O.R.; CZERMAINSKI, A.B.C. **Eficácia de fungicidas para o controle do míldio da videira cv. Isabel.** Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 1999. 16p.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R. **Avaliação da eficácia de algumas marcas comerciais de fosfito de potássio e de fosfonato de Potássio no controle do míldio da videira.** Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2005. 13 p.

SÔNEGO, O.R.; GARRIDO, L.R.; CZERMAINSKI, A.B.C. **Avaliação de fosfitos no controle do míldio da videira.** Bento Gonçalves: EMBRAPA CNPQU, 2003. 18p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 11).

SOUZA, C. M. et al. Indicação de cultivares de videira para o Sul de Minas Gerais. In: REGINA, M.de A. (Ed.). **Viticultura e enologia: atualizando conceitos**. Caldas: EPAMIG-FECD, 2002. p. 277-286.

STADINIK, M.J.; TALAMINI, V. (Ed.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004. 484 p.

STASKAWICZ, B. J. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v.125, n. 1, p.73-76, Jan. 2001.

TASSONI, A. et al. Jasmonates and Na-orthovanadate promote salicylic acid production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. **New Phytologist**, Cambridge, v. 166, n. 3, p. 895-905, June 2005.

TAVARES, G.M. et al. Indução de resistência do mamoeiro à podridão radicular por indutores bióticos e abióticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 11, p. 1416-1423, nov. 2009.

TROTEL-AZIZ, P. et al. Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 114, n. 4, p. 405-413, Apr. 2006.

UNGER, S. et al. The course of colonization of two different vitis genotypes by *Plasmopara viticola* indicates compatible and incompatible host-pathogen interactions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 7, p. 780-786, July 2007.

UNIÃO BRASILEIRA DE VITICULTURA. **Dados estatísticos: produção de uvas**. Disponível em: <http://www.uvibra.com.br/dados_estatisticos.htm>. Acesso em: 20 ago. 2013.

VIRET, O. et al. Prévision et gestion des infections du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) à l'aide d'une station d'avertissement. **Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture**, Nyon, v.33, n. 2, p. 1-12, Jan. 2001.

ARTIGO 2

Publicado na Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) em 2012

**Fosfito de potássio no controle do míldio da videira
e características físico-químicas de uvas Merlot**

Vanessa Foresti Pereira⁽¹⁾, Mário Lúcio Vilela de Resende⁽¹⁾, Pedro Martins Ribeiro Júnior⁽¹⁾,
Murillo de Albuquerque Regina⁽²⁾, Renata Vieira da Mota⁽²⁾ e Luiz Rodolpho Rodrigues Vitorino⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Campus Ufla, Caixa Postal 3.037, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: vanessaforesti@yahoo.com.br, mlucio@ufla.br, ribeirojuniorpm@yahoo.com.br, rodolphovitorino@hotmail.com ⁽²⁾Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Núcleo Tecnológico Epamig Uva e Vinho, Avenida Santa Cruz, nº-500, Caixa Postal 33, CEP 37780-000 Caldas, MG. E-mail: murillo@epamigcaldas.gov.br, renata@epamigcaldas.gov.br

Pesq. agropec. bras., Brasília, v.47, n.11, p.1581-1588, nov. 2012

FOSFITO DE POTÁSSIO NO CONTROLE DO MÍLDIO DA VIDEIRA E
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE UVAS MERLOT

Vanessa Foresti Pereira⁽¹⁾, Mário Lúcio Vilela de Resende⁽¹⁾, Pedro Martins
Ribeiro Júnior⁽¹⁾, Murillo de Albuquerque Regina⁽²⁾, Renata Vieira da Mota⁽²⁾
e Luiz Rodolpho Rodrigues Vitorino⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Campus
UFLA – Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail:
vanessaforesti@yahoo.com.br, mlucio@ufla.br, ribeirojuniorpm@yahoo.com.br,
rodolphovitorino@hotmail.com, ⁽²⁾Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas
Gerais, Núcleo Tecnológico Epamig Uva e Vinho, Avenida Santa Cruz, n°500,
Caixa Postal 33, CEP 37780-000 Caldas, MG. E-mail:
murillo@epamigcaldas.gov.br, renata@epamigcaldas.gov.br

Resumo – Este trabalho teve como objetivo determinar o efeito de doses crescentes de duas formulações de fosfitos de potássio na severidade do míldio da videira, na produtividade e nas características físico-químicas de uvas Merlot. Foram avaliadas duas formulações de fosfito de potássio (Phi A e Phi B), em doses equivalentes a 0; 1,2; 2,5; 3,7 e 5,0 g de P₂O₅ L⁻¹, comparadas com fertilizante foliar e fungicidas nas safras de 2009/2010 e 2010/2011. Observou-se efeito linear das doses dos fosfitos na redução da severidade do míldio, nas duas safras, sendo que na maior dose, o Phi A proporcionou controle médio de 60,5% e o Phi B de 57,7%, semelhantes ao fungicida (64,3%) e fertilizante foliar (53,3%). Na primeira safra, Phi B proporcionou maior produtividade, enquanto que na segunda, não diferiu do tratamento com fungicida. Na primeira safra, não foi observado efeito dos tratamentos no teor de sólidos solúveis, pH e acidez total titulável do mosto, enquanto que na segunda safra todos os tratamentos avaliados proporcionaram aumento nesses parâmetros. Phi B e fungicidas proporcionaram maiores teores de compostos fenólicos solúveis totais das

casca, não havendo efeito destes nos teores de antocianinas. A utilização de fosfito de potássio é uma alternativa eficaz no controle do míldio da videira, com resposta similar à proporcionada por fungicidas.

Termos para indexação: *Plasmopara viticola*, *Vitis vinifera*, compostos fenólicos, controle alternativo.

Potassium phosphite on the control of downy mildew of grapevine and physico-chemical characteristics of Merlot grapes

Abstract –This study aimed to determine the effect of increasing doses of two formulations of potassium phosphite on the severity of downy mildew on yield and the physicochemical characteristics of Merlot grapes. Two formulations were evaluated for potassium phosphite (Phi A and B) in doses of 0, 1.2, 2.5, 3.7 and 5.0 g L⁻¹ of P₂O₅, compared with foliar fertilizer and fungicide during harvests in 2009/2010 and 2010/2011. There was a linear effect of doses phosphites in reducing the severity of the downy mildew, in two seasons, with the highest dose, the Phi A provided control average of 60.5% and 57.7% of Phi B, similar to the fungicide (64.3%) and fertilizer (53.3%). In the first harvest, Phi B provided greater productivity, while in the second, did not differ from the treatment with fungicides. In the first season, there was no effect of treatments on soluble solids, pH and total acidity of the wine, while in the second season all the treatments gave rise to these parameters. Phi B and fungicides provided higher levels of total soluble phenolic compounds at the grape peel, having no effect on anthocyanins. Potassium phosphite is an effective alternative for the control of downy mildew, with a similar response to that of fungicides.

Index terms: *Plasmopara viticola*, *Vitis vinifera*, phenolic compounds, alternative control.

INTRODUÇÃO

O míldio, causado pelo oomiceto *Plasmopara viticola* [(Berk.& Curt) Berl. & de Toni] é uma das doenças mais prejudiciais aos vinhedos. Esse patógeno pode infectar todos os órgãos vegetativos da videira, tornando-se crítico quando infecta a planta no início do florescimento até a frutificação, pois ocasiona infecção de bagas jovens, levando a uma redução da produtividade (Sônego & Garrido, 2005; Hofmann, 2011).

O método mais utilizado pelos viticultores para controle do míldio consiste na aplicação de fungicidas específicos de contato e sistêmicos (Sônego & Garrido, 2005). Entretanto, estes produtos podem levar a seleção de populações resistentes aos princípios ativos utilizados (Madden et al., 2000). Além disso, a intensa aplicação pode acarretar contaminação ambiental, intoxicação dos agricultores, prejuízo à fermentação alcoólica por afetar a população das leveduras, riscos de resíduos de fungicidas nas uvas, além de aumentar o custo de produção (Álvarez et al., 2012; Sônego & Garrido, 2005).

O processo produtivo agrícola sofre pressão da sociedade pela produção de alimentos de forma sustentável e sem resíduos. Por essa razão, existe uma busca contínua por alternativas que sejam capazes de auxiliar no controle de doenças, mas que não representem risco ao homem e ao meio ambiente (Stadinik & Talamini, 2004). Os fosfitos vêm sendo muito utilizados para o controle de doenças em diversas culturas, tais como ferrugem da videira, ferrugem e oídio do trigo, míldio da soja, podridão em maçãs, e já demonstraram eficiência contra vários outros patógenos, inclusive contra o míldio da videira (Sautter et al., 2008; Sônego & Garrido, 2005; Pereira et al., 2010; Gomes et al., 2011; Santos et al., 2011; Silva et al., 2011).

Gomes et al. (2011) observaram que plantas de videira cv. Isabel, tratadas com fosfito de potássio (130 g 100 L⁻¹) apresentaram 11,47% de redução da incidência do míldio e produtividade média de 3,83 t ha⁻¹ de uvas, semelhante ao

tratamento com fungicidas. Peruch & Bruna (2008) observaram redução de 76% na incidência de míldio em cachos de videira cv. Goethe, quando utilizaram aplicação de fosfitos de potássio na dose de 0,3%. Na maioria dos estudos parece ocorrer uma ação direta do íon fosfito no patógeno, contudo, alguns autores relatam que o fosfito também apresenta uma ação indutora, por meio da ativação de respostas de defesa nas plantas. Estas respostas podem ser expressas pela produção de fitoalexinas, acúmulo de lignina, fenóis solúveis e ativação de outros compostos de defesa nas plantas (Jackson et al., 2000; Daniel & Guest, 2005; Nojosa et al., 2005; Sautter et al., 2008).

Os compostos fenólicos são componentes importantes nos derivados da uva, como sucos e vinhos, contribuindo para as características sensoriais como cor, sabor, adstringência e estrutura do vinho, por ação direta ou por interação com proteínas, polissacarídeos ou outros compostos fenólicos (Abe et al., 2007). Em uvas tintas, as antocianinas constituem a maior porcentagem de compostos fenólicos, representando um constituinte importante para a produção de vinhos tintos porque contribuem para os atributos sensoriais e, principalmente, para a coloração do vinho e do mosto de uvas (Muñoz-Espada et al., 2004; Brunetto et al., 2007; Abe et al., 2007). Os compostos fenólicos são essenciais para a pigmentação dos vegetais, além de apresentarem efeito contra patógenos, pois plantas doentes podem produzir compostos fenólicos para a defesa (Iriti et al., 2011).

Algumas doenças que afetam a videira, como o míldio, podem afetar a qualidade físico-química das bagas, interferindo na síntese destes compostos (Sônego et al., 2005; Gil & Psczolkocwski, 2007). Produtos utilizados no controle de doenças da videira também podem influenciar na qualidade final das uvas e de seus derivados. Por isso torna-se importante conhecer a influência de produtos alternativos no controle das doenças, bem como o efeito destes na

qualidade da produção (Dugo et al.; 2004; Cuš & Raspor, 2008; Álvarez et al., 2012).

Este trabalho teve como objetivo determinar o efeito de doses crescentes de duas formulações de fosfitos de potássio na severidade do míldio da videira, produtividade e características físico-químicas de uvas Merlot.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em duas safras, 2009/2010 e 2010/2011, em vinhedo, localizado no Núcleo Tecnológico Epamig Uva e Vinho, em Caldas (MG) a 1.150m de altitude, latitude 21° 55' 25'' S e longitude 46° 23' 10'' W. Foram utilizadas plantas da cultivar *Vitis vinifera* Merlot (Clone 343) com seis anos de idade, enxertadas sobre o porta-enxerto 1103 Paulsen, em espaçamento de 2,5 x 1,5 m, e conduzida em espaldeira com três fios de arame. As plantas foram conduzidas em duplo cordão esporonado (sistema Royat), podadas com poda curta (duas gemas) e permaneceram com 20 a 22 gemas, o que resultou em um total de 50 a 55 mil gemas por hectare.

Os tratamentos consistiram na aplicação de fertilizante foliar Fulland (Sudoeste Fertilizantes Ltda., Araxá, MG) com formulação 46,55 g L⁻¹ de Cu, 266 g L⁻¹ de P₂O₅ e 23,27 g L⁻¹ de S, fosfitos de potássio Phi A (Pepfós; Pepita Fertilizantes Ltda.; Poços de Caldas, MG) com formulação 280 g L⁻¹ de K₂O e 420 g L⁻¹ de P₂O₅ e Phi B (Reforce; Agrichem do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, SP) com formulação 240 g L⁻¹ de K₂O e 340 g L⁻¹ de P₂O₅, e de um tratamento químico, com emprego alternado dos fungicidas Cabrio Top (metiram 550 g kg⁻¹ e piraclostrobina 50 g kg⁻¹; BASF S.A., São Paulo, SP), Daconil (clorotalonil 500 g L⁻¹; Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., Paulínia, SP) e Ridomil (metalaxil-M 40 g kg⁻¹ e mancozeb 640 g kg⁻¹; Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., Paulínia, SP), além da testemunha sem pulverização.

Foram utilizadas cinco doses de cada fosfito de potássio (Phi A e Phi B) em concentrações equivalentes a 0; 0,525; 1,05; 1,58 e 2,1 g L⁻¹ de P₂O₅. De acordo com a dose de P₂O₅ utilizou-se para Phi A as doses de 0; 1,25; 2,5; 3,76 e 5,0 mL L⁻¹ e para Phi B as doses de 0; 1,5; 3,0; 4,5 e 6,0 mL L⁻¹. O fertilizante foliar Fulland foi aplicado em uma dose de 5,9 mL L⁻¹ e o tratamento químico consistiu na pulverização, de forma alternada, dos fungicidas Cabrio Top (2 g L⁻¹), Daconil (2 g L⁻¹) e Ridomil (2,5 g L⁻¹). As pulverizações foram realizadas a partir da brotação das videiras, em intervalos semanais, totalizando 12 aplicações, realizadas com pulverizador costal manual, até o ponto de escorrimento. Foi adicionado à calda de pulverização 0,05% de óleo mineral e o volume aplicado variou de 700 a 1.000 L ha⁻¹, de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta.

A severidade do míldio nas folhas foi avaliada quinzenalmente iniciando-se com o surgimento dos primeiros sintomas. Nas duas safras foram realizadas cinco avaliações até o momento da colheita, com início na safra 2009/2010 em 05/11/2009 e na safra 2010/2011, em 18/11/2010. Para tanto, foi utilizada a escala de notas proposta por Azevedo (1997), com algumas modificações. A severidade do míldio foi avaliada em toda a planta, dentro da parcela útil, utilizando uma escala com notas que variaram de 0 a 5, sendo nota 0 atribuída para plantas com ausência de sintomas; nota 1 para plantas com 0,1 a 5% de área foliar lesionada, nota 2 de 5,1 a 25%; nota 3 de 25,1 a 35%; nota 4 de 35,1 a 50% e nota 5 quando as folhas apresentavam mais de 50% das área foliar lesionada (Anexo I). A partir dos resultados dessas avaliações, foram calculados os níveis de severidade e a área abaixo da curva de progresso da severidade do míldio da videira (AACPSD) para cada tratamento. Os índices de controle do míldio foram obtidos pela relação $1 - (x/y)$, em que x representa o índice da doença das plantas tratadas e y representa o índice de doença da testemunha (Li et al., 1996).

Nas duas safras, além da quantificação da severidade do míldio, foram avaliadas a produtividade e a qualidade da baga para as doses dos fosfitos que apresentaram maior controle do míldio, e para os tratamentos com fertilizante foliar e fungicidas. A produtividade e a estimativa de produção foram determinadas com base na massa dos cachos (kg) por parcela; número total de cachos por parcela, número total de cachos no pintor e massa média dos cachos e das bagas, expressos em gramas (g). O teor de sólidos solúveis totais ($^{\circ}$ Brix) foi determinado em refratômetro digital portátil (Atago modelo Pal 1); acidez total titulável por meio de titulação com NaOH 0,1 N utilizando-se fenolftaleína como indicador, seguindo a técnica descrita na Association of Official Analytical Chemists (1990); e avaliação do pH por meio de medidor de pH (Micronal modelo B-474) calibrado com padrões 4,0 e 7,0. Na segunda safra, 2010/2011, além das avaliações mencionadas, as cascas de 150 bagas por tratamento por parcela foram separadas, pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para determinação do teor de antocianinas e fenólicos totais. Para a determinação dos compostos fenólicos, 150 mg de casca triturada em nitrogênio líquido foram homogeneizadas em Ultra Turrax (IKA T-18 basic) em solução extratora constituída de metanol acidificado (HCl 1%). As antocianinas foram determinadas pelo método do pH diferencial (Giusti & Wrolstad, 2000). Os fenólicos totais foram analisados pelo método de Folin-Ciocalteu com base em uma curva padrão de ácido gálico (Amerine & Ough, 1980).

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso em esquema fatorial (2 produtos x 5 doses x 2 adicionais - Fungicidas e Fertilizante Foliar Fulland), com quatro repetições de seis plantas em linha por parcela, com parcela útil formada pelas quatro plantas centrais da linha de plantio. Foi utilizada também bordadura de uma linha, entre as linhas que receberam pulverização com os tratamentos. Foram realizadas análises de regressão para as

doses dos fosfitos de potássio com os dados da AACPSD. Os tratamentos adicionais foram comparados às doses dos fosfitos por meio do teste de Dunnett ($p \leq 0,05$), utilizando-se o programa Statistical Analyses System (SAS v. 9.0). Os dados de produtividade e de características físico-químicas dos frutos foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa Sisvar. As médias, quando significativas pelo teste F foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito de doses de Phi A e Phi B, baseados nos teores de P_2O_5 , na área abaixo da curva do progresso da severidade do míldio (AACPSD) (Figura 1). Com o aumento das doses, houve redução na AACPSD de forma linear, comportamento similar para as duas formulações de fosfito utilizadas. Dentre as doses avaliadas para os dois fosfitos de potássio, aquelas com maior concentração de P_2O_5 ($2,1 \text{ g L}^{-1}$ de P_2O_5) proporcionaram maiores reduções na severidade do míldio da videira para as duas safras avaliadas, com controle médio de 60,5% para fosfito Phi A e 57,7% para Phi B em relação à testemunha.

Na primeira safra (2009/2010) foi observado que os tratamentos com Phi A na menor dose ($0,525 \text{ g de } P_2O_5 \text{ L}^{-1}$) e a testemunha (dose 0) apresentaram maior severidade do míldio da videira diferindo estatisticamente do tratamento controle padrão com fungicidas e do fertilizante foliar Fulland (Tabela 1). Entretanto, plantas tratadas com Phi A nas maiores doses, equivalentes a $1,05$; $1,58$ e $2,1 \text{ g de } P_2O_5 \text{ L}^{-1}$, apresentaram controle variando de 42,4 a 61,8 %, semelhante estatisticamente àquele proporcionado pelo tratamento padrão com fungicidas (63,5%) e com fertilizante foliar Fulland (58,4%). Para o tratamento com Phi B, apenas a dose com maior teor de P_2O_5 ($2,1 \text{ g L}^{-1}$) reduziu significativamente a severidade do míldio, não diferindo estatisticamente do tratamento padrão com fungicidas. Quando os tratamentos com Phi B foram

comparados com o fertilizante foliar Fulland, apenas a menor dose, equivalente a $0,525 \text{ g de } \text{P}_2\text{O}_5 \text{ L}^{-1}$, apresentou diferença significativa. Esse fosfito, aplicado nas demais doses, proporcionou severidade do míldio semelhante ao tratamento com o fertilizante foliar Fulland, com controle da doença variando de 47,4 a 55,0%.

Na segunda safra (2010/2011), os fosfitos Phi A e Phi B proporcionaram maior controle da doença, semelhantes ao controle padrão pela aplicação alternada de diferentes fungicidas, quando foram utilizados em doses equivalentes a 1,58 e 2,1g de $\text{P}_2\text{O}_5 \text{ L}^{-1}$ para Phi A e Phi B. Imagens dos tratamentos com as diferentes doses do Phi A e Phi, em comparação aos demais tratamentos encontram-se no anexo II e III. Vários trabalhos relatam a eficiência de fosfitos de potássio no controle de doenças de plantas, além do seu duplo modo de ação, sendo tóxico diretamente nos patógenos e atuando indiretamente pela ativação de mecanismos de defesa nas plantas e, conseqüentemente proporcionando maior controle das doenças (Jackson et al., 2000; Nojosa et al., 2005; Sônego & Garrido, 2005; Pereira et al., 2010; Santos et al., 2011).

Silva et al. (2011), ao avaliarem doses de fosfitos de potássio no controle do míldio da soja, observaram que o aumento de teores de fosfito (750 e 1500g de P_2O_5 - 30% P_2O_5 + 20% K_2O) resultou em um controle superior a 50% da doença, além de maior rendimento de grãos e menor incidência de patógenos nas sementes. Pereira et al. (2010) observaram que diferentes fontes de fosfito de potássio na dose de $6,0 \text{ ml L}^{-1}$, proporcionaram controle entre 56 e 80% do míldio em folhas de videira cultivar Merlot, quando comparadas a testemunha sem pulverização.

Para as avaliações de produtividade e análises físico-químicas das bagas, na primeira safra, o Phi B destacou-se quando comparado aos demais tratamentos, apresentando melhor desempenho na produtividade, estimativa de produção e maior massa média de cachos e bagas, até mesmo quando

comparado ao tratamento com fungicidas (Tabela 2). Na segunda safra, o tratamento Phi B não diferiu estatisticamente do tratamento com fungicidas, apresentando maior produtividade, estimativa de produção e massa de cachos e bagas em relação aos tratamentos testemunha, Phi A e fertilizante foliar. Contudo, para os números de cachos colhidos, todos os tratamentos foram estatisticamente semelhantes ao fungicida e superiores à testemunha.

Na safra 2009/2010 foi obtido baixa produtividade, que pode estar relacionada às condições climáticas desfavoráveis verificadas, principalmente no período de inflorescência das videiras, onde foram registrados 127,9 mm de chuva concentrados em apenas três dias com alta umidade relativa média (82%), que pode ter favorecido o ataque do míldio nas inflorescências, acarretando menor produção. Ainda nesta safra, na fase final de maturação ocorreu alto índice pluviométrico (183 mm), alta umidade relativa do ar (84%) e poucas horas de insolação (46 h), acarretando podridões e elevando as perdas na colheita. Em 2010/2011, as condições climáticas, tais como, temperaturas médias máximas em torno de 28,1° C, pluviosidade média de 97,8 mm; umidade relativa do ar em torno de 80% e o período de insolação de 105 horas foram favoráveis à maturação das uvas, que permitiu maturação fenólica próxima das condições ideais para colheita, além de maior produtividade.

Doenças fúngicas prejudicam a produção de uvas com efeitos negativos na cor, aroma e sabor do vinho (Sônego et al., 2005). O clima, principalmente o microclima do vinhedo, apresenta grande influência sobre a qualidade e composição química das bagas, pois favorecem o aparecimento e aumento de doenças, além de interferir na fisiologia da planta, refletindo na síntese de compostos importantes, como fenólicos e antocianinas (Mullins et al., 1992; Conde et al., 2007; Gil & Pszczolkocuski, 2007).

Peruch & Bruna (2008) não observaram aumento na produtividade da videira cv. Goethe com o aumento de doses de fosfitos de potássio, apesar de

terem obtido redução de 94% da severidade do míldio nas folhas e 76% da incidência de doença nos cachos na maior dose utilizada (0,3%). Silva et al. (2011) verificaram rendimento de grãos de soja, tratados com fosfito de potássio, semelhantes ao de plantas tratadas com fungicida, corroborando com os dados obtidos nesse trabalho, onde plantas tratadas com fosfito de potássio apresentaram produtividade igual ou superior a de plantas tratadas com fungicidas. Gomes et al. (2011) verificaram que fosfitos de potássio (130g 100 L⁻¹) proporcionaram características de produtividade, tais como kg planta⁻¹, número de cachos planta⁻¹, massa da baga e comprimento do cacho em videiras 'Isabel' semelhantes e até melhores que plantas tratadas com fungicidas, porém acarretou aumento na acidez titulável e no pH do mosto.

Para as características analíticas das bagas, na primeira safra não foi observado efeito significativo dos tratamentos no teor de sólidos solúveis, pH e acidez total titulável do mosto (Tabela 3). Entretanto, na segunda safra, todos os tratamentos avaliados, Phi A e Phi B, fertilizante foliar Fulland e fungicidas, proporcionaram mudanças nesses parâmetros avaliados, não diferindo entre si, mas superiores à testemunha. Pereira et al. (2010) também não observaram diferenças na qualidade analítica de bagas tratadas com fosfitos. Já Gomes et al. (2011) observaram que videiras 'Isabel' tratadas com fosfito de potássio (130g 100 L⁻¹) e bioflavonóides cítricos, apresentaram teor de sólidos solúveis de 18,9°Brix e pH em torno de 3,0 no mosto, ficando dentro dos limites de maturação estabelecidos para a cultura, quando comparados a testemunha sem pulverização.

A severidade do míldio pode alterar o metabolismo da videira, ocasionando menor acúmulo de metabólitos nos frutos, o que resulta em menor teor de sólidos solúveis totais (Mullins et al., 1992). Além disso, a alta incidência da doença e excesso de chuva no período de maturação das uvas pode levar a podridão das bagas, acarretando maior ocorrência de insetos e micro-

organismos, como bactérias, além de favorecer o aumento da acidez do mosto (Conde et al., 2007). Neste presente trabalho, foi observado que plantas que não receberam nenhum tipo de tratamento, além de apresentarem maior severidade da doença, também apresentaram menor teor de °Brix e maior acidez quando comparadas às plantas que receberam algum tipo de tratamento.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos para o teor de antocianinas totais, porém nos tratamentos com fungicida e Phi B observou-se maior teor de fenóis solúveis totais nas cascas quando comparados aos demais tratamentos (Tabela 4). Sautter et al. (2008) não observaram diferenças nos níveis de polifenóis totais, sólidos solúveis totais, acidez titulável e antocianinas totais em maçãs ‘Gala’ tratadas com fosfito de potássio ($1,27 \text{ g L}^{-1} \text{ P}_2\text{O}_5$ e $1,18 \text{ g L}^{-1} \text{ K}_2\text{O}$) quando comparadas à testemunha, porém este tratamento proporcionou menor diâmetro de lesões ocasionadas por *Penicillium* sp.

Os metabólitos secundários, tais como compostos fenólicos e fitoalexinas são acumulados nos tecidos vegetais em resposta a infecção por patógenos, estresses abióticos e também pela aplicação de produtos que são capazes de induzir resistência nas plantas, acarretando maior acúmulo na quantidade de metabólitos de defesa (Hukkanem et al., 2007; Iriti et al., 2011). Neste trabalho foi observado o aumento de compostos fenólicos solúveis totais no mosto de bagas de plantas tratadas com o fosfito de potássio Phi B (Tabela 4).

O modo de ação do ânion fosfito nas plantas tem sido relacionado ao aumento da resposta de hipersensibilidade (morte celular), lignificação, ativação do metabolismo e aumento de fitoalexinas, além da atuação direta contra o patógeno (Daniel & Guest, 2005). Apesar de ter sido verificado proteção contra o míldio da videira pelas diferentes fontes de fosfito de potássio, foram observadas diferenças nos parâmetros avaliados, podendo ser explicadas pelos

tipos de componentes de cada formulação, aditivos e matéria prima de cada fabricante.

O presente estudo demonstrou que fosfitos de potássio são promissores no controle do míldio da videira, tornando-se uma alternativa aos fungicidas utilizados na cultura, pois além de controlar a doença, podem aumentar os teores de compostos fenólicos solúveis totais.

CONCLUSÕES

1. A pulverização de fosfitos de potássio, com P_2O_5 em doses crescentes, reduz a severidade do míldio da videira, sendo que a concentração de 2,1g de P_2O_5 para Phi A e Phi B é eficiente para controlar o míldio da videira.
2. O fosfito de potássio Phi B, na dose de 2,1g de P_2O_5 proporciona maior produtividade da videira, semelhante ao controle químico padrão com fungicidas.
3. O emprego de fosfitos de potássio no manejo do míldio da videira aumenta os teores de compostos fenólicos solúveis totais nas uvas.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de doutorado do primeiro autor e bolsa produtividade do segundo autor; e à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, pelo suporte técnico.

REFERÊNCIAS

ABE, L.T.; DA MOTA, R.V.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**.v. 27, n.2, p. 394-400, 2007.

- ÁLVAREZ, M.G.; NOGUEROL-PATO,R.; GONZÁLEZ-BARREIRO,C.; CANCHO GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA,J..Changes of the sensorial attributes of white wines with the application of new anti-mildew fungicides under critical agricultural practices.**Food Chemistry**. v. 130, p.139–146, 2012.
- AMERINE, M.A., OUGH, C.S. **Methods for analysis of musts and wines**. New York: John Wiley.p. 341, 1980.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS.Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.15. ed. Washington,v.2,1990.
- AZEVEDO, L.A.S. de. **Manual de quantificação de doenças de plantas**. São Paulo: Ciba Agro e Novartis, 1997. 114p.
- BRUNETTO, G.; CERETTA, C.A.; KAMINSKI,J.; MELO, G.W.B.; LOURENZI, C.R.; FURLANETTO, V.; MORAES, A.. Aplicação de nitrogênio em videiras na Campanha Gaúcha: Produtividade e características químicas do mosto da uva. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.2, p.389- 393, 2007.
- CONDE, C.; SILVA, P.; FONTES, N.; DIAS, A.C.P.; TAVARES, R.M.; SOUSA, M.J.; AGASSE, A.; DELROT, S.; GERÓS, H. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. **Food**, v.1, p.1-22, 2007.
- CUŠ, F.; RASPOR, P.. The effect of pyrimethanil on the growth of wine yeasts. **Letters in Applied Microbiology**, v.47(1), p.54–59, 2008.
- DANIEL, R.; GUEST, D. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*.**Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.67, p.194-201, 2005.
- DUGO, G.; SAITTA, M.; GIUFFRIDA, D.; VILASI, F.; LA TORRE, G. L.. Determination of resveratrol and other phenolic compounds in experimental wines from grapes subjected to different pesticide treatments. **Italian Journal of Food Science**, v.16, p.305–321, 2004.

GIL, G.F.; PSZCZÓLKOWSKI, P. **Viticultura: fundamentos para optimizar producción y calidad**. Chile: Ediciones Universidad Católica de Chile, 2007. 535p.

GIUSTI, M.M., WROSLTAD, R.E. Characterization and measurement of anthocyanins by uv-visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Willey, 2000. Disponível em: <<http://www.does.org/masterli/facsample.htm>>. Acesso em: 23 nov. 2004.

GOMES, E.C.S.; LEITE, R.P.; SILVA, F.J.A.; CAVALCANTI, L.S.; NASCIMENTO, L.C.; SILVA, S.M. Manejo do míldio e ferrugem em videira com indutores de resistência: produtividade e qualidade pós-colheita. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p.332-335, 2011.

HOFMANN, U. Optimisation of downy mildew (*Plasmopara viticola*) control in organic viticulture with low copper doses, new copper formulations and plant strengtheners, results of 20 years of on farm research. **ECO-CONSULT**, International Consultancy of Organic Viticulture. Germany: Geisenheim. Disponível em: <<http://www.eco-consult.net>>. Acesso em 16 agosto de 2011.

HUKKANEM, A.T.; KOKKO, H.I.; BUCHALA, A.J.; MCDUGALL, G.J.; STEWART, D.; KARENLAMPI, S.O. Benzothiadiazole induces the accumulation of phenolics and improves resistance to powdery mildew in strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.1862–1870, 2007.

IRITI, M.; VITALINI, S.; DI TOMMASO, G.; D'AMICO, S.; BORGIO, M.; FAORO, F. New chitosan formulation prevents grapevine powdery mildew infection and improves polyphenol content and free radical scavenging activity of grape and wine **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.17, p.263–269, 2011.

JACKSON, T. J.; BURGESS, T.; COLQUHOUN, I.; HARDY, G. E. S. T. J. Action of the fungicide phosphonate on *Eucalyptus marginata* inoculated with

Phytophthora cinnamomi. **Plant Pathology**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 147–54, Feb. 2000.

LI, J.; ZINGEN-SELL, I.; BUCHENAUER, H. Induction of resistance of cotton plants to *Verticillium* wilt and of tomato plants to *Fusarium* wilt by 3-aminobutyric acid and methyl jasmonate. **Journal of Plant Diseases and Plant Protection**, v.103, p.288-299, 1996.

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

MULLINS M.G.; BOUQUET, A.; WILLIAMS, L.E. **Biology of the grapevine**. Cambridge: Cambridge University, p.239, 1992.

MUÑOZ-ESPADA, A. C.; WOOD, K.V.; BORDELON, B.; WATKINS, B.A..Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch Grapes and wines.**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6779-6786, 2004.

NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, A. V. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S.(Ed.). **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 139-153.

PEREIRA, V.F.; RESENDE, M.L.V.; MONTEIRO, A.C.A.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; REGINA, M.A.; MEDEIROS, F.C.L. Produtos alternativos na proteção da videira contra o míldio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.25-31, 2010

PERUCH, L.A.M.; BRUNA, E.D. Relação entre doses de calda bordalesa e de fosfito potássico na intensidade do míldio e na produtividade da videira cv. ‘Goethe’. **Ciência Rural**, v.38, p.2413-2418, 2008.

SANTOS, H.A.A.; DALLA PRIA, M.; SILVA, O.C.; MAY DE MIO, L.L. Controle de doenças do trigo com fosfitos e acibenzolar-s-metil isoladamente ou associados a piraclostrobina + epoxiconazole. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 433-442, 2011.

SAUTTER, C.K.; STORCK, L.; RIZZATI, M.R.; MALLMANN, C.A.; BRACKMANN, A. Síntese de trans resveratrol e controle de podridão em maçãs com uso de elicitores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1097-1103, 2008.

SILVA, O.C.; SANTOS, H.A.A.; DALLA PRIA, M.; MAY-DE MIO, L.L. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. **Crop Protection**, v.30, p.598-604, 2011.

SÔNEGO, O. R. & GARRIDO, L. R. Avaliação da eficácia de algumas marcas comerciais de fosfito de potássio e de fosfonato de potássio no controle do míldio da videira. Bento Gonçalves : **Embrapa Uva e Vinho**, 2005. 13p. (**Boletim**).

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.. Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil. Bento Gonçalves : **Embrapa Uva e Vinho**, 2005. 25p. (**Circular técnica, 56**).

STADINIK, M.J.; TALAMINI (Eds.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004.

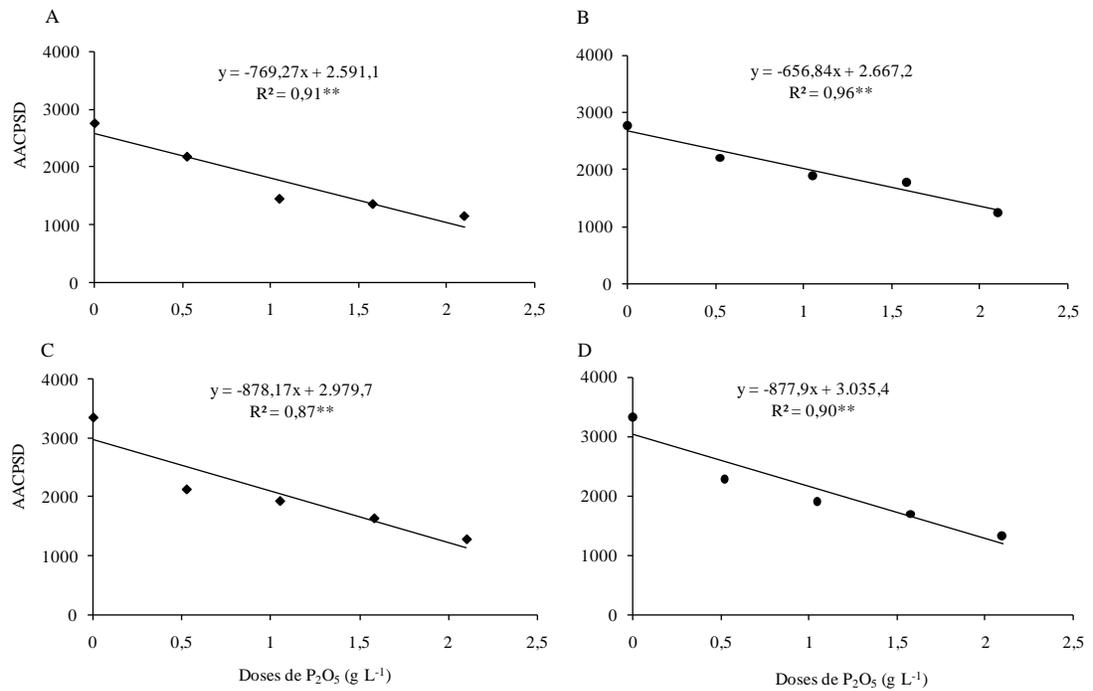


Figura 1 Doses de fosfitos de potássio, Phi A (A e C) e Phi B (B e D) baseados nos teores de P₂O₅ de cada produto, na área abaixo da curva de severidade do míldio (AACPSD) em folhas de videira Merlot durante as safras 2009/2010 (A e B) e 2010/2011 (C e D). ******Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Tabela 1. Efeito de doses de fosfitos de potássio, Phi A e Phi B, baseados nos teores de P_2O_5 de cada produto, na área abaixo da curva de severidade do míldio em folhas de videira (AACPSD) cultivar Merlot durante as safras 2009/2010 e 2010/2011, comparados com os tratamentos controle padrão com fungicidas e fertilizante foliar.

Produtos	Teor P_2O_5 (g L ⁻¹)	Doses (mL L ⁻¹)	AACPSD	Significância		Controle (%)
Safra 2009/2010						
Testemunha	0,0	---	2762,5	*	*	---
Phi A	0,525	1,25	2183,6	*	*	21,0
Phi A	1,05	2,5	1452,9			47,4
Phi A	1,58	3,76	1361,3			50,7
Phi A	2,1	5,0	1152,5			58,3
Phi B	0,525	1,5	2200,0	*	*	20,4
Phi B	1,05	3,0	1895,0	*		31,4
Phi B	1,58	4,5	1781,9	*		35,5
Phi B	2,1	6,0	1245,0			55,0
Fungicida			965,0	---		65,1
Fertilizante foliar Fulland			1431,6		---	48,2
Safra 2010/2011						
Testemunha	0,0	---	3337,3	*	*	---
Phi A	0,525	1,25	2119,8	*	*	36,5
Phi A	1,05	2,5	1922,4	*		42,4
Phi A	1,58	3,76	1629,1			51,2
Phi A	2,1	5,0	1218,5			61,8
Phi B	0,525	1,5	2288,3	*	*	31,4
Phi B	1,05	3,0	1913,4	*		42,7
Phi B	1,58	4,5	1700,0			49,1
Phi B	2,1	6,0	1324,5			60,3
Fungicida			1218,5	---		63,5
Fertilizante foliar Fulland			1388,3		---	58,4

*Significativo pelo teste Dunnett a 5% de probabilidade, quando comparado com o tratamento com fungicidas na primeira coluna e fertilizante foliar Fulland na segunda coluna de significância. Tratamento fungicida, aplicação alternada dos fungicidas Cabrio Top, Daconil e Ridomil.

Tabela 2. Efeito dos tratamentos na produtividade, número de cachos colhidos, massa média de cachos e das bagas de videira cv. Merlot⁽¹⁾.

Tratamento	Produtividade (kg/parcela)	Cachos colhidos	Estimativa produção (kg/parcela)	Massa Média cachos (g)	Massa bagas (g)
Safra 2009/2010					
Testemunha	0,10e	11,5a	0,3d	8,9c	1,4b
Fungicidas	0,81b	16,3a	3,6a	53,5a	1,5b
Fertilizante foliar Fulland	0,38d	15,0a	1,5c	25,3b	1,6b
Phi A (2,1g de P ₂ O ₅ L ⁻¹)	0,61c	16,3a	2,5b	37,6b	1,6b
Phi B (2,1g de P ₂ O ₅ L ⁻¹)	0,93a	14,3a	3,6a	67,5a	2,1a
Safra 2010/2011					
Testemunha	0,16c	20,0b	1,03b	7,9c	0,7c
Fungicidas	2,67a	41,5a	29,5a	65,3a	1,5a
Fertilizante foliar Fulland	1,29b	42,0a	13,6b	33,7b	1,2b
Phi A (2,1g de P ₂ O ₅ L ⁻¹)	1,52b	44,5a	14,3b	28,9b	1,3b
Phi B (2,1g de P ₂ O ₅ L ⁻¹)	1,93a	47,5a	23,3a	47,4a	1,4a

⁽¹⁾Médias com mesma letra na coluna não diferem pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Tratamento fungicida, aplicação alternada dos fungicidas Cabrio Top, Daconil e Ridomil.

Tabela 3. Efeito dos tratamentos nas características analíticas das bagas, sólidos solúveis totais, acidez total titulável e pH da cultivar Merlot⁽¹⁾.

Tratamento	Sólidos solúveis totais (°Brix)	pH	Acidez total titulável (g L ⁻¹ ácido tartárico)
Safrá 2009/2010			
Testemunha	15,9 ^{ns}	3,3 ^{ns}	9,1 ^{ns}
Fungicidas	16,4	3,2	9,1
Fertilizante foliar Fulland	16,4	3,2	9,6
Phi A (2,1g P ₂ O ₅)	16,1	3,2	9,0
Phi B (2,1g P ₂ O ₅)	15,8	3,2	8,9
Safrá 2010/2011			
Testemunha	18,0b	2,8b	9,8b
Fungicidas	19,2a	3,3a	8,2a
Fertilizante foliar Fulland	19,5a	3,4a	8,6a
Phi A (2,1g P ₂ O ₅)	18,8a	3,5a	8,4a
Phi B (2,1g P ₂ O ₅)	19,1a	3,5a	8,6a

⁽¹⁾Médias com mesma letra na coluna não diferem pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. ns, não significativo pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Tratamento fungicida, aplicação alternada dos fungicidas Cabrio Top, Daconil e Ridomil.

Tabela 4. Efeito dos tratamentos nos teores de compostos fenólicos solúveis totais e antocianinas nas cascas de uvas da cultivar Merlot na safra 2010/2011⁽¹⁾.

Tratamento	Antocianinas (mg g ⁻¹ de casca)	Compostos fenólicos solúveis totais (mg g ⁻¹ de casca)
Fungicida	3,5 ns	17,9a
Fertilizante foliar	3,2	12,2b
Fulland	3,0	12,6b
Phi A (2,1g P ₂ O ₅)	2,7	16,8a
Phi B (2,1g P ₂ O ₅)		

⁽¹⁾Médias com mesma letra na coluna não diferem pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$); ns = não significativo pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Tratamento fungicida, aplicação alternada dos fungicidas Cabrio Top, Daconil e Ridomil.

ARTIGO 3

Controle do míldio da videira: características físico-químicas e teores de *trans*-resveratrol das bagas e vinhos.

CONTROLE DO MÍLDIO DA VIDEIRA: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E
TEORES DE TRANS-RESVERATROL DAS BAGAS E VINHOS.

Vanessa Foresti Pereira⁽¹⁾, Mário Lúcio Vilela de Resende⁽¹⁾, Pedro Martins Ribeiro Júnior⁽¹⁾, Murillo de Albuquerque Regina⁽²⁾, Renata Vieira da Mota⁽²⁾ e Luiz Rodolpho Rodrigues Vitorino⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Campus Ufla, Caixa Postal 3.037, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: vanessaforesti@yahoo.com.br, mlucio@ufla.br, ribeirojuniorpm@yahoo.com.br, rodolphovitorino@hotmail.com ⁽²⁾Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Núcleo Tecnológico Epamig Uva e Vinho, Avenida Santa Cruz, no 500, Caixa Postal 33, CEP 37780-000 Caldas, MG. E-mail: murillo@epamigcaldas.gov.br, renata@epamigcaldas.gov.br

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho avaliar fosfitos e aplicação alternada de fosfitos com fungicida no controle do míldio da videira, nas características físico-químicas das uvas, produtividade e teores de *trans*-resveratrol de bagas e vinhos. O experimento foi realizado, na safra 2011/2012, em vinhedo localizado no Núcleo Tecnológico Epamig Uva e Vinho, em Caldas (MG), utilizando videiras *Vitis vinifera* cv. Merlot. Os tratamentos consistiram na aplicação de fertilizante foliar Fulland (5,9 mL L⁻¹), fosfitos de potássio Phi A (5,0 mL L⁻¹) e Phi B (6,0 mL L⁻¹), tratamento químico, com emprego alternado de fungicidas, além do tratamento com Phi A alternado com tratamento químico (fungicidas) e da testemunha, sem pulverização, com quatro repetições e parcela experimental composta por três plantas. As aplicações foram semanais, totalizando 12 aplicações. Foi avaliada, quinzenalmente, a severidade do míldio nas folhas e

calculado o índice de controle em relação à testemunha sem pulverização. Exceto para testemunha, foram avaliadas a produtividade, a qualidade da baga e o teor de *trans*-resveratrol nas cascas e no vinho. Os tratamentos Fulland, o Phi A alternado com fungicidas e o tratamento com fungicidas proporcionaram maior controle da doença com 73,3, 81,5 e 82,5%, respectivamente. Os tratamentos com Phi A e Phi B proporcionaram controle intermediário com 66,0 e 64,6%, respectivamente. O tratamento Phi A alternado com fungicidas proporciona maior produtividade, número e massa de cachos e massa de bagas, semelhante ao tratamento com fungicidas. Os fosfitos não alteram as características físicas das bagas e os teores de antocianinas e compostos fenólicos solúveis totais, mas podem influenciar os teores de *trans*-resveratrol nas cascas e nos vinhos. Todos os tratamentos podem ser utilizados como alternativa de controle para *Plasmopara viticola*.

Palavras chave: Fosfitos, Fertilizantes foliares, *Plasmopara viticola*, *Vitis vinifera*, pós-colheita, *trans*-resveratrol

ABSTRACT

The goal of this work was to evaluate phosphites and their alternated application with fungicide for managing downy mildew on grapevine, and on the physical-chemical properties of wine, on productivity, and on the *trans*-resveratrol levels on berries and wine. The experiment was conducted during the 2011/2012 growing season in a orchard located in the Núcleo Tecnológico Epamig Uva e Vinho, in Caldas (MG). The grapevine *Vitis vinifera* cv. Merlot was used. The treatments were: leaf fertilizer Fulland (5.9 mL L⁻¹), potassium phosphite Phi A (5.0 mL L⁻¹) and Phi B (6.0 mL L⁻¹), chemical treatment with alternated use of fungicides, and the Phi A treatment alternated with fungicide, and the control without application. The experiment had four replicates with three plants each. The applications were performed weekly for 12 weeks. The downy mildew severity was evaluated in the leaves every 15 days and the control index was calculated in comparison to the control sample (without application). The productivity, berry quality, and *trans*-resveratrol levels in berries and wine were evaluated for all treatments, but the control. The treatments with Fulland, Phi A alternated with fungicide, and fungicide alone, showed the highest disease control with 73.3, 81.5 e 82.5%, respectively. The treatments with Phi A and Phi B showed intermediated disease control with 66.0 and 64.6%, respectively. The treatment Phi A alternated with fungicide had the highest productivity, number and weight of clusters and berries, similarly to the fungicide treatment. It was also observed that the phosphites did not change the chemical characteristics of berries and the levels of anthocianin and soluble phenolic compound levels, but had influence on the *trans*-resveratrol levels in peels and wines. All treatments can be used as an alternative method for controlling *Plasmopara viticola*.

Key-words: Phosphites, Leaf fertilizers, *Plasmopara viticola*, *Vitis vinifera*, Postharvest, *Trans*-resveratrol.

1. INTRODUÇÃO

O míldio da videira (*Plasmopara viticola* (Berk.& Curt) Berl. & de Toni) é uma das principais doenças da videira (GRIGOLETTI JÚNIOR; SÔNEGO, 1993), inclusive na tradicional zona vitícola da região sul de Minas Gerais. Nessa região a videira inicia sua brotação em setembro, floresce em outubro e inicia a maturação em dezembro, para ser colhida entre janeiro e fevereiro (SOUZA et al., 2002), período em que os índices de precipitação pluviométrica mensal ultrapassam facilmente os 200 milímetros, condições altamente favoráveis ao míldio.

Como a maioria das cultivares de uvas finas empregadas para elaboração de vinhos (*Vitis vinifera* L.) é suscetível ao míldio, o método de controle dessa doença, adotado com maior intensidade pelos produtores, é a pulverização com fungicidas de contato e sistêmicos (SÔNEGO; GARRIDO, 2005). Entretanto, com uma sociedade mais exigente em produtos com baixo ou nenhum índice de resíduos de pesticidas, torna-se necessária a busca de medidas alternativas para o manejo dessa doença, como a utilização de produtos menos tóxicos ao homem e meio ambiente, ou pela alternância da aplicação destes com os fungicidas utilizados, visando à diminuição da aplicação dos fungicidas.

Fertilizantes foliares como os fosfitos vêm sendo muito utilizados na agricultura para o controle de diversas doenças em diferentes culturas (DALBÓ; SCHUCK, 2003; JACKSON et al., 2000; MOREIRA; MAY-DE-MIO, 2009; PEREIRA et al., 2012; REUVENI; SHEGLOV; COHEN, 2003; SILVA et al., 2011), como alternativa ao controle químico convencional. Estes podem atuar de várias maneiras nas plantas, seja como fertilizante, atuando diretamente contra patógenos (DELIOPOULOS; KETTLEWELL; HARE, 2010) ou indiretamente ativando os mecanismos de defesa das plantas (ESHRAHGI et al., 2011). Além de apresentarem boa compatibilidade com fungicidas, serem absorvidos rapidamente pelos tecidos da planta e apresentarem uma maior segurança

ambiental (SÔNEGO; CZERMAINSKI, 1999), os fosfitos podem aumentar a resistência das plantas, o que é relevante, porque além da infecção pelo míldio, os vinhedos são constantemente ameaçados por outras doenças causadas por outros patógenos (SÔNEGO; GARRIDO, 2005).

O aumento da resistência nas plantas proporcionado pelos fosfitos ocorre por mudanças físico-químicas no tecido vegetal, tais como lignificação da parede celular com formação de barreiras à penetração do patógeno e acúmulo de substâncias tóxicas ao patógeno, como fitoalexinas ou proteínas relacionadas à patogênese (PRP's), como peroxidases, quitinases e β -1,3- glucanases (ESHRAHGHiet al., 2011).

As videiras sintetizam compostos fenólicos, quando submetidas a uma desordem metabólica causada por estresses bióticos ou abióticos, tais como infecções por patógenos, danos mecânicos, irradiações ultravioleta, temperaturas extremas, substâncias químicas, entre outros (ADRIANet al., 1996; CANTOS et al., 2000; DAÍ et al., 1995; SAUTTER, 2003). Dessa forma, produtos que são capazes de induzir resistência contra patógenos, podem, também, contribuir para a síntese dos compostos fenólicos em videiras.

O resveratrol é um polifenol, fitoalexina pertencente à classe dos estilbenos (ABEet al., 2007) sintetizado naturalmente pela videira. É uma molécula que possui dois isômeros ópticos, *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol, sendo o isômero *trans* a forma mais comumente encontrada e fotossensível, transformando-se no isômero *cis* – resveratrol (MELZOCHet al., 2001). De acordo com Cantos et al. (2000), a biossíntese do resveratrol pode ser induzida em resposta a vários estímulos.

Os compostos fenólicos são componentes importantes nos derivados da uva, como sucos e vinhos, e contribuem para a expressão de características sensoriais como cor, sabor, adstringência e estrutura do vinho, por ação direta ou por interação com proteínas polissacarídeos ou outros compostos fenólicos

(ABEet al., 2007). As antocianinas constituem a maior porcentagem de compostos fenólicos em uvas tintas e são muito importantes para a produção de vinhos tintos, pois contribuem para os atributos sensoriais e coloração do vinho (MUNÕZ-ESPADAet al., 2004).

Além dos compostos fenólicos apresentarem grande importância para a qualidade de mosto e vinho, também, podem exibir ação contra fitopatógenos (IRITiet al., 2011). Sendo assim, torna-se importante avaliar a ação de produtos alternativos utilizados para o controle de doenças na qualidade final de uvas e a influência destes nos compostos fenólicos. Além disso, o estudo da utilização de fosfitos em aplicação alternada com fungicidas no controle do míldio, na qualidade final do mosto e nos compostos fenólicos, poderá minimizar o uso de fungicidas na cultura da videira, garantindo produtos menos tóxicos ao homem e menor contaminação do meio ambiente.

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito do emprego de fosfitos em aplicação direta ou alternada com fungicida no controle do míldio da videira, nas características físico-químicas das uvas, produtividade e teores de *trans*-resveratrol em bagas e vinhos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na safra 2011/2012, em vinhedo, localizado no Núcleo Tecnológico Epamig Uva e Vinho, em Caldas (MG), situado a 1.150m de altitude, latitude 21° 55' 25'' S e longitude 46° 23' 10'' O. Foram utilizadas plantas da cultivar *Vitis vinifera* Merlot (Clone 343) com sete anos de idade, enxertadas sobre o porta-enxerto 1103 Paulsen, em espaçamento de 2,5 x 1,5 m, e conduzida em espaldeira com três fios de arame. As plantas foram conduzidas em duplo cordão esporonado (sistema Royat), podadas com poda curta (duas gemas) e permaneceram com 20 a 22 gemas, o que resultou em um total de 50 a 55 mil gemas por hectare.

Os tratamentos consistiram na aplicação de fertilizante foliar Fulland (Sudoeste Fertilizantes Ltda., Araxá, MG) com formulação 46,55 g L⁻¹ de Cu, 266 g L⁻¹ de P₂O₅ e 23,27 g L⁻¹ de S, fosfito de potássio Phi A (Pepfós; Pepita Fertilizantes Ltda.; Poços de Caldas, MG) com formulação 280 g L⁻¹ de K₂O e 420 g L⁻¹ de P₂O₅ e Phi B (Reforce; Agrichem do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, SP) com formulação 240 g L⁻¹ de K₂O e 340 g L⁻¹ de P₂O₅, tratamento químico, com emprego alternado dos fungicidas Cabrio Top (metiram 550 g kg⁻¹ e piraclostrobina 50 g kg⁻¹; BASF S.A., São Paulo, SP), Daconil (clorotalonil 500 g L⁻¹; Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., Paulínia, SP) e Ridomil (metalaxil-M 40 g kg⁻¹ e mancozeb 640 g kg⁻¹; Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., Paulínia, SP), além do tratamento com Phi A alternado com tratamento químico (fungicidas) e da testemunha, sem pulverização.

Foram utilizadas doses de cada fosfito de potássio (Phi A e Phi B) em concentração equivalente a 2,1 g L⁻¹ de P₂O₅. De acordo com a dose de P₂O₅, utilizou-se para Phi A a dose de 5,0 mL L⁻¹ e para Phi B a dose de 6,0 mL L⁻¹ e o fertilizante foliar Fulland foi aplicado na dose de 5,9 mL L⁻¹. O tratamento químico padrão consistiu na pulverização, de forma alternada, dos fungicidas Cabrio Top (2 g L⁻¹), Daconil (2 g L⁻¹) e Ridomil (2,5 g L⁻¹) e o tratamento com Phi A alternado com fungicidas foi realizado de acordo com as doses acima. Para esse tratamento, semanalmente, os diferentes princípios ativos dos fungicidas foram intercalados com a aplicação do fosfito Phi A. As pulverizações foram realizadas, a partir da brotação das videiras, em intervalos semanais, totalizando 12 aplicações, realizadas com pulverizador costal manual, até o ponto de escorrimento. Foram adicionados à calda de pulverização 0,05% de óleo mineral e o volume aplicado variou de 700 a 1.000 L ha⁻¹, de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta.

A severidade do míldio nas folhas foi avaliada, quinzenalmente, iniciando-se com o surgimento dos primeiros sintomas. Foram realizadas cinco

avaliações até o momento da colheita, com início em 28/12/2011, utilizando-se a escala de notas proposta por Azevedo (1997), com algumas modificações. As notas variaram de 0 a 5, sendo nota 0 atribuída para plantas com ausência de sintomas; nota 1 para plantas com 0,1 a 5% de área foliar lesionada, nota 2 de 5,1 a 25%; nota 3 de 25,1 a 35%; nota 4 de 35,1 a 50% e nota 5 quando as folhas apresentavam mais de 50% da área foliar lesionada. A partir dos resultados dessas avaliações, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da severidade do míldio da videira (AACPSD) para cada tratamento. Os índices de controle do míldio foram obtidos pela relação $1 - (x/y)$, em que x representa o índice da doença das plantas tratadas e y representa o índice de doença da testemunha sem pulverização (LI; ZINGEN; BUCHENAUER, 1996).

Foram avaliadas, também, a produtividade, a qualidade da baga e o teor de *trans*-resveratrol nas cascas e no vinho, para todos os tratamentos, exceto para testemunha sem pulverização, pois não é, convencionalmente, utilizada por produtores de uva. A produção e a estimativa de produtividade (ton/ha) foram determinadas com base na massa dos cachos (kg) por parcela; número total de cachos no pintor e massa média dos cachos e das bagas, expressos em gramas (g). O teor de sólidos solúveis totais (°Brix) foi determinado em refratômetro digital portátil (Atago modelo Pal 1); acidez total titulável por meio de titulação com NaOH 0,1 N, utilizando-se fenolftaleína como indicador, seguindo a técnica descrita na Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1990); e avaliação do pH por meio de medidor de pH (Micronal modelo B-474) calibrado com padrões 4,0 e 7,0. Além das avaliações mencionadas, as cascas de 150 bagas por tratamento por parcela foram separadas, pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C para determinação do teor de antocianinas e compostos fenólicos totais. Para a determinação dos compostos fenólicos, 150 mg de casca triturada em nitrogênio líquido foram homogeneizadas em Ultra Turrax (IKA T-18 basic) em solução extratora

constituída de metanol acidificado (HCl 1%). As antocianinas foram determinadas pelo método do pH diferencial (GIUSTI; WROLSTAD, 2000). Os fenólicos totais foram analisados pelo método de Folin-Ciocalteu considerando uma curva padrão de ácido gálico (AMERINE; OUGH, 1980).

Para a extração do *trans*-resveratrol, 1 g de cascas trituradas em nitrogênio líquido foram homogeneizadas com 3mL de uma solução de metanol com 3% de ácido fórmico por 2 minutos. A suspensão foi centrifugada a 5000 rpm a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi separado e mantido a 4°C por 48 horas para precipitação do bitartrato de potássio. Após esse período, o sobrenadante foi filtrado em membrana de 22 µm e mantido a -20°C até a realização das análises (CANTOSet al., 2000). Para os vinhos, as amostras, também, foram filtradas em membrana de 22 µm e mantidas a -20°C até a realização das análises. O resveratrol foi quantificado, utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com Souto et al. (2001), com adaptação da temperatura para 50°C. Para tanto, foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu equipado com bomba quaternária LC20AT operando de modo isocrático, injetor automático programado para 20 µL, detector ultravioleta (UV) (SPD – 20A), com sistema de integração CBM-20A. A coluna analítica utilizada foi C-18 (250 mm X 4,6 mm, 5µm) precedida por uma coluna SHIM-PACK (VP-ODS) guarda de mesma composição. A fase móvel foi acetonitrila:água (25:75), pH 3,0, corrigido com ácido ortofosfórico, temperatura de 50°C numa vazão de 1,5 mL.min⁻¹. O *trans*-resveratrol foi detectado a 306 nm utilizando-se uma curva padrão de *trans*-resveratrol (Sigma[®]) de 1,0 a 50,0 µg mL⁻¹ (Figura 1). A identificação do *trans*-resveratrol foi feita baseada nos tempos de retenção UV e a pureza dos picos foi confirmada pelo detector com arranjo de diodos. A corrida do padrão de *trans*-resveratrol pode ser observada na Figura 2.

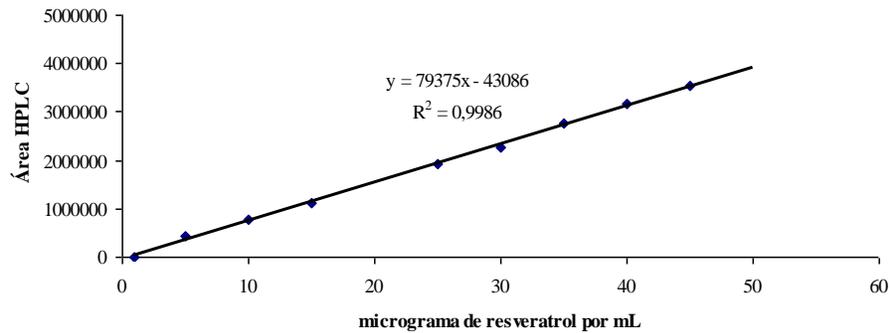


FIGURA 1: Curva de calibração padrão para *trans*-resveratrol (Sigma®) em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

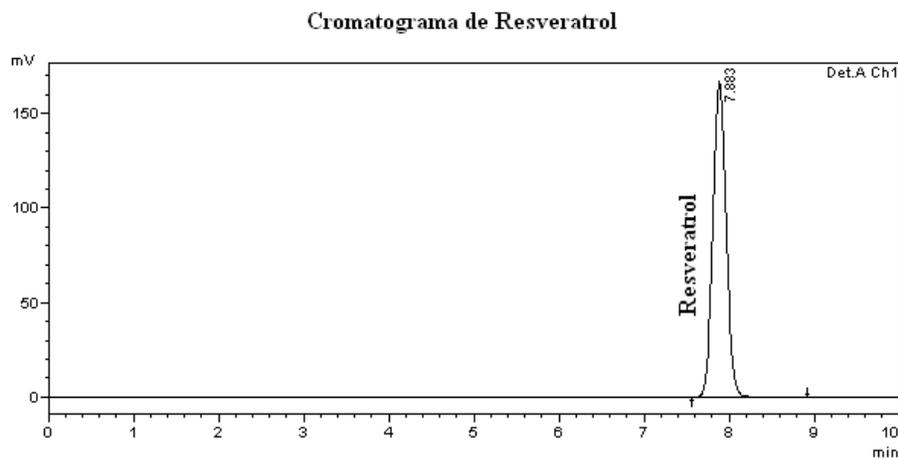


Figura 2: Gráfico da corrida do padrão *trans*-resveratrol (Sigma®) por cromatografia líquida de alta eficiência.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com cinco tratamentos e quatro repetições de seis plantas em linha por parcela, com parcela útil formada pelas quatro plantas centrais da linha de plantio. Foi utilizada, também, bordadura de uma linha, entre as linhas que receberam pulverização com os tratamentos.

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa Sisvar (FERREIRA,2003). As médias, quando significativas pelo teste F, foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento padrão com fungicidas, seguido pelos tratamentos com o fosfito de potássio Phi A alternado com fungicidas e o tratamento com fertilizante foliar Fulland, proporcionaram menor área abaixo da curva de progresso da severidade da doença, sendo estatisticamente iguais entre si e diferentes dos tratamentos com os fosfitos de potássio Phi A e Phi B aplicados isoladamente, que, por sua vez, foram superiores à testemunha sem pulverização (Figura 3). A severidade da doença, próximo ao dia da colheita, época da última avaliação, variou entre 40 e 100% nas folhas, sendo a menor severidade (40%) observada no tratamento com Phi A alternado com fungicidas e a maior severidade (100%) foi observada na testemunha. Nos tratamentos com os fungicidas e fertilizante foliar Fulland, foi observada severidade intermediária da doença, 41,7 e 50 %, respectivamente (Figura 4).

Em todos os tratamentos foi observada baixa severidade do míldio, quando comparados com a testemunha sem pulverização, destacando-se os tratamentos com fertilizante foliar Fulland, o Phi A alternado com fungicidas e o tratamento com fungicidas, que proporcionaram 73,3; 81,5 e 82,5% de controle da doença, respectivamente. Os tratamentos com Phi A e Phi B proporcionaram controle intermediário de *P. viticola*, comparando-se com os demais tratamentos, sendo 66,0 e 64,6%, respectivamente. Pinto et al. (2012) observaram que folhas de videira cv. “Isabel” quando tratadas com fungicidas (metiram + pyraclostrobin 2kg/ha) e fungicidas (metiram + pyraclostrobin 0,67 kg/ha) alternado com fosfito de potássio (43g/100L), apresentaram controle do míldio

da videira de 33,84 e 37,32%, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si.

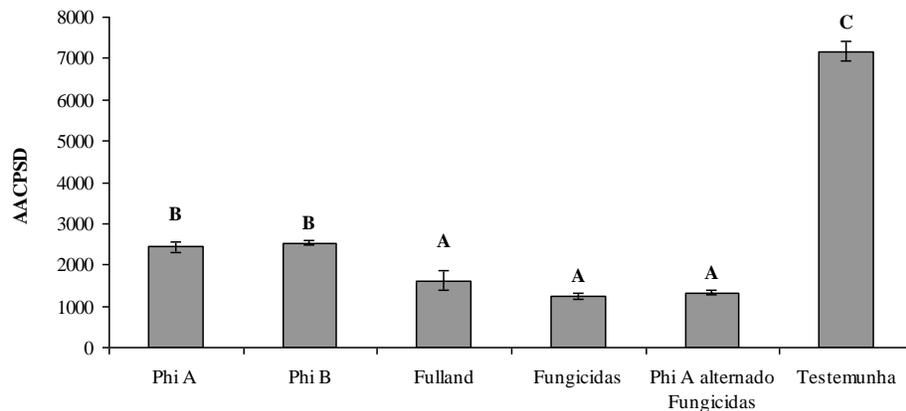


Figura 3: Efeito dos tratamentos na área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPSD) do míldio em folhas de videira cultivar Merlot, na safra 2011/2012. Médias com mesma letra não diferem pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras representam o erro padrão da média. Os fosfitos Phi A e Phi B foram aplicados em doses equivalentes a $2,1 \text{ g P}_2\text{O}_5 \text{ L}^{-1}$ - Phi A: Pepfós ($5,0 \text{ mL.L}^{-1}$); Phi B: Reforce ($6,0 \text{ mL.L}^{-1}$); Fulland ($5,9 \text{ mL.L}^{-1}$); Fungicidas: aplicação alternada dos fungicidas Cabrio Top (2 g L^{-1}), Daconil (2 g L^{-1}) e Ridomil ($2,5 \text{ g L}^{-1}$).

De acordo com a curva de progresso do míldio da videira (Figura 4), observa-se um aumento gradativo da severidade doença ao longo das avaliações. Os tratamentos com Phi A e B se comportaram de maneira semelhante, destacando-se dos demais e formando um grupo separado com severidade intermediária da doença. Os demais tratamentos, desde a primeira avaliação, formaram um grupo que apresentou menor severidade do míldio da videira ao

longo das avaliações, enquanto que a testemunha sem pulverização apresentou aumento gradativo da severidade da doença ao longo das avaliações, destacando-se de todos os tratamentos (Figura 4).

No presente trabalho os fosfitos de potássio Phi A e Phi B em aplicação isolada, apresentaram severidade do míldio da videira estatisticamente superior ao tratamento padrão de controle químico, que é normalmente utilizado no Núcleo Tecnológico Epamig Uva e Vinho. Contudo, Pereira et al. (2010) observaram que fosfitos de potássio na dose de 6 e 4,5 mL L⁻¹ proporcionaram controle do míldio nas folhas e nos cachos de videiras cultivar Merlot semelhante estatisticamente ao tratamento com fungicidas.

Fosfitos de potássio proporcionaram redução do míldio da soja em mais de 50%, levando ao maior rendimento de grãos (SILVA et al., 2011). Peruch e Bruna (2008) verificaram redução de 94% da severidade do míldio nas folhas de videira cv. Goethe, proporcionada por fosfitos de potássio na dose de 0,3% (40% P₂O₅ - 20 % K₂O). Santos et al. (2011) observaram que formulados de fosfitos, quando utilizados sozinhos, não apresentaram efeito sobre o oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) nas folhas de trigo, porém, quando esses fosfitos foram associados com fungicidas, foram capazes de reduzir a área abaixo da curva de progresso da doença de forma significativa.

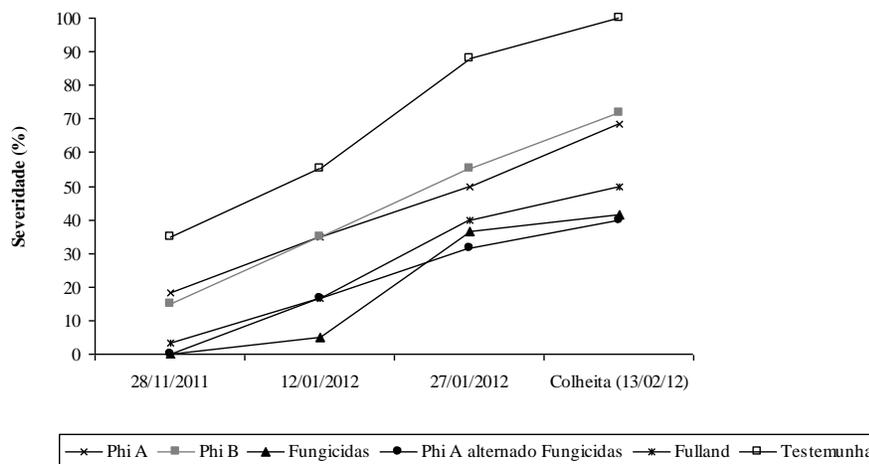


Figura 4: Efeito dos tratamentos no progresso da severidade do míldio da videira cultivar Merlot, na safra 2011/2012. Os fosfitos Phi A e Phi B foram aplicados em doses equivalentes a $2,1\text{g P}_2\text{O}_5 \text{ L}^{-1}$ - Phi A: Pepfós ($5,0 \text{ mL.L}^{-1}$); Phi B: Reforce ($6,0 \text{ mL.L}^{-1}$); Fulland ($5,9 \text{ mL.L}^{-1}$); Fungicidas: aplicação alternada dos fungicidas Cabrio Top (2 g L^{-1}), Daconil (2 g L^{-1}) e Ridomil ($2,5 \text{ g L}^{-1}$).

Na colheita, o tratamento Phi A alternado com fungicidas destacou-se, proporcionando maior produção por plantas (kg), maior estimativa de produtividade (ton/ha), maior número e massa de cachos (g), além de maior massa de bagas (g). Esse comportamento, também, foi verificado para o tratamento realizado apenas com fungicidas, que foi, estatisticamente, igual em todos os parâmetros avaliados, exceto para número de cachos no pintor, que foi menor quando comparado ao tratamento com aplicação alternada. Os tratamentos realizados apenas com os fosfitos de potássio apresentaram menor produtividade (ton/ha) quando comparados ao tratamento alternado com fungicidas. O tratamento com Phi A apresentou menor número de bagas por

cacho (dados não mostrados), o que pode ter acarretado em maior deslocamento de nutrientes proporcionando bagas maiores em cachos menores (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito dos tratamentos na produtividade, número de cachos no pintor, peso médio de cachos e de bagas de videira cv. Merlot, na safra 2011/2012, Caldas (MG).

Tratamentos	Produção por planta (Kg)	Estimativa de produção (ton ha ⁻¹)	Número de cachos pintor	Massa média dos cachos(g)	Massa média das bagas (g)
Phi A	3,42 b	8,64 b	147,5 b	88,3 b	1,72 a
Phi B	4,37 b	11,64 b	170,3 b	102,3 b	1,63 b
Phi A/Fungicida	5,57 a	14,84 a	180,8 a	122,8 a	1,77 a
Fungicida	5,62 a	15,00 a	160,8 b	139,8 a	1,72 a
Fulland	3,62 b	9,67 b	198,0 a	73,50 b	1,52 c

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Os fosfitos Phi A e Phi B foram aplicados em doses equivalentes a 2,1g P₂O₅ L⁻¹; Phi A: Pepfós (5,0 mL.L⁻¹); Phi B: Reforce (6,0 mL.L⁻¹); Fulland (5,9 0 mL.L⁻¹); Fungicidas: aplicação alternada dos fungicidas Cabrio Top (2 g L⁻¹), Daconil (2 g L⁻¹) e Ridomil (2,5 g L⁻¹). O tratamento Phi A/Fungicida foi realizado alternando semanalmente os diferentes princípios ativos dos fungicidas com a aplicação do fosfito Phi A.

Na região sul, principal região produtora de vinhos do Brasil, o mosto de uvas da cultivar Merlot para a vinificação apresenta teores médios em torno de 18,4°Brix, acidez total de 104 meq L⁻¹ e pH 3,21 (RIZZON; MIELE, 2003). A composição das bagas colhidas na safra de verão 2011/2012 em Caldas apresentou valores de sólidos solúveis totais próximos aos observados nas uvas colhidas na região sul, pH ligeiramente superior e maior acidez total (Tabela 2).

Não foi observado efeito significativo dos tratamentos no pH do mosto. Entretanto, para o teor de sólidos solúveis totais, o tratamento com Fulland destacou-se dos demais, sendo estatisticamente superior aos tratamentos com fosfitos de potássio Phi A e Phi B, que, por sua vez, foram estatisticamente

diferentes dos tratamentos com fungicidas e com fungicidas alternados com o Phi A, os quais apresentaram menores teores de sólidos solúveis totais (Tabela 2).

Todos os tratamentos apresentaram acidez acima do recomendado para a vinificação da cultivar (RIZZON; MIELE, 2003), destacando-se os tratamentos com Fungicidas alternado com Phi A e o Fulland, que foram estatisticamente superiores aos demais. A colheita ocorreu em meados de fevereiro, sendo uma época de muitas chuvas na região, dessa forma, a colheita de uvas finas é realizada mais cedo, quando as uvas, ainda, apresentam-se com maior teor de acidez e baixos teores de sólidos solúveis, evitando, assim, as perdas por podridões e excessos de chuvas (SOUSA et al., 2002).

O tratamento com Fulland apresentou menor massa média de bagas e maior teor de sólidos solúveis totais e acidez total, indicando que, possivelmente, essas bagas sofreram maior desidratação, acumulando maior teor de açúcar e acidez, quando comparadas aos demais tratamentos (Tabela 1 e 2).

Tabela 2: Efeito dos tratamentos nas características analíticas das bagas, sólidos solúveis totais, acidez total titulável e pH, da cultivar Merlot na safra 2011/2012, Caldas (MG).

Tratamento	Sólidos solúveis totais (°Brix)	pH	Acidez total titulável (meq/L)
Phi A	18,9 b	3,30 a	122,0 b
Phi B	18,7 b	3,31 a	122,0 b
Phi A/Fungicida	17,8 c	3,28 a	127,5 a
Fungicida	17,9 c	3,27 a	124,0 b
Fulland	19,4 a	3,30 a	131,4 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Os fosfitos Phi A e Phi B foram aplicados em doses equivalentes a $2,1 \text{ g P}_2\text{O}_5 \text{ L}^{-1}$; Phi A: Pepfós ($5,0 \text{ mL.L}^{-1}$); Phi B: Reforce ($6,0 \text{ mL.L}^{-1}$); Fulland ($5,9 \text{ mL.L}^{-1}$); Fungicidas: aplicação alternada dos fungicidas Cabrio Top (2 g L^{-1}), Daconil (2 g L^{-1}) e Ridomil ($2,5 \text{ g L}^{-1}$). O tratamento Phi A/Fungicida foi realizado alternando semanalmente os diferentes princípios ativos dos fungicidas com a aplicação do fosfito Phi A.

A pluviosidade interfere no acúmulo de açúcares nas bagas, pois esta absorve água diluindo o açúcar, sendo assim, chuvas bem distribuídas ou tempo seco são condições consideradas ideais na maturação da uva (GIOVANNINI, 2008). O metabolismo da videira é, também, afetado pela umidade relativa do ar, que se for elevada propicia a maior incidência de doenças fúngicas. A maior atividade fotossintética é obtida na faixa de temperaturas que vai de 20°C a 25°C e temperaturas a partir de 35°C são excessivas. Altas temperaturas afetam processos de maturação das uvas, influenciam nos teores de açúcar e acidez das bagas, além de alterarem os compostos aromáticos, antocianinas e polifenóis (TONIETTO; MANDELLI, 2003).

Nas condições normais de cultivo do Sudeste brasileiro, a videira apresenta o período de maturação das bagas na estação de verão, com elevado índice pluviométrico e temperaturas elevadas. Condições favoráveis à qualidade, entretanto, são baixa umidade, temperaturas diurnas amenas, possibilitando um período de maturação mais lento e a ocorrência de noites relativamente frias, que favorecem o acúmulo de polifenóis, especialmente as antocianinas nas cultivares tintas (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2003). Estas condições são obtidas na região cafeeira de Minas Gerais pelo emprego da técnica da dupla poda para colheita no período de inverno (AMORIM; FAVERO; REGINA, 2005).

Neste experimento, o período de pintor até a maturação das uvas ocorreu sob as seguintes condições climáticas: 25° e 16,2°C médias de temperaturas máxima e mínima, respectivamente, pluviosidade média de 283,1mm, umidade relativa média de 81% e insolação média de 106,5 horas. Condições ambientais estas que levaram à antecipação da colheita, não permitindo alcançar teores ideais de sólidos solúveis, pH e acidez, o que também prejudicou a maturação

fenólica, ou seja, o acúmulo de antocianinas e compostos fenólicos nas cascas e sementes.

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos tanto para o teor de antocianinas quanto para os compostos fenólicos solúveis totais nas cascas de uvas. Para todos os tratamentos, a média dos teores de antocianinas foi de 10,8 mg g⁻¹ de casca e de compostos fenólicos foi de 33,5 mg g⁻¹ de casca (Tabela 3).

Tabela 3: Efeito dos tratamentos nos teores de compostos fenólicos solúveis totais e antocianinas nas cascas de uvas da cultivar Merlot na safra 2011/2012, Caldas (MG).

Tratamento	Antocianinas (mg g⁻¹ de casca)	Compostos fenólicos solúveis totais (mg g⁻¹ de casca)
Phi A	10,1 a	29,4 a
Phi B	10,7 a	37,5 a
Phi A/Fungicida	10,5 a	29,5 a
Fungicida	11,8 a	36,0 a
Fulland	11,3 a	35,2 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Os fosfitos Phi A e Phi B foram aplicados em doses equivalentes a 2,1g P₂O₅ L⁻¹; Phi A: Pepfós (5,0 mL.L⁻¹); Phi B: Reforce (6,0 mL.L⁻¹); Fulland (5,9 0 mL.L⁻¹); Fungicidas: aplicação alternada dos fungicidas Cabrio Top (2 g L⁻¹), Daconil (2 g L⁻¹) e Ridomil (2,5 g L⁻¹). O tratamento Phi A/Fungicida foi realizado alternando semanalmente os diferentes princípios ativos dos fungicidas com a aplicação do fosfito Phi A.

Os teores de antocianinas e compostos fenólicos nas cascas de uvas de videira, tratadas com os fosfitos de potássio A e Phi B, foram maiores do que aqueles observados por Pereira et al. (2012), que, ao testar os mesmos fosfitos, observaram teores de antocianinas de 2,7 e 3,7 mg g⁻¹ de casca e de compostos fenólicos de 12,6 e 16,8 mg g⁻¹ de casca, respectivamente, em uvas da cultivar Merlot. Romero-Cascales et al. (2005) observaram que uvas provenientes de

vinhedo Merlot, na Espanha, apresentaram teores de antocianinas de 4 mg. g⁻¹ de casca. A concentração dos compostos fenólicos depende de numerosos fatores tais como, cepa e estado de maturação da uva, tamanho das bagas, duração da maceração e número de remontagens, temperatura, entre outros (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003).

Para o teor de *trans*-resveratrol na casca, os tratamentos com fungicidas e com Fulland apresentaram maiores teores, quando comparados com os demais tratamentos. Contudo, para o vinho, todos os tratamentos diferiram entre si, destacando o tratamento com Phi B que apresentou o maior teor de *trans*-resveratrol (Tabela 4). O resveratrol encontra-se em vários tipos de vinho e sua concentração pode variar de 0,1 a 15 mg.L⁻¹ e a forma predominante, encontrada em maiores concentrações no vinho, é a *trans*- e a forma *cis*-, também, pode ser encontrada em concentrações menores, sendo, provavelmente, formado durante o processo de vinificação (FLANZY, 2000).

Tabela 4: Efeito dos tratamentos no teor de *trans*-resveratrol na casca e no vinho de uvas cultivar Merlot na safra 2011/2012, Caldas (MG).

Tratamento	<i>Trans</i> -resveratrol	
	Casca (mg kg ⁻¹ peso seco)	Vinho (mg L ⁻¹)
Phi A	21,1 b	1,0 d
Phi B	19,2 b	8,1 a
Phi A/Fungicida	23,1 b	4,0 c
Fungicida	28,5 a	1,2 d
Fulland	30,7 a	6,5 b

Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Os fosfitos Phi A e Phi B foram aplicados em doses equivalentes a 2,1g P₂O₅L⁻¹; Phi A: Pepfós (5,0 mL.L⁻¹); Phi B: Reforce (6,0 mL.L⁻¹); Fulland (5,9 0 mL.L⁻¹); Fungicidas: aplicação alternada dos fungicidas Cabrio Top (2 g L⁻¹), Daconil (2 g L⁻¹) e Ridomil (2,5 g L⁻¹). O tratamento Phi A/Fungicida foi realizado alternando semanalmente os diferentes princípios ativos dos fungicidas com a aplicação do fosfito Phi A.

Foram verificadas diferenças nos valores de *trans*-resveratrol da casca e do vinho para os tratamentos, o que, provavelmente, ocorreu em decorrência das diferentes formas de extração utilizadas em cada metodologia. Para casca, foi utilizado metanol acidificado como solvente, que é um forte solvente dos compostos fenólicos e, além disso, essa metodologia de extração visa à completa remoção dos compostos com a desintegração da membrana com o Turrax e lavagens com o solvente. Na vinificação, a extração de compostos fenólicos aumenta com o aumento do teor de álcool, durante a fermentação, além das cascas permanecerem íntegras e com tempo de contato limitado para evitar extração de taninos verdes, o que pode dificultar a extração desses compostos fenólicos.

Copelli (2005) verificou que videiras Cabernet Sauvignon, tratadas com fosfito, proporcionaram vinhos com maiores teores de *trans*-resveratrol, em média $1,55 \text{ mg L}^{-1}$, quando comparados à testemunha, indicando que esses produtos podem levar a videira à produção de mais fitoalexinas e, conseqüentemente, tornar-se mais resistente. Os compostos fenólicos participam da defesa das plantas e sua biossíntese pode ocorrer em resposta a qualquer estímulo que provoque a ativação do sistema de defesa vegetal (YAMADA, 2004). Segundo Sautter (2003), a uva sintetiza resveratrol em resposta a agressões sofridas a planta, que podem ser danos mecânicos, ataque de patógenos fúngicos, irradiações ultravioletas e até por substâncias químicas tais como etileno e ozônio. Dessa forma, no presente trabalho, os tratamentos com fertilizante foliar Fulland e fosfito Phi B, podem ter atuado com indutores de resistência na videira, contribuindo para o aumento dos teores de *trans*-resveratrol na casca e no vinho, respectivamente, e controlando o míldio.

De acordo com Jeandet et al. (1995), a concentração de resveratrol em vinhos pode ser alterada por influência de doenças e envelhecimento do vinho. No presente trabalho não ocorreu diferença para os tratamentos no tempo de

elaboração dos vinhos, no entanto, o tratamento com Phi B foi o que apresentou maior severidade do míldio, não diferindo, estatisticamente, do tratamento com Phi A e, por consequência, maior teor de resveratrol no vinho.

Os tratamentos com fungicidas e fertilizante foliar Fulland apresentaram maior teor de resveratrol nas cascas das bagas, entretanto, não foram os que apresentaram maiores teores destes compostos no vinho. O tratamento com fosfito Phi B apresentou o menor teor na casca e o maior no vinho (Tabela 4). Esse fato, além da severidade da doença, pode estar relacionado à fragilidade das cascas das bagas que podem influenciar na extração de resveratrol, pois bagas com cascas mais grossas e resistentes devem ser maceradas por mais tempo e remontadas com mais vigor para maior extração dos compostos fenólicos, enquanto que bagas com cascas mais finas e frágeis necessitam de menos tempo de maceração e remontagens mais brandas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

De acordo com Daniel e Guest (2005), a ação do ânion fosfito nas plantas tem sido relacionado à indução de resistência, por meio do aumento da resposta de hipersensibilidade (morte celular), lignificação, ativação do metabolismo e aumento de fitoalexinas, além da atuação direta contra o patógeno. Dessa forma, no presente trabalho, os fosfitos podem ter agido de forma direta e indireta no patógeno *P. viticola*, pois proporcionaram baixa incidência da doença, boas características de produtividade, além de médio-altos teores de *trans*-resveratrol, na casca e no vinho.

Souto et al. (2001) verificaram que vinhos da variedade Merlot, produzidos no sul do Brasil apresentaram em média 4,04 mg L⁻¹ de resveratrol, sendo esse valor considerado expressivo. Já Dias (2009) encontrou, em vinhos da mesma variedade, da safra 2003 e 2006, quantidades médias de 13,11 e 7,33 mg L⁻¹ de *trans*-resveratrol, respectivamente. Mark et al. (2005) encontraram em vinhos Húngaros, da variedade Merlot, safra de 2002, 14,3mg L⁻¹ de *trans*-resveratrol. No presente trabalho, os tratamentos com Phi B, Phi A alternado com

fungicida e o tratamento com fertilizante foliar Fulland proporcionaram em média $6,2 \text{ mg L}^{-1}$ de resveratrol, sendo esse valor bem superior ao encontrado por Souto et al. (2001) e intermediário aos encontrados pelos demais autores, demonstrando um grande potencial desses tratamentos para a cultura.

Segundo Peynaud (1984), os diferentes fatores não atuam do mesmo modo sobre a dissolução das diversas substâncias, em particular sobre os polifenóis. As antocianinas se dissolvem rapidamente só com as operações de esmagamento ou com a curta maceração que precede o início da fermentação, e a remontagem de homogeneização acentua esta dissolução. Já os outros compostos fenólicos se dissolvem mais lentamente, por isso a pouca maceração, mesmo de uvas tintas bem maduras, permite obter vinhos com coloração intensa, mas com um baixo índice de polifenóis.

Diante dos resultados obtidos, os fosfitos proporcionaram proteção da videira contra o míldio, além de características de pós-colheita semelhantes ao tratamento com fungicidas. Sendo assim, os tratamentos com fosfitos e fosfito alternado com fungicidas podem ser uma alternativa eficaz para o manejo do míldio da videira aumentando a produtividade. A redução da intensidade dessa doença pode estar relacionada à indução de resistência nas videiras, a julgar pelos metabólitos secundários acumulados nas bagas e vinhos.

4 - CONCLUSÕES

Os tratamentos utilizados com fertilizante foliar Fulland e fungicidas alternado com Phi A proporcionam baixa severidade do míldio da videira.

O tratamento Phi A alternado com fungicidas proporciona maior produtividade, número, massa de cachos e massa de bagas, semelhante ao tratamento com fungicidas.

Os fosfitos não alteram as características das bagas e os teores de antocianinas e compostos fenólicos solúveis totais, mas podem influenciar nos teores de *trans*-resveratrol nas cascas e nos vinhos.

REFERÊNCIAS

ABE, L. T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 394-400, abr./jun. 2007.

ADRIAN, M. et al. Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminium chloride (AlCl₃). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 8, p. 1979-1981, Aug. 1996.

AMERINE, M. A.; OUGH, C.S. **Methods for analysis of musts and wines**. New York: J. Wiley, 1980. 341p.

AMORIM, D.A.; FAVERO, A.C.; REGINA, M.A. Produção extemporânea da videira, cultivar Syrah, nas condições do sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.2, p.327-331, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15th ed. Washington, 1990. 684p.

AZEVEDO, L.A.S. de. **Manual de quantificação de doenças de plantas**. São Paulo: Ciba Agro e Novartis, 1997. 114p.

CANTOS, E. et al. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 10, p. 4606-4612, Sept. 2000.

COPELLI, E.V. **Avaliação de trans-resveratrol em vinhos da cv. Cabernet Sauvignon tratada com Fitofós K Plus**. 2005. 40 p. Monografia (Graduação em Tecnologia em Viticultura e Enologia) - Instituto Federal do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 2005.

DAI, G. H. et al. Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy

mildew fungus, *Plasmopara viticola*. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, n. 3, p. 177-188, Mar. 1995.

DALBÓ, M. A.; SCHUCK, E. Avaliação do uso de fosfitos para o controle do míldio da videira. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 16, n. 3, p. 33-36, 2003.

DANIEL, R.; GUEST, D. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.67, n. 3/5, p.194-201, Sept./Dec. 2005.

DELIOPOULOS, T.; KETTLEWELL, P. S.; HARE, M. C. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, p. 1059-1075, 2010.

DIAS, J. F. **Determinação dos conteúdos de resveratrol em vinhos tintos deduas regiões brasileiras**. 2009. 100 f.Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - UniversidadeFederal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. Centro Nacional de Pesquisa em Uva e Vinho. **Uvas americanas e híbridas para processamento e clima temperado**. Brasília: EMBRAPA, 2003. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/>>. Acesso em: 9 dez. 2010.

ESHLAGHI, L. et al. Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 60, p. 1086-1095, May 2011.

FERREIRA, D.F. **Sisvar**. Versão 4.2. Lavras: UFLA, 2003. Software.

FLANZY, C. **Enologia**: fundamentos científicos y tecnológicos. Madrid: Mundi, 2000. 783p.

GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**.3. ed. Porto Alegre: Renascença, 2008. 363 p.

GIUSTI, M. M.; WROSLTAD, R. E. **Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy**. New York: J. Willey, 2000.349 p.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SÔNEGO, O. R. **Principais doenças fúngicas da videira no Brasil**. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPUV, 1993. 36 p. (Circular Técnica, 17).

IRITI, M. et al. New chitosan formulation prevents grapevine powdery mildew infection and improves polyphenol content and free radical scavenging activity of grape and wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Melbourne, v. 17, n. 2, p. 263-269, 2011.

JACKSON, T. J. et al. Action of the fungicide phosphonate on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 147-154, Feb. 2000.

JEANDET, P. et al. Resveratrol content of wines of different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.46, n. 1, p. 1-4, 1995.

LI, J.; ZINGEN, I.; BUCHENAUER, H. Induction of resistance of cotton plants to *Verticillium* wilt and of tomato plants to *Fusarium* wilt by 3-aminobutyric acid and methyl jasmonate. **Journal of Plant Diseases and Plant Protection**, Berne, v.103, n. 3, p.288-299, Mar. 1996.

MARK, L. et al. A validated HPLC method for the quantitative analysis of trans-resveratrol and trans-piceid in Hungarian wines. **Journal of Chromatographic Science**, Niles, v. 43, n. 9, p. 445-449, 2005.

MELZOCH, K. et al. Resveratrol in parts of vine and wine originating from Bohemian and Moravian vineyard regions. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, Zagreb, v. 66, n. 1, p. 53-57, 2001.

MOREIRA, L. M.; MAY-DE-MIO, L. L. Controle da podridão parda do pessegueiro com fungicidas e fosfitos avaliados em pré e pós-colheita. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 405-411, mar./abr. 2009.

MUÑOZ-ESPADA, A. C. et al. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch grapes and wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 23, p. 6779-6786, 2004.

PEREIRA, V. F. et al. Fosfito de potássio no controle do míldio da videira e características físico-químicas de uvas Merlot. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 11, p. 1581-1588, nov. 2012.

PEREIRA, V.F.et al. Produtos alternativos na proteção da videira contra o míldio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n. 1, p.25-31, jan. 2010.

PERUCH, L.A.M.; BRUNA, E.D. Relação entre doses de calda bordalesa e de fosfito potássico na intensidade do míldio e na produtividade da videira cv. 'Goethe'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n. 9, p.2413-2418, dez. 2008.

PEYNAUD, E. **Enologia práctica**: conocimiento y elaboración del vino. 2.ed. Madrid: Mundi, 1984. 353 p.

PINTO, K.M.S.et al. Efficiency of resistance elicitors in the management of grapevine downy mildew *Plasmopara viticola*: epidemiological, biochemical and economic aspects. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.134, p.745-754, Sept. 2012.

REUVENI, M.; SHEGLOV, D.; COHEN, Y. Control of moldy-core decay in apple fruits by aminobutyric acids and potassium phosphates. **Plant Disease**, Quebec, v. 87, n. 8, p. 933-936, Aug. 2003.

RIBÉREAU-GAYON, P. et al. Red winemaking. In: _____. **Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications**. 2nd ed. West Sussex: J. Wiley, 2006. v. 1, p. 327-395.

RIBÉREAU-GAYON, P. et al. **Tratado de enología: microbiologia del vinovinificaciones**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 2003.v. 1, 636 p.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Merlot para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 156-161, dez. 2003. Suplemento.

ROMERO-CASCALES, I. et al. Differences in anthocyanin extractability from grapes to wines according to variety. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 56, n. 3, p. 212-219, Sept. 2005.

SANTOS, H.A. dos et al. Controle de doenças do trigo com fosfitos e acibenzolar-s-metil isoladamente ou associados a piraclostrobina + epoxiconazole. **Semina: Ciências Agrárias**, Passo Fundo, v.32, n. 2, p.433-442, abr./jun. 2011.

SAUTTER, C. K. **Avaliação da presença de resveratrol em suco de uva**. 2003. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

SILVA, O. C. et al. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, p. 598-604, Feb. 2011.

SÔNEGO, O. R.; CZERMAINSKI, A. B. C. **Eficácia de fungicidas para o controle do míldio da videira cv. Isabel**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 1999. 16 p.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R. **Avaliação da eficácia de algumas marcas comerciais de fosfito de potássio e de fosfonato de Potássio no controle do míldio da videira**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2005. 13 p.

SOUTO, A. et al. Determination of trans-resveratrol concentrations in brazilian red wines by HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 14, n. 6, p. 441-445, Dec. 2001.

SOUZA, C. M. et al. Indicação de cultivares de videira para o Sul de Minas Gerais. In: REGINA, M. de A. (Ed.). **Viticultura e enologia: atualizando conceitos**. Caldas: EPAMIG-FECD, 2002. p. 277-286.

TONIETTO, J.; MANDELLI, F. **Uvas viníferas para processamento em região de clima temperado**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2003. Disponível em:
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioeClimaTemperado/clima.htm>>. Acesso em: 16 jun. 2013.

YAMADA, T. Resistência de plantas a pragas e doenças: pode ser afetado pelo manejo da cultura? **Informações Agronômicas**, Piracicaba, v.108, p.1-7, dez. 2004.

ARTIGO 4

**Indução de respostas de defesa contra *Plasmopara viticola* em videira
por fosfito de potássio**

INDUÇÃO DE RESPOSTAS DE DEFESA EM VIDEIRA CONTRA *PLASMOPARA*
VITICOLA POR FOSFITO DE POTÁSSIO

RESUMO – Objetivou-se neste estudo verificar a atuação do fosfito de potássio na proteção de mudas de videira contra o míldio, avaliar o efeito na atividade das enzimas de defesa peroxidase (POD), fenilalanina amônia-liase (PAL) e superóxido dismutase (SOD), e na expressão dos genes fenilalanina amônia liase (PAL), chalcona sintase (CHS) e estilbeno sintase (STSy). O experimento foi realizado em casa de vegetação com mudas de videira cultivar Merlot. As mudas foram pulverizadas com fosfitos de potássio Phi A ($5,0 \text{ mL.L}^{-1}$), fungicida Cabrio Top ($2,0 \text{ g.L}^{-1}$) e testemunha (sem pulverização). Para análise da atividade enzimática, as coletas foram realizadas às 12, 24 e 72 horas após a aplicação (HAA) e 12, 48, 144 e 240 horas após a inoculação (HAI). Para a análise da expressão gênica, as coletas foram realizadas as 12, 24, 72, 120, 144 e 216 HAA do tratamento e 12, 48, 144 e 240 HAI com o patógeno. A aplicação do fosfito de potássio Phi A proporcionou 71,4% de controle do míldio, além do aumento da atividade das enzimas PAL, POD e SOD, principalmente de 12 a 48 HAI. Em folhas tratadas com Phi A, foi observada a indução do gene PAL as 48 e 144 HAI. Em folhas tratadas e não inoculadas, foi observada indução na expressão do gene STSy das 12 as 144 HAA e para folhas tratadas e inoculadas, apenas as 48 HAI. A expressão do gene CHS foi maior das 144 as 240. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o controle da doença pelo fosfito de potássio Phi A pode ser explicado pela ativação das respostas de defesa nas plantas de videira pela indução de genes e enzimas da rota dos fenilpropanoides.

Palavras chave: Fosfitos, *Plasmopara viticola*, *Vitis vinifera*, fenilpropanoides, indução de resistência

ABSTRACT– The goal of this study was to determine the effect of potassium phosphite on grapevine against downy mildew, evaluate its effects on the activity of defense-related enzymes peroxidase (POD), phenylalanina ammonium lyase (PAL), superoxide dismutase (SOD), and in the gene expression of *PAL*, chalcone synthase (*CHS*), stilbene synthase (*STS*y). The experiment was conducted in greenhouse with grapevine seedlings cultivar Merlot. Seedlings were sprayed with potassium phosphite Phi A (5,0 mL.L⁻¹), fungicide Cabrio Top (2,0 g.L⁻¹), and control (non-sprayed). To analyze the enzymatic activity, the samples were collected at 12, 24, and 72 hours after spraying (HAA), and 12, 48, 144, and 240 hours after inoculation (HAI). The application of potassium phosphite Phi A led to 71.4% control of downy mildew and an increase in the PAL, POD, and SOD activities, mainly from 12 to 48 HAI. Leaves treated with Phi A showed induction of *PAL* gene at 48 and 144 HAI. In leaves treated with Phi A but not inoculated, an induction in the expression of *STS*y was observed from 12 to 144 HAA, whereas for treated and inoculated leaves, the induction was at 48 HAI only. The expression of *CHS* was increased from 144 to 240 HAI. The results observed in these studies indicate that the potassium phosphite Phi A controlled downy mildew on grapevine, and the control can be explained by the induction of the plant defense response through the activation of genes and enzymes involved in the phenylpropanoids pathway.

Keywords – Phosphites, *Plasmopara viticola*, *Vitis vinifera*, phenylpropanoids, induced resistance

1 INTRODUÇÃO

A videira (*Vitis vinifera*L.) é uma das principais frutíferas cultivadas em todo o mundo, inclusive em regiões tropicais e subtropicais como o sul de Minas Gerais. A cultura é susceptível a várias doenças, destacando-se o míldio causado pelo patógeno *Plasmopara viticola*(Berk.& Curt) Berl. & de Toni.

Esse patógeno, quando em condições favoráveis, e se não forem tomadas medidas de controle eficientes, pode levar a perdas de até 100% da produção na cultura da videira (MADDEN et al., 2000). O método de controle do míldio da videira, tradicionalmente, utilizado pelos produtores é o químico com utilização de fungicidas. Entretanto, para um controle eficiente da doença, são necessárias várias aplicações destes produtos, o que gera altos custos econômicos e impactos ambientais negativos, além de que o uso constante de fungicidas pode favorecer o surgimento de populações resistentes do patógeno (SÔNEGO; GARRIDO, 2005). Para a redução de aplicação de fungicida, deve haver previsão eficiente da infecção do míldio, pelos sistemas de previsão de doenças, que permitem a utilização de práticas culturais como o manejo integrado de doenças, além da integração de novos compostos que não representem risco à saúde do homem e ao meio ambiente (VIRET et al., 2001).

Para contornar esse problema, a busca de estratégias alternativas que envolvem a ativação do próprio sistema de defesa das plantas para o controle de doenças vem sendo amplamente estudado e tem apresentado resultados satisfatórios (AZIZ et al., 2006; BAYSAL; TURGUT; MAO, 2005; DANIEL; GUEST 2006; GODARD et al., 2009; JACKSON et al., 2000). Existem produtos capazes de induzir o sistema de defesa natural das plantas, estabelecendo um amplo espectro de resistência no local e em tecidos distantes do local de infecção primária (DURRANT; DONG, 2004). Uma das respostas

de defesa induzidas da planta é a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR) e a maioria dessas proteínas possui atividade antimicrobiana, por meio de atividades hidrolíticas em paredes celulares de patógenos, ou levando a toxicidade durante o contato direto ou no envolvimento de sinalização de defesa da planta contra o patógeno (LOON; PIETERSE, 2006).

Em videira, vários estudos relatam a indução de genes que codificam proteínas PR e enzimas da rota de fenilpropanoides, após a indução com diferentes eliciadores e diferentes tipos de patógenos (BÉZIER; LAMBERT; BAILLIEUL, 2002; KORTERKAMP, 2006). As respostas de defesa em videira incluem formação de compostos antimicrobianos de baixo peso molecular (fitoalexinas), deposição de fenóis, de lignina e de calose no local da infecção, além do aumento da atividade das proteínas PR com atividade hidrolítica (quitinases e glucanases) (KORTERKAMP, 2006; LEGAY et al., 2011; TROTEL-AZIZ et al., 2006).

Os fosfitos são fertilizantes foliares que apresentam ação fungitóxica, induzem resistência, com rápida indução dos mecanismos de defesa otimizando a capacidade das plantas de contra-atacarem os patógenos (COHEN; COFFEY, 1986; DALIO et al., 2012). Dessa forma, são compostos que podem ser utilizados na agricultura como alternativa e, ou associados aos fungicidas convencionais, levando à menor contaminação do homem e meio ambiente.

Hukkanen et al. (2008) verificaram o controle do míldio (*P. sparsa*) em folhas de amora tratadas com fosfitos, além de identificarem vários compostos fenólicos nas plantas, oito dias após a inoculação com o patógeno. Tavares et al. (2009) observaram aumento da atividade da enzima β -1,3 glucanase em mamoeiro tratadas com fosfito de potássio, cinco dias após a inoculação com *Phytophthora palmivora*, além de verificarem a sobrevivência de 35% das plantas inoculadas com o patógeno. Pereira et al. (2012) observaram em folhas de plantas adultas de videira no campo, tratadas com fosfito de potássio, redução do

míldio , com controle de 60,5% da doença. Dessa forma, fosfitos podem apresentar um papel importante no controle de doenças das plantas e na ativação de mecanismos de defesas.

Na videira, a principal via de sinalização de defesa é a dos fenilpropanóides, que inicia com a fenilalanina amônia-liase (PAL) e em seguida, a rota se ramifica nas enzimas chaves chalcona sintase (CHS) e estilbeno sintase (STSy). Essa via leva à formação de flavonoides, estilbenos e antocianinas, que participam de vários processos durante a formação de bagas, vinificação, além de atuarem contra a infecção de patógenos (JEANDET et al.,2002).

Diante do exposto, objetivou-se neste estudo verificar a atuação do fosfito de potássio na proteção de mudas de videira contra o míldio, avaliar o efeito desses na atividade das enzimas de defesa peroxidase (POD), fenilalanina amônia-liase (PAL) e superóxido dismutase (SOD), além da atividade na expressão dos genes fenilalanina amônia-liase (*PAL*), chalcona sintase (*CHS*) e estilbeno sintase (*STSy*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL E ISOLADO DO PATÓGENO

Em todos os experimentos foram utilizadas mudas de videira com três meses de idade, cultivar Merlot(Clone 343), enxertadas sobre porta-enxerto 1103Paulsen, plantadas em sacos de 10 litros, contendo substrato composto de terra, areia e esterco bovino (2:1:1). As mudas foram irrigadas diariamente e adubadas conforme recomendação técnica para a cultura (SOUZA et al., 1999).

Para a obtenção do inóculo, folhas de videira naturalmente infectadas com *P. viticola* foram coletadas em vinhedos e mantidas em câmara úmida, a 25°C, por 24 horas. Após esse período, os esporângios formados foram raspados

com o auxílio de um pincel de cerdas macias em água estéril. Posteriormente, foi preparada 500 mL de uma suspensão ajustada para $4,0 \times 10^4$ esporângios mL^{-1} em água estéril.

2.2 FOSFITO DE POTÁSSIO NA PROTEÇÃO DE MUDAS DE Videira CONTRA O MÍLDIO

Para avaliar o efeito do fosfito na proteção das mudas de videira contra o míldio, foi utilizada a formulação de fosfito de potássio (Phi A) contendo 280 g L^{-1} de K_2O e 420 g L^{-1} de P_2O_5 (Pepfós[®], Pepita Fertilizantes Ltda, Poços de Caldas, Brasil) aplicado na dose de 5,0 mL L^{-1} , além de testemunha inoculada sem pulverização e um tratamento padrão com o fungicida Cabrio Top[®] (metiram 550 g kg^{-1} e piraclostrobina 50 g kg^{-1} ; BASF S.A., São Paulo, SP) na dose de 2,0 g L^{-1} . A pulverização foi realizada com o auxílio de um pulverizador manual, até o ponto de escorrimento, cinco dias antes da inoculação. A inoculação com *P. viticola* foi realizada com pulverização foliar da suspensão de inóculo obtido conforme metodologia descrita anteriormente.

Foram realizadas três avaliações da severidade do míldio nas folhas das mudas de videira, em intervalo de sete dias, iniciando-se com o surgimento dos primeiros sintomas, que ocorreu aos dez dias após a inoculação com o patógeno. Foi utilizada a escala de notas proposta por Azevedo (1997) e Cohen, Reuveni e Baider (1999), com algumas modificações. A severidade foi avaliada em seis folhas do terço médio de cada muda, com notas que variaram de 0 a 5, das quais a nota 0 foi atribuída a plantas com ausência de sintomas, e as notas de 1 a 5 conforme a área foliar lesionada: 1, de 0,1 a 5% da área foliar lesionada; 2, de 5,1 a 25%; 3, de 25,1 a 35%; 4, de 35,1 a 50%; e 5, mais de 50% da área foliar lesionada. A partir dessas avaliações, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da severidade do míldio (AACPSD) para cada parcela. Os índices

de controle do míldio foram obtidos, por meio da relação $1-x/y$, em que x representa o índice da doença das plantas tratadas e y , o índice de doença da testemunha (LI; ZINGEN; BUCHENAUER, 1996).

2.3 FOSFITO DE POTÁSSIO NA ATIVIDADE DE ENZIMAS E NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À DEFESA EM MUDAS DE VIDEIRA

Para determinar a atividade das enzimas peroxidase de guaiacol(POD), fenilalanina amônia-liase (PAL) e superóxidodismutase(SOD) e na expressão dos genes que codificam para fenilalanina amônia-liase (*PAL*),estilbeno sintase (*STSy*) e chalcona sintase (*CHS*) nos tecidos foliares de mudas de videira, foi pulverizado o fosfito de potássio na dose de $5,0 \text{ mL L}^{-1}$, além de testemunha pulverizada apenas com água, todos inoculados e não inoculados com *P. viticola*. A pulverização foi realizada com pulverizador manual, até o ponto de escorrimento e a inoculação foi realizada com a pulverização da suspensão de inóculo, como descrito anteriormente, cinco dias após a pulverização dos tratamentos.

2.3.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Para as análises bioquímicas, foram coletadas quatro folhas do terço médio de cada muda de videira, três mudas por parcela por coleta, nos tempos de 12, 24, 72, 120, 144, 216 e 288 horas após a aplicação (HAA) dos tratamentos o que correspondeu ao período de 12, 48, 144 e 240 horas após a inoculação (HAI), pois a inoculação foi realizada cinco dias após a aplicação (120 HAA). Imediatamente após cada coleta, as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C , até o momento das análises.

Os tecidos foliares coletados foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, 1g desse pó foi depositado em um tubo, ao qual se adicionaram 4 mL de tampão acetato de sódio 50mM pH 5,2 e homogeneizou-se, por 10 segundos, em agitação. Após esse processo, a suspensão foi centrifugada a 12.000g por 15 minutos (4°C) e o sobrenadante foi utilizado na análise enzimática.

As proteínas solúveis totais contidas nos extratos foram aferidas com base no ensaio de Bradford (1976), utilizando-se um padrão de albumina sérica bovina (BSA).

A atividade de peroxidase de guaiacol (POD; EC 1.11.1.7) foi determinada pela adição de 7 μ L do extrato enzimático ajustado para 200 μ L de solução contendo acetato de sódio 50 mM pH 5,2, 20mM de guaiacol e 60mM de peróxido de hidrogênio. Após incubação a 30°C, por 10 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 470nm. A atividade da enzima foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de 26,6 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (OZDEN; DEMIREL; KAHRAMAN, 2009).

A atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL; EC 4.3.1.5) foi medida pelo método modificado de Tanaka e Uritani(1997). A mistura da reação foi preparada adicionando 100 μ L do tampão Tris-HCl (100 mM pH 8,8) e 50 μ L de fenilalanina (40 mM) com 50 μ L do extrato enzimático. A mistura da reação foi incubada por 30 minutos a 37° C e foi paralisada com adição de 50 μ L ácido tricloroacético (TCA) a 6 N. A fenilalanina foi adicionada aos controles após a incubação e da adição de TCA. A mistura do ensaio foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos a 4°C e a absorbância do sobrenadante foi medida em 280 nm. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 17,4 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para quantificar a formação de ácido trans-cinâmico formado durante a reação enzimática (TROTEL-AZZIZ et al., 2006).

A atividade da superóxidodismutase (SOD; EC 1.15.1.1) foi determinada medindo a capacidade da enzima para inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) na presença de riboflavina e luz. A mistura da reação continha 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 14 mM de D-metionina, 75 μ M de NBT, 2 μ M de riboflavina, 0,1 mM de EDTA e 20 μ L do extrato enzimático. Uma unidade da atividade da enzima SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT na absorvância de 560 nm em espectrofotômetro. As placas, contendo a mistura, foram acondicionadas em uma câmara iluminada por lâmpada fluorescente de 30W por 10 minutos. A reação foi paralisada com desligamento da luz e foi realizada leitura no espectrofotômetro a 560 nm (OZDEN; DEMIREL; KAHRAMAN, 2009).

2.3.1 ANÁLISE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL DA EXPRESSÃO DOS GENES DE DEFESA

A coleta das folhas para extração de RNA e análise da expressão gênica foi realizada as 12, 24, 72, 120, 144 e 216 HAA dos tratamentos e 12, 48, 144 e 240 horas após a inoculação (HAI) com *P. viticola*. Imediatamente após cada coleta, as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C, até o momento da extração de RNA.

O RNA total foi extraído de 100 mg de tecidos de folhas de videira moídas em líquido nitrogênio até formar um pó fino, utilizando almofariz e pilão tratados com DEPC 0,05% (v/v), deixados *overnight* e autoclavados por 30 minutos. Sobre o pó macerado foram adicionados 450 μ L de tampão de extração (GiTc 4M, pvp 2,5%, NaOAc 0,2 M pH 5,2, EDTA 25 Mm pH 8,0 e KOAc 1 M) e 45 μ L de β – Mercapto-Etanol, e agitados. Após, a mistura foi levada ao banho Maria 70° C por 3 minutos, seguindo o protocolo de extração do Kit SV Total RNA Isolation System (Promega®). A integridade do RNA foi visualizada

em gel de agarose 1,2%, corado com GelRed™. Os RNAs de todas as amostras das três repetições biológicas foram isolados separadamente. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop™ Espectrophotometer ND-100 (NanoDrop Technologies™).

2.3.1.1 TRATAMENTO COM DNASE

As amostras de RNA total foram tratadas com TURBO™ DNase I (Ambion), segundo especificações do fabricante, para a eliminação de eventual DNA presente.

A integridade do RNA foi verificada por uma PCR convencional (controle negativo) para constatar a pureza das amostras, ou seja, a ausência de bandas no gel, comprovando a inexistência de DNA. As amostras contaminadas foram retratadas com o inibidor Turbo DNA-free Kit (Ambion), conforme as especificações do fabricante, para eliminação de contaminação de DNA residual. A integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose 1,0%, corado com GelRed™. As amostras tratadas com DNase foram novamente quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop™ Espectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies™).

2.3.1.2 SÍNTESE DE CDNA

As amostras que apresentaram alto grau de integridade e pureza foram usadas para a síntese de cDNA utilizando-se o kit 'SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix' (Invitrogen), seguindo protocolo sugerido pelo fabricante, utilizando 1,2 µg de RNA total para a síntese do cDNA. As amostras foram armazenadas a -20°C até o uso.

2.3.1.3 DESENHO DE PRIMERS PARA OS GENES RELACIONADOS À DEFESA DA VIDEIRA

Utilizando o programa ‘Primer3’(versão 0.4.0), *primers* adequados para PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foram desenhados especificamente para os genes fenilalanina amônia-liase (*PAL*), estilbeno-sintase (*STS*_y) e chalcona-sintase (*CHS*) de videira, utilizando sequências já descritas para videira (Tabela 1). Além desses genes, foram desenhados *primers* para amplificar genes que foram usados como controle constitutivo nas reações de RT-qPCR. Os genes escolhidos codificam proteínas ‘*housekeeping*’ de funções constitutivas e presentes em níveis similares nas diferentes fases, tais como Ubiquitina (*UBQ*) e Dehydrogenase subunidade 5 (*NAD5*) (GUTHAet al., 2010).

Tabela 1 Sequências dos *primers* utilizados para a análise de qRT-PCR.

Genes	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)	Referências
<i>PAL</i>	F: 5' ATGGTTTCAAGGGAGCAGAA 3' R: 5' CACTTTCGACATGGTTGGTG 3'	90	Guthaet al. (2010), Landi e Romanazzi (2011) e Kortekamp (2006)
<i>CHS</i>	F: 5' CATGCCCGGTGCTGACTAC 3' R: 5' AGCAGCCCTGTTGGTACAT3'	93	Gutha et al. (2010) e Landi e Romanazzi (2011)
<i>STS</i> _y	F: 5' AGGGTCACTAAGAGCGAGCA 3' R: 5' GCTCCTCAAGCATTCTTCG 3'	115	Kortekamp (2006)
<i>UBQ</i>	F: 5' TCTGAGGCTTCGTGGTGGTA 3' R: 5' AGGCGTGCATAACATTGCG 3'	99	Gutha et al. (2010)
<i>NAD5</i>	F: 5' GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT 3' R: 5' CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA 3'	181	Guthaet al. (2010)

(*PAL*) fenilalanina amônia-liase. (*CHS*) chalcona sintase. (*STS*_y) estilbeno sintase. (*UBQ*) ubiquitina. (*NAD5*) dehydrogenase subunidade 5. (R) sequência do *primer reverse*. (F) sequência do *primer forward*.

2.3.1.5 ANÁLISE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (QRT-PCR)

A análise da expressão gênica quantitativa por qRT-PCR foi realizada em sistema de detecção de sequências ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) do Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA, usando SYBR Green[®], o qual se baseia na capacidade do fluoróforo de intercalar as fitas duplas de cDNA. As condições térmicas da reação foram 2 minutos, a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, finalizando com 15 segundos a 95°C. Os dados gerados foram armazenados e analisados no programa 7500 Fast Software (Versão 2.1).

Para cada reação, foram utilizados 1 µL de cDNA (diluído 1:3), 0,2 µL de cada *primer* (na concentração 1,5µM) e 5,0 µL de Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied BiosystemsTM). A reação foi completada com 3,6 µL de água livre de nuclease (*nuclease-free water*) (AmbionTM), para um volume final de 10,0 µL por amostra. As amostras foram processadas em réplicas. Os resultados foram normalizados, usando CTs (ciclo *Threshold*), obtidos para controles endógenos presentes na mesma reação. O CT foi determinado pelo número de ciclos nos quais a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha *Threshold*. O método usado foi o C_T comparativo.

A normalização foi realizada utilizando-se a equação $\Delta C_T = C_T$ (gene alvo) - CT (controle endógeno). A calibração foi determinada pela fórmula $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (amostra) - ΔC_T (calibrador). O calibrador é uma amostra usada como base para resultados de expressão comparativa, neste caso, o calibrador foi a testemunha em cada tempo de coleta. A quantificação relativa foi obtida pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Após serem analisados, os dados gerados pelo programa 7500 Fast Software (Versão 2.1) foram exportados para o programa Microsoft Excel, para realização dos cálculos de ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$ e da quantificação relativa (RQ) para a posterior construção dos gráficos.

Para verificar o efeito do indutor fosfito Phi A sobre a expressão de cada gene, os cálculos de quantificação relativa foram realizados utilizando-se como calibrador, os dados obtidos, a partir das amostras controle (testemunha), pulverizadas com água para os tratamentos não inoculados, e para os tratamentos inoculados, plantas pulverizadas com água e inoculadas com o patógeno, para os respectivos tempos de coleta.

A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão do gene UBQ e NAD5, utilizados como controle endógeno. Os resultados foram normalizados usando C_{Ts} (Ciclo Threshold) obtidos para controles endógenos presentes na mesma reação.

2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE DOS DADOS

O experimento realizado para comparar a eficácia do fosfito de potássio (Phi A) e do fungicida (metiram e piraclostrobina) na proteção da videira contra o míldio foi realizado em delineamento de blocos casualizados, com quatro blocos e parcela experimental composta por seis plantas. Os experimentos, para avaliar as atividades das enzimas de defesa e expressão gênica, foram realizados em delineamento de blocos casualizados com três repetições com três plantas por parcela. As atividades das enzimas foram calculadas pela média das repetições em cada época de coleta e foi calculado, também, o erro padrão da média. Os experimentos foram realizados em duplicata. Os dados médios da AACPSD, foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo Scott-Knott ($P < 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 FOSFITO DE POTÁSSIO NA PROTEÇÃO DA VIDEIRA CONTRA O MÍLDIO

Os tratamentos com fosfito de potássio e o fungicida proporcionaram menor severidade do míldio nas mudas de videira, sendo estatisticamente iguais entre si e diferentes da testemunha. O fosfito de potássio Phi A proporcionou controle de 71,4% e as mudas tratadas com o fungicida apresentaram redução na severidade do míldio da videira em 65,1% (Tabela 2).

Tabela 2 Efeito dos tratamentos na área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD) e no controle do míldio nas folhas de videira cv. Merlot. .

Tratamento	AACPSD	Controle (%)
Fosfito de potássio (Phi A)	*110,8 a	71,4
Fungicida	135,3 a	65,1
Testemunha	387,6 b	---
CV	7,4	

*Médias com mesma letra na coluna não diferem pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). O fosfito de potássio (Phi A) foi aplicado na dose de 5,0 mL L⁻¹ e fungicida (metiram epiraclostrobina) foi aplicado na dose de 0,2 g L⁻¹. CV: coeficiente de variação.

3.2 FOSFITOS DE POTÁSSIO PHI A NA ATIVIDADE DE ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA EM FOLHAS DE VIDEIRA

Em plantas não inoculadas com o patógeno e pulverizadas com fosfito de potássio, até as 144 horas após a pulverização (HAA), não foi observado aumento expressivo na atividade da fenilalanina amônia-liase quando comparadas com a testemunha pulverizada com água. A partir de 144 HAA foi observado aumento na atividade da enzima, com um pico máximo as 216 HAA, 74% maior que a testemunha pulverizada com água. Posteriormente, essa atividade enzimática diminuiu, apresentando-se com 23,3% maior que a testemunha as 288 HAA. Em plantas pulverizadas com água (testemunha) e inoculadas com *P. viticola*, observou-se aumento de atividade dessa enzima as 12

HAI (120 HAA), apresentando pico máximo de atividade (62%) as 144 HAI (216 HAA) (Figura1).

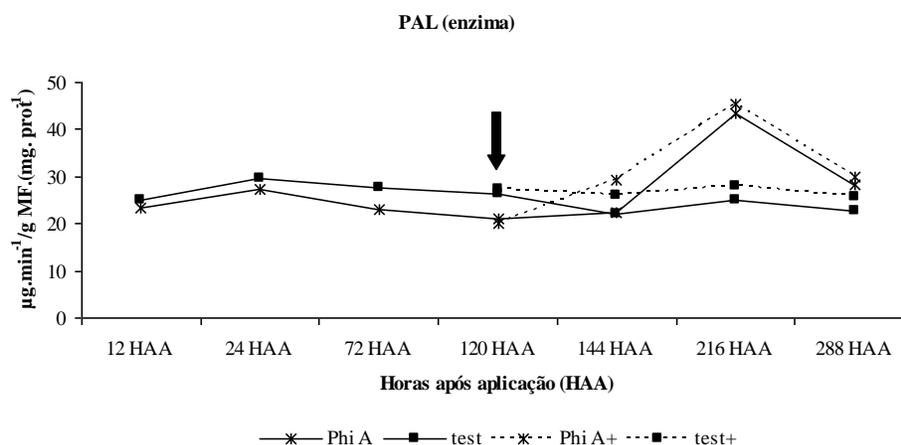


Figura 1 Atividade de fenilalanina amônia-liase (PAL) em folhas de mudas de videira ‘Merlot’, após tratamento com fosfitos de potássio, Phi (5 mL L⁻¹) em comparação com a testemunha pulverizada com água. Seta indica a inoculação com *P. viticola* (+), a qual foi realizada cinco dias após a pulverização.

A atividade de peroxidase em mudas de videira não inoculadas manteve-se constante em praticamente todas as avaliações, exceto aos 120 e 288 HAA, onde foram observados picos na atividade desta enzima de até 300% em relação à testemunha. Em mudas tratadas com Phi A e inoculadas com *P. viticola*, foi observado aumento expressivo na atividade de POD logo após 144 HAI (216 HAA) com o patógeno, mantendo-se alta até 240 HAI (288 HAA) (Figura 2).

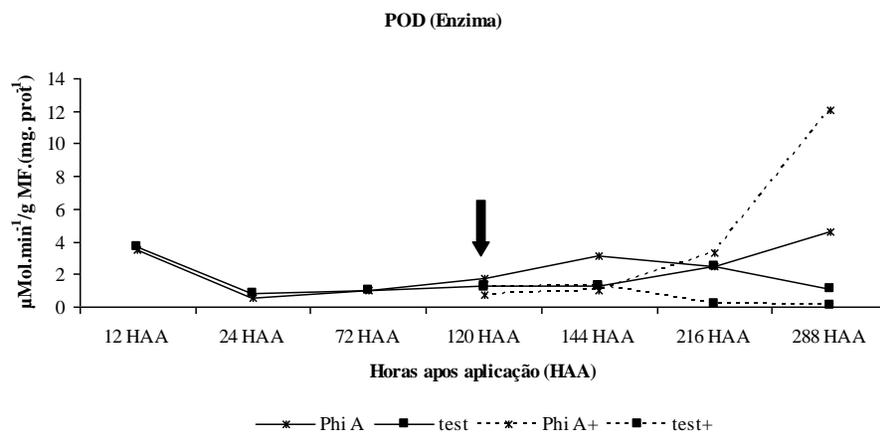


FIGURA 2 Atividade de peroxidase (POD) em folhas de mudas de videira ‘Merlot’, após tratamento com fosfitos de potássio, Phi A (5 mL L^{-1}) em comparação com a testemunha. Seta indica a inoculação com *P. viticola* (+), a qual foi realizada cinco dias após a pulverização.

A atividade da enzima antioxidante SOD manteve-se constante, com pequenos aumentos das 12 até 288 HAA, em plantas tratadas com fosfito Phi A, porém, não inoculadas. Já para plantas tratadas e inoculadas com *P. viticola* foi observado aumento na atividade desta enzima logo após a inoculação, as 120 HAA (=12 HAI), com pico máximo de 50% de atividade a mais, em relação à testemunha às 48 HAI (144 HAA), mantendo-se alta até 144 HAI (216 HAA) (Figura 3).

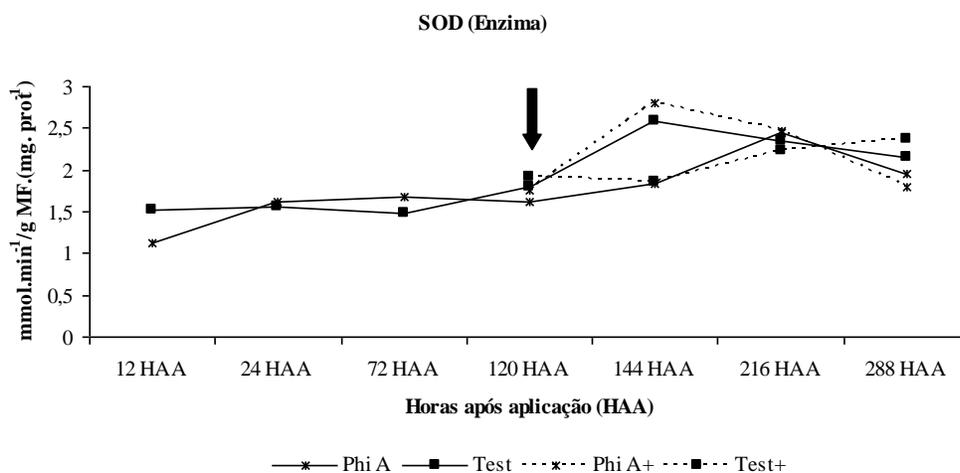


Figura 3 Atividade de superóxidodismutase (SOD) em folhas de mudas de videira ‘Merlot’, após tratamento com fosfitos de potássio, Phi A (5 mL L^{-1}) em comparação com a testemunha. Seta indica a inoculação com *P. viticola* (+), a qual foi realizada cinco dias após a pulverização.

3.2 FOSFITOS DE POTÁSSIO PHI A NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À DEFESA EM FOLHAS DE VIDEIRA

A pulverização com fosfito de potássio induziu a expressão do gene *PAL*, em plantas não inoculadas, em relação à testemunha pulverizada com água em todos os tempos analisados, sendo a expressão mais significativa, 6,5 vezes mais expressa que a testemunha, as 144 HAA (Figura 4A). Em plantas tratadas com fosfito de potássio e inoculadas com o patógeno *P. viticola*, foi observado aumento significativo na expressão do gene as 48 e 144 HAI (Figura 4B).

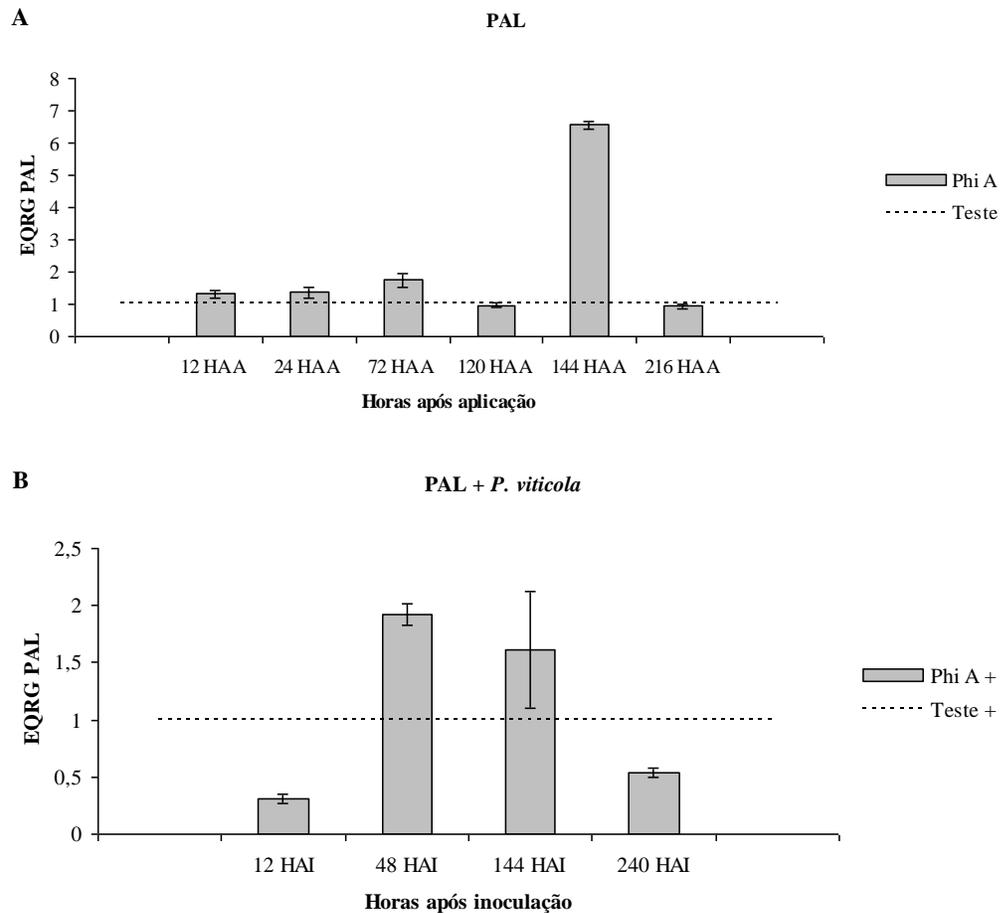


FIGURA 4 Perfil da expressão quantitativa relativa por PCR em tempo real (qRT-PCR) do genes *PAL* (EQRGCAT). **A:** expressão do gene *PAL* em folhas videira apenas com indutor Phi A, nos tempos 12, 24, 72, 120, 144 e 216 horas após pulverização de mudas de videira com fosfito de potássio Phi A; **B:** expressão do gene *PAL* em folhas de videira com indutor Phi A inoculadas com *P. viticola*, nos tempos 12, 48, 144 e 240 horas após a inoculação com o patógeno *P. viticola*. Colunas representam a indução média de transcritos relativos aos controles (testemunha) não induzidos e não inoculados, no mesmo período, com valores dados a partir da média de cDNA dos três ensaios. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão dos genes *UBQ* e *NAD5*. Barras nas colunas representam o erro padrão da média.

A expressão do gene *STS* foi induzida nas folhas das mudas pulverizadas com fosfito de potássio (Phi A) sem inoculação com o patógeno em todas as avaliações, sendo essa super-expressão de até 6 vezes em relação à testemunha pulverizada com água (Figura 5A). Em plantas tratadas com fosfito de potássio (Phi A) e inoculadas com *P. viticola*, às 48 horas após a inoculação, foi observada uma super-expressão de 25 vezes a mais que a testemunha inoculada. Nas demais avaliações, esse gene foi represso quando comparado à testemunha (Figura 5B).

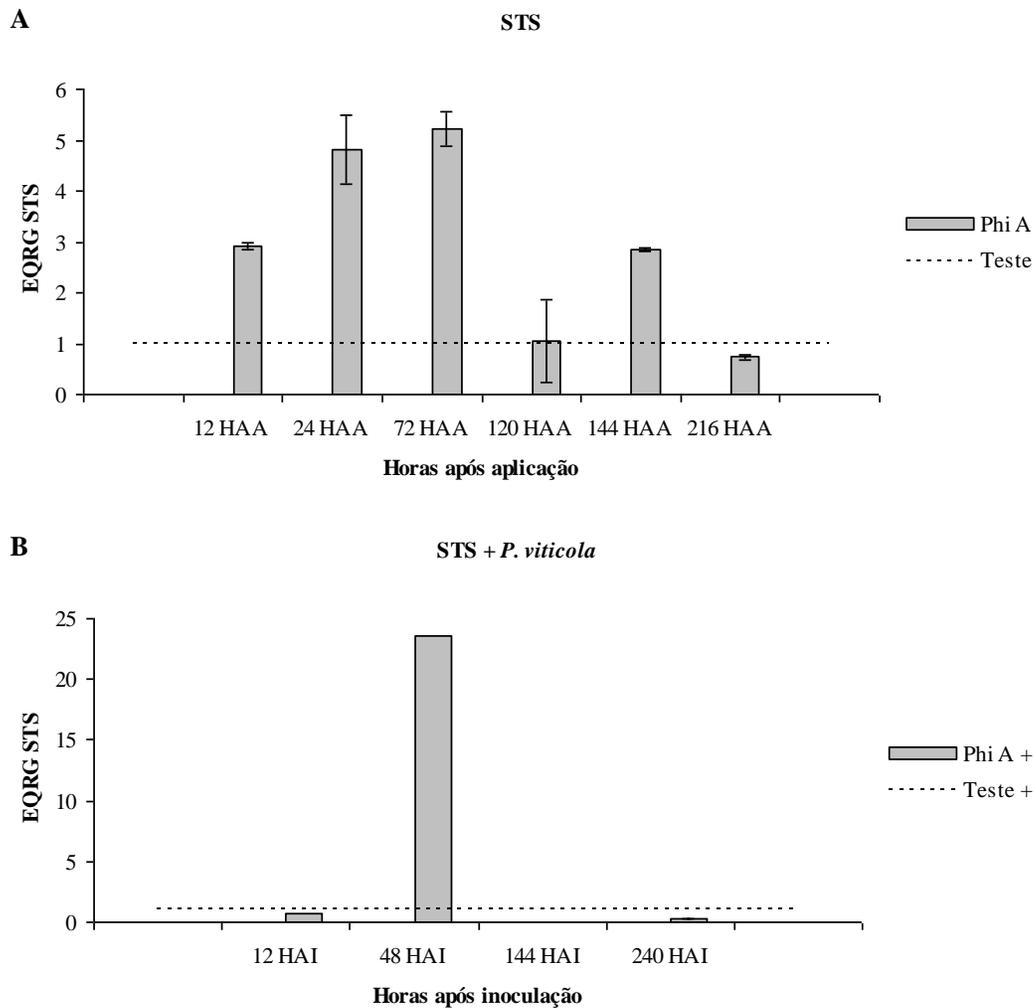


FIGURA 5 Perfil da expressão quantitativa relativa por PCR em tempo real (qRT-PCR) do genes *STS* (EQRGCAT). **A:** expressão do gene *STS* em folhas videira apenas com indutor Phi A, nos tempos 12, 24, 72, 120, 144 e 216 horas após pulverização de mudas de videira com fosfito de potássio Phi A; **B:** expressão do gene *STS* em folhas de videira com indutor Phi A inoculadas com *P. viticola*, nos tempos 12, 48, 144 e 240 horas após a inoculação com o patógeno *P. viticola*. Colunas representam a indução média de transcritos relativos aos controles (testemunha) não induzidos e não inoculados, no mesmo período, com valores dados a partir da média de cDNA dos três ensaios. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão dos genes *UBQ* e *NAD5*. Barras nas colunas representam o erro padrão da média.

O gene *CHS* foi represso em mudas de videira tratadas com fosfito de potássio (Phi A) e não inoculadas, em todas as avaliações, exceto às 12 e 144 horas, onde foi observada a indução de 3,2 e 1,2 vezes, respectivamente, em relação à testemunha (Figura 6A). Em plantas tratadas com fosfito de potássio (Phi A) e inoculadas com *P. viticola* foi observada maior expressão do gene as 144 HAA, mantendo-se alta até as 240 HAA, sendo essa expressão 5,3 e 2 vezes mais altas, respectivamente, em comparação com a testemunha inoculada (Figura 6B).

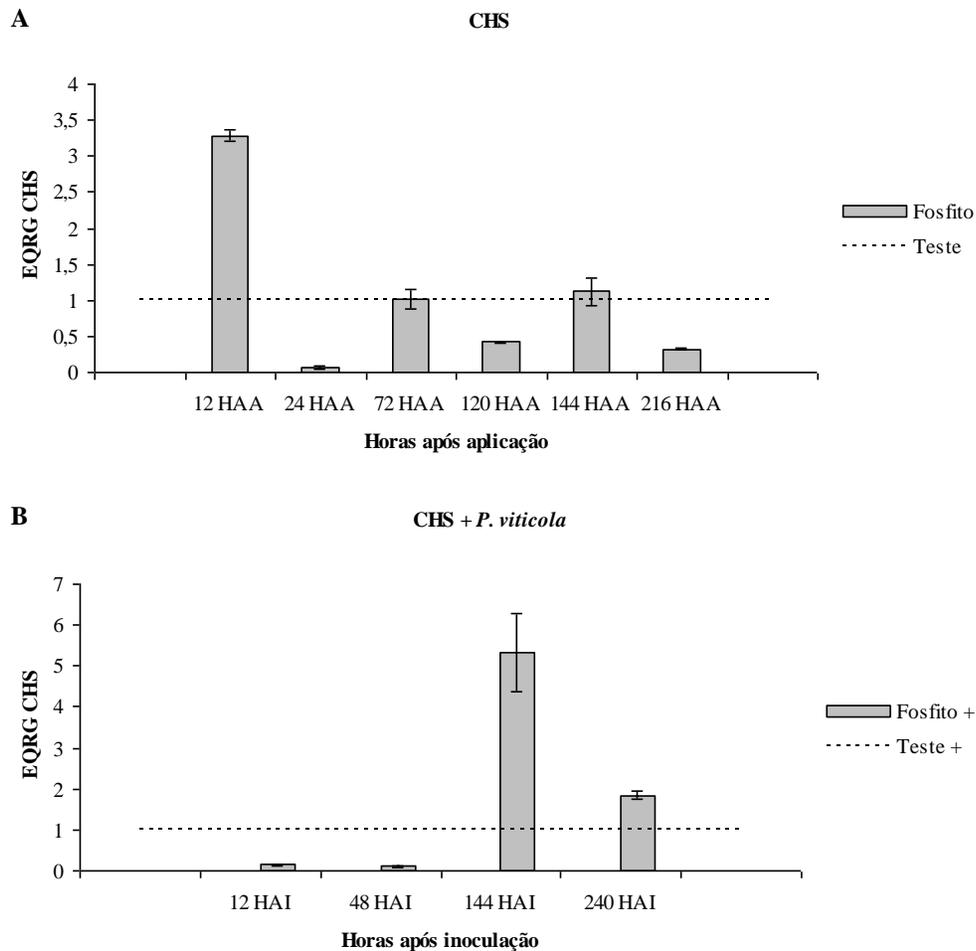


FIGURA 6 Perfil da expressão quantitativa relativa por PCR em tempo real (qRT-PCR) do genes *CHS* (EQRG CAT). **A:** expressão do gene *CHS* em folhas videira apenas com indutor Phi A, nos tempos 12, 24, 72, 120, 144 e 216 horas após pulverização de mudas de videira com fosfito de potássio Phi A; **B:** expressão do gene *CHS* em folhas de videira com indutor Phi A inoculadas com *P. viticola*, nos tempos 12, 48, 144 e 240 horas após a inoculação com o patógeno *P. viticola*. Colunas representam a indução média de transcritos relativos aos controles (testemunha) não induzidos e não inoculados, no mesmo período, com valores dados a partir da média de cDNA dos três ensaios. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão dos genes *UBQ* e *NAD5*. Barras nas colunas representam o erro padrão da média.

4 DISCUSSÃO

O fosfito de potássio (Phi A) proporcionou controle de *P. viticola*, diminuindo a severidade da doença nas folhas de videira cv. Merlot. Além disso, proporcionou o aumento das enzimas PAL, POD e SOD, as quais estão relacionadas à defesa de plantas contra patógenos. O aumento das enzimas ocorreu, principalmente, após a inoculação com *P. viticola*. Foi caracterizado, também, o aumento da expressão dos genes *STSy*, *PAL* e *CHS*, os quais são genes importantes, não somente para a videira, mas para as plantas em geral, pois participam na rota dos fenilpropanoides (JEANDET et al., 2002).

Os fosfitos vêm sendo utilizados no controle de diversos patógenos em diferentes culturas. Alguns autores demonstram a atuação direta, com efeito tóxico sobre os patógenos, enquanto outros mostram que os fosfitos são capazes de estimular a formação de substâncias naturais de autodefesa das plantas, levando a uma maior proteção ao ataque de patógenos (AMIRI; BOMPEIX, 2011; DANIEL; GUEST, 2006; ESHRAGHI et al., 2011; KING et al., 2010; KORTEKAMP, 2006; PEREIRA et al., 2010).

Diversos autores relatam que videiras, durante a infecção com patógenos, expressam diversas reações de defesa, tais como aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, reações de hipersensibilidade, aumento da atividade de peroxidase, acúmulo de compostos fenólicos, produção de fitoalexinas (estilbenos), além da síntese de proteínas relacionada à patogênese (PRP's) (CHONG et al., 2008; KORTEKAMP, 2006; KORTEKAMP; ZYPRIAN, 2003; LEGAY et al., 2011; PEZET et al., 2004; POLESANI et al., 2010; TROTEL-AZIZ et al., 2006).

Kortekamp (2006) observou aumento da expressão dos genes *PAL*, *CHS* e *STSy*, 12 e 24 horas após a inoculação com o patógeno *P. viticola* em folhas de videira cv. Riesling. Já no presente trabalho, o aumento da expressão desses genes foi verificado às 48 e 144 horas após a inoculação com o patógeno.

Legay et al. (2011) observaram em videira cv. Chasselas, a expressão de mais de 800 genes em resposta à infecção por *P.viticolae* 24% desses genes foram classificados como envolvidos na resposta de defesa e 11% como envolvidos na biossíntese de lignina e fenilpropanoides. Esses mesmos autores, ao utilizar a técnica de RT-qPCR, em plantas inoculadas e não inoculadas, genes PR foram altamente induzidos. A expressão de PR-10 e quitinase foram superiores à testemunha em 160 vezes, 12 horas após a inoculação, já o gene PR-1, em plantas inoculadas, foi 9,5 vezes mais induzido, às 12 horas após a inoculação e, por fim, esses autores observaram que a expressão do gene *CHS* não foi alterada quando as mudas de videira foram inoculadas com *P. viticola*. No presente trabalho, plantas tratadas com fosfito de potássio, às 12 horas após a aplicação, apresentaram expressão de *CHS* 3,5 vezes superior a plantas não tratadas e, quando as plantas tratadas foram inoculadas com *P. viticola*, foi observada a expressão deste gene, em 5,3 e 3 vezes superior à testemunha pulverizada com água e não inoculada, correspondendo à 144 e 240 horas após a inoculação com o patógeno, respectivamente.

Ao pulverizar folhas de videira cv. Chardonnay com ácido salicílico (AS) e a mistura de metiljasmonato e precursor de etileno (MeJa/ACC), Chong et al. (2008) observaram que esses compostos induziram a expressão do gene *PAL* e não alteraram a expressão do gene *STSy*. Ao inocular as folhas com os patógenos *Botrytis cinerea* e *P. viticola*, os autores observaram que esses genes foram altamente expressos, a partir de 48 horas da inoculação, o gene *PAL* foi fortemente expresso de 48 até 96 horas após a inoculação e, já o gene *STSy*, mostrou-se com maior expressão até 72 horas após a inoculação. O fosfito de potássio neste trabalho, também, foi capaz de aumentar a expressão dos genes *PAL* e *STSy*. Para o gene *PAL*, a maior expressão foi obtida 144 horas após a aplicação e para o gene *STSy*, o fosfito de potássio proporcionou aumento das 12 até 144 horas após a aplicação. Em plantas tratadas com fosfito de potássio (Phi

A) e inoculadas com *P. viticola* o gene *PAL* foi fortemente expresso às 48 e 144 horas após a inoculação e o gene *STSy*, mostrou-se com super expressão apenas 48 horas após a inoculação com o patógeno.

Além de patógenos, outras substâncias, tais como produtos e extratos vegetais, podem induzir respostas de defesa em plantas, além de promover o aumento na resistência contra os mesmos (AZIZ et al., 2006; GODARD et al., 2009; HAMIDUZZAMAN et al., 2005; TROTEL-AZIZ et al., 2006). No presente estudo, o fosfito de potássio (Phi A) foi capaz de desencadear aumento na expressão dos genes *PAL*, *STSy* e *CHS*, os quais são genes da via dos fenilpropanoides, e que na videira, são muito importantes, pois a *PAL* inicia a via biossintética de fenilpropanoides, o *STSy* conduz a síntese das fitoalexinas, no caso o resveratrol, e a *CHS*, é responsável pela biossíntese das antocianinas (JEANDET et al., 2002; ROBERT et al., 2001).

Ao avaliar o efeito de prolina exógena em folhas de videira cv. Okuzgozu, Ozden, Demirel e Kahraman(2009) verificaram em folhas, com maior estresse, que a aplicação de prolina proporcionou efeitos contrários para as enzimas antioxidantes SOD e POD, verificando aumento na atividade de POD e diminuição na atividade de SOD, com aumento de prolina exógena nas folhas. Trotel-Aziz et al. (2006) observaram que quitosana na dose de 75 mg L⁻¹ proporcionaram controle de 70% de *B. cinera* em folhas de videira cv. Chardonnay, além de verificarem o aumento da atividade da enzima PAL, com picos às quatro, seis e 12 horas após a pulverização. Jackson et al. (2000) verificaram que mudas suscetíveis de *Eucalyptus marginata*, tratadas com fosfito e inoculadas com *P. cinnamomi*, apresentaram elevada atividade de enzimas envolvidas na resposta de defesa, incluindo fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamil álcool desidrogenase (CAD) e, conseqüentemente, a elevada síntese de compostos fenólicos, além de redução do desenvolvimento de lesões da doença

em folhas tratadas com fosfito, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes aos obtidos por Jackson et al. (2000), Ozden, Demirel e Kahraman(2009) e Trotel-Aziz et al. (2006) evidenciando que determinadas substâncias podem desencadear o mecanismo de reação de plantas, induzindo enzimas que irão atuar no mecanismo de defesa contra patógenos. Todas as enzimas testadas tiveram a atividade aumentada com a pulverização de fosfito de potássio Phi A, principalmente após a inoculação com o patógeno *P. viticola*, caracterizando o efeito *priming*, com uma rápida e efetiva ativação da resposta de defesa celular (CONRATH; PIESTERSE; MANI, 2002).

De acordo com Jeandet et al. (2002), as fitoalexinas estilbénicas da videira, tais como flavonoides, são formados na rota dos fenilpropanoides. A síntese desses compostos só ocorre se a PAL e genes subsequentes forem induzidos. Dessa forma, CHS e STS são as enzimas mais importantes na ramificação da rota dos fenilpropanoides, sendo suas atividades enzimáticas e expressão gênicas, intimamente relacionadas com a biossíntese de fitoalexinas em videira. Segundo Bézier, Lambert e Baillieul (2002), uma maior expressão de CHS e STS, após a inoculação com *P. viticola*, pode indicar uma ativação de respostas de defesa, entretanto isso pode não ser o fator limitante para impedir a entrada e estabelecimento do patógeno.

Biologicamente, os zoósporos de *P. viticola*, quando em contato com folhas de videira susceptíveis, germinam formando tubo germinativo que penetram nos estômatos e em seguida começa sua colonização foliar. Esse processo de colonização leva até 48 horas e com o máximo de quatro a cinco dias, ocorre formação de mancha óleo, que, em condições favoráveis, com alta umidade, as hifas crescem na cavidade subestomática e dão origem a esporangióforos que emergem dos estômatos, tornando uma esporulação visível

com até sete dias após a infecção (BURRUANO, 2000). Gindro, Pezet e Viret(2003) observaram aumento de calose e viniferin 48 horas após a inoculação com *P. viticola* em 42 cultivares de videira. De acordo com os resultados do presente estudo, os genes e as enzimas avaliadas durante a interação de folhas de videira tratadas com Phi A e inoculadas com *P. viticola* aumentaram significativamente a expressão e atividade de 12 até 48 horas, após a inoculação, indicando a resposta da planta no início da infecção. Esse comportamento, também, foi observado em plantas apenas tratadas com o fosfito Phi A, mostrando o potencial desse composto em contribuir e aumentar a resposta de defesa da videira, o que levou ao maior controle da doença nas folhas.

O fosfito de potássio Phi A mostrou-se como indutor de resistência em plantas de videira cv. Merlot, aumentando a expressão de genes e enzimas, que atuam como antioxidantes e na rota dos fenilpropanoides, relacionados à defesa da videira, levando ao controle da doença nas folhas.

5 CONCLUSÃO

O fosfito de potássio (Phi A) proporciona controle do míldio da videira.

O fosfito de potássio (Phi A) induz aumento da expressão de genes e atividade de enzimas relacionadas à defesa, que participam da via dos fenilpropanoides na videira.

O fosfito de potássio pode ser uma alternativa no manejo integrado do míldio da videira, atuando como indutor de resistência levando à menor severidade da doença.

REFERÊNCIAS

- AMIRI, A.; BOMPEIX, G. Control of *Penicillium expansum* with potassium phosphite and heat treatment. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, p. 222-227, Nov. 2011.
- AZEVEDO, L. A. S. de. **Manual de quantificação de doenças de plantas**. São Paulo: Ciba Agro e Novartis, 1997. 114 p.
- AZIZ, A. et al. Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 11, p. 1188-1194, Nov. 2006.
- BAYSAL, Ö.; TURGUT, C.; MAO, G. Acilbenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves: acilbenzolar-S-methyl induces. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 49, n. 4, p. 599-604, 2005.
- BÉZIER, A.; LAMBERT, B.; BAILLIEUL, F. Study of defense-related gene expression in grapevine leaves infected with *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 2, p. 111-120, Feb. 2002.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BURRUANO, S. The life-cycle of *Plasmopara viticola*, cause of downy mildew of vine. **Mycologist**, Cambridge, v. 14, p. 179-192, Nov. 2000.
- CHONG, J. et al. Identification, expression analysis and characterization of defense and signaling genes in *Vitis vinifera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 46, p. 469-481, 2008.
- COHEN, M. D.; COFFEY, M. D. Systemic fungicides and the control of oomycetes. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 311-338, 1986.

COHEN, Y.; REUVENI, M.; BAIDER, A. Local and systemic activity of BABA (DL-3-aminobutyric acid) against *Plasmopara viticola* in grapevines. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.105, n. 4, p.351-361, June 1999.

CONRATH, N.; PIESTERSE, C. M. J.; MANI, B. M. Priming in plant-pathogens interaction. **Plant Science**, Shannon, v. 7, n. 5, p. 210-216, 2002.

DALIO, R. J. D. et al. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 206-243, 2012.

DANIEL, R.; GUEST, D. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 67, n. 3/5, p. 194-201, Sept./Dec. 2006.

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

GINDRO, K.; PEZET, R.; VIRET, O. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. **Plant Physiology Biochemistry**, New Delhi, v.41, p. 846-853, Jan. 2003.

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

ESHRAHGI, L. et al. Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 60, p. 1086-1095, May 2011.

GUTHA, L.R. et al. Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. **BMC Plant Biology**, London, v. 10, p. 187, Aug. 2010.

HAMIDUZZAMAN, M.M. et al. Beta-Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, n. 8, p. 819-829, Aug. 2005.

HUKKANEM, A. T. et al. Benzothiadiazole induces the accumulation of phenolics and improves resistance to powdery mildew in strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 5, p. 1862-1870, Mar. 2007.

JACKSON, T. J. et al. Action of the fungicide phosphonate on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 147-154, Feb. 2000.

JEANDET, P. et al. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 10, p. 2731-2741, Apr. 2002.

KING, M. et al. Defining the phosphate regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 284, p. 425-435, Sept. 2010.

KORTEKAMP, A. Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 44, p. 58-67, Feb. 2006.

KORTEKAMP, A.; ZYPRIAN, E. Characterization of plasmopara-resistance in grapevine using in vitro plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, n. 10, p. 1393-1400, July 2003.

LANDI, L.; ROMANAZZI, G. Seasonal variation of defense-related gene expression in leaves from bois noir affected and recovered grapevines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 3, p. 6628-6637, May 2011.

LEGAY, G. et al. Identification of genes expressed during the compatible interaction of grapevine with *Plasmopara viticola* through suppression subtractive hybridization (SSH). **European Journal Plant Pathology**, Dordrecht, v. 129, p. 281-301, Sept. 2011.

LI, J.; ZINGEN, I.; BUCHENAUER, H. Induction of resistance of cotton plants to *Verticillium* wilt and of tomato plants to *Fusarium* wilt by 3-aminobutyric acid and methyl jasmonate. **Journal of Plant Diseases and Plant Protection**, Berne, v. 103, n. 3, p. 288-299, Mar. 1996.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT Method. **Methods: A Companion to Methods in Enzymology**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

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

MADDEN, L. V. et al. Evaluation of a disease warning system for downy mildew of grapes. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 25, p. 549-554, Apr. 2000.

OZDEN, M.; DEMIREL, U.; KAHRAMAN, A. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 119, p. 163-168, Aug. 2009.

PEREIRA, V. F. et al. Fosfite de potássio no controle do míldio da videira e características físico-químicas de uvas Merlot. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 11, p. 1581-1588, nov. 2012.

PEREIRA, V. F. et al. Produtos alternativos na proteção da videira contra o míldio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 1, p. 25-31, jan. 2010.

PEZET, R. et al. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. **Vitis**, Siebeldingen, v. 43, n. 2, p. 145-148, May 2004.

POLESANI, M. et al. General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. **BMC Genomics**, London, v. 11, p. 117, Feb. 2010.

ROBERT, N. et al. Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv. *psidi*: expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 2, p. 249-261, Feb. 2001.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R. **Avaliação da eficácia de algumas marcas comerciais de fosfito de potássio e de fosfonato de Potássio no controle do míldio da videira**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2005. 13 p.

SOUZA, M. et al. Videira. In: RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; VENEGA, V. H. A. (Ed.). **Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: CFSEMG, 1999. p. 257-261.

TANAKA, Y.; URITANI, I. Polarity of production of polyphenols and development of various enzyme activities in cut-injured sweet potato root tissue. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 60, p. 563-566, 1977.

TAVARES, G. M. et al. Indução de resistência do mamoeiro à podridão radicular por indutores bióticos e abióticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 11, p. 1416-1423, nov. 2009.

TROTEL-AZIZ, P. et al. Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinera*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 114, n. 4, p. 405-413, Apr. 2006.

VIRET, O. et al. Prévion et gestion des infections du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) à l'aide d'une station d'avertissement. **Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture**, Nyon, v. 33, n. 2, p. 1-12, Jan. 2001.

WIELGOSS, A.; KORTEKAMP, A. Comparison of PR1 expression in grapevine cultures after inoculation with a host- and a non-host pathogen. **Vitis**, Siebeldingen, v. 45, n. 1, p. 9-13, Jan. 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo revelou que o controle do míldio da videira pelo fosfito de potássio pode ser explicado pela ativação das respostas de defesa nas plantas de videira por meio da indução de genes e enzimas da rota dos fenilpropanoides.

A ativação das respostas de defesa, bem como os mecanismos que as envolvem são complexos e, durante uma íntima interação planta-patógeno, é esperado detectar aumentos e decréscimos de níveis de expressão e atividade dos diversos genes e proteínas envolvidos na defesa vegetal, durante todo o curso do processo infeccioso.

Os fosfitos de potássio podem ser utilizados no manejo de doenças da videira, pois não alteraram as características físico-químicas das bagas, além de proporcionar produtividade semelhante aos tratamentos com fungicidas padrões utilizados e, também, influenciar nos teores de *trans*-resveratrol nas cascas e vinhos.

Tornam-se necessários mais estudos para reafirmar a influências dos fosfitos nos vinhos, além da necessidade de uma análise sensorial nos mesmos para verificar se não interferem na qualidade destes.

A aplicação dos fosfitos de potássio de forma alternada com fungicidas convencionais pode ser uma alternativa eficiente para o manejo integrado do míldio da videira, reduzindo custos e proporcionando maior controle da doença.

ANEXOS

I

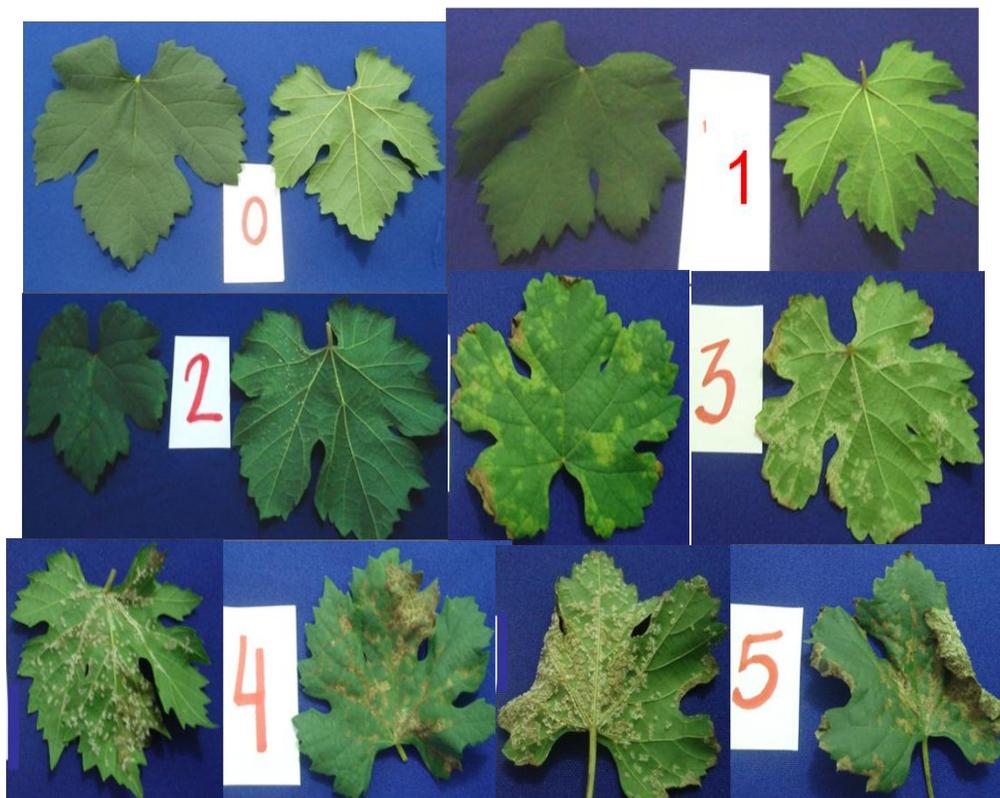


Figura 1: Escala de notas utilizada para avaliação do míldio (*P. viticola*) em folhas de videira cv. Merlot, em todos os experimentos. Adaptada da escala de Azevedo (1997) e Cohen et. al., (1999). Notas: 0 – ausência doença; 1 – até 5% sintomas; 2 – até 20% sintomas; 3 – até 35% sintomas; 4 – até 50% sintomas e 5 – Mais de 50% com sintomas

ANEXO II

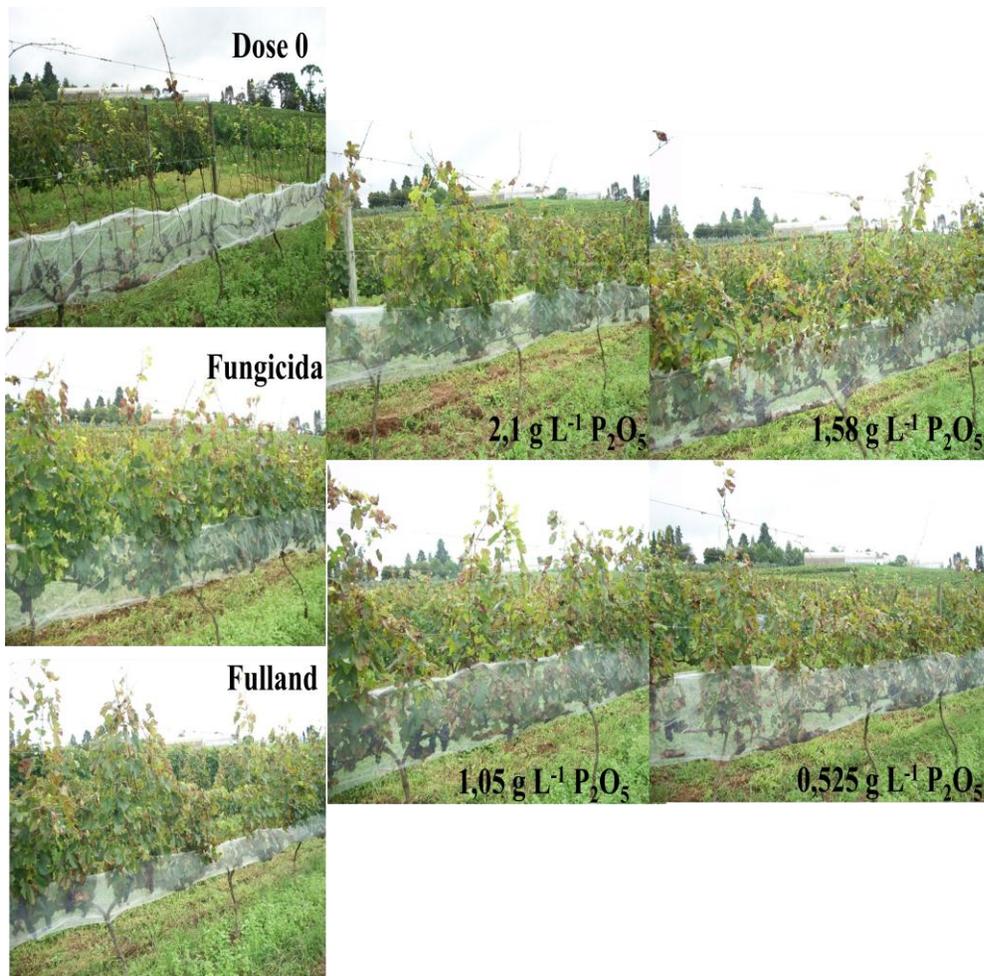


Figura 1: Videiras submetidas aos tratamentos com fosfito de potássio Phi A, nas diferentes concentrações de P₂O₅, comparadas aos tratamentos com fertilizante foliar Fulland, fungicidas e testemunha, para controle do míldio (*P. viticola*) em Caldas-MG, na safra de 2010/2011.

ANEXO III

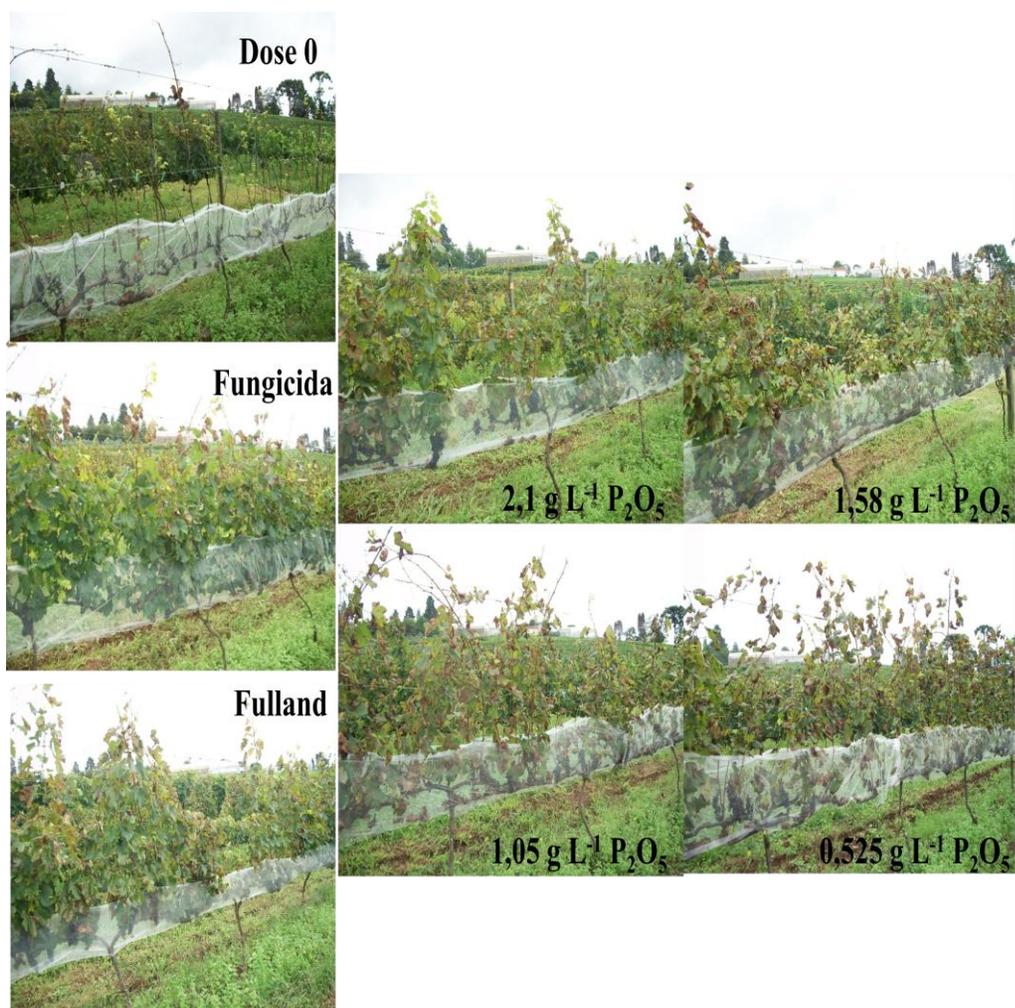


Figura 1: Videiras submetidas aos tratamentos com fosfito de potássio Phi B, nas diferentes concentrações de P₂O₅, comparadas aos tratamentos com fertilizante foliar Fulland, fungicidas e testemunha, para controle do míldio (*P. viticola*) em Caldas-MG, na safra de 2010/2011.