



**EDUARDA MENDES DE CARVALHO**

**IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO  
RADICULAR DE VIDEIRA**

**LAVRAS - MG  
2023**

**EDUARDA MENDES DE CARVALHO**

**IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO RADICULAR DE  
VIDEIRA**

Monografia apresentada à Universidade Federal  
de Lavras, como parte das exigências do Curso de  
Agronomia, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza  
Orientador

Me. José Manoel Ferreira de Lima Cruz  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2023**

**EDUARDA MENDES DE CARVALHO**

**IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO RADICULAR DE  
VIDEIRA**

**IDENTIFICATION OF THE CAUSAL AGENT OF ROOT ROT IN GRAPEVINE**

Monografia apresentada à Universidade Federal  
de Lavras, como parte das exigências do Curso de  
Agronomia, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 30 de novembro de 2023.

Dr. Pedro Maranhã Peche UFLA

Dra. Claudia Rita de Souza EPAMIG

Dr. Valter Cruz Magalhães UFLA

Dra. Rafaela Araujo Guimarães UFLA

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza  
Orientador

Me. José Manoel Ferreira de Lima Cruz  
Coorientador

**LAVRAS - MG  
2023**

*A Deus por ter me iluminado durante todo meu caminho.  
Aos meus pais Isabel e José de Arimatéia e meu irmão Marcos por todo apoio, amor e  
cumplicidade.  
E a todos meus familiares e amigos.*

**DEDICO.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me guiado e iluminado meu caminho durante meus cinco anos de graduação.

Aos meus pais Isabel Cristina Moreira Mendes e José de Arimatéia Mendes de Carvalho por todo apoio, ajuda e incentivo durante a minha trajetória na Universidade.

Ao meu irmão Marcos e minha cunhada Ana Luiza por todo companheirismo e apoio.

Aos meus avós maternos Geraldo e Maria de Fátima e avó paterna Dina Mendes por todas orações e apoio.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Fitopatologia (DFP/UFLA) e a todos os profissionais e técnicos que estiveram me ajudando no dia a dia do laboratório.

Ao Laboratório de Fitopatologia Molecular pelo apoio e ajuda nos experimentos realizados.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza e Coorientador Me. José Manoel Ferreira de Lima Cruz por todas as instruções e ensinamentos ao longo de minha iniciação científica e toda sua equipe de orientados (Valter, Brunno, Ananda, José Manoel, Jéssica, Regiane, Lúcia, Pedro) que tornaram os experimentos mais leves e agradáveis de serem conduzidos me auxiliando com toda a ajuda possível.

A todos professores, técnicos e funcionários da Universidade Federal de Lavras (UFLA) que tornaram minha formação possível.

Ao Núcleo de Estudos em Ciências do Solo (NECS), por todos os ensinamentos adquiridos e pela oportunidade de me desenvolver profissionalmente e pessoalmente.

Ao Núcleo de Estudos em Fitopatologia (NEFIT), por ter contribuído em minha formação acadêmica e por todas as amizades.

A todos meus amigos que fiz durante a graduação, em especial Hellen, Nádia, Ariela, Lara e Isabela por todo apoio e incentivo nos momentos em que mais precisei, com vocês essa trajetória se tornou mais leve e prazerosa.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições para este trabalho.

A toda minha família e amigos que de alguma forma contribuíram para minha formação.

**MUITO OBRIGADA À TODOS!**

## RESUMO

A maioria das videiras são propagadas por enxertia, porém os porta-enxertos utilizados no manejo da poda dupla são suscetíveis à podridão radicular, principalmente em viveiros no sul de Minas Gerais, Brasil. O agente etiológico da podridão radicular ainda é desconhecido, porém análises preliminares indicam a associação constante do gênero *Fusarium*. A confirmação do agente causal desta doença é extremamente necessário para medidas de controle eficazes. Dessa forma, o objetivo da presente pesquisa foi determinar o agente causal da podridão radicular da videira. O teste de patogenicidade foi conduzido utilizando-se 10 isolados do gênero *Fusarium*, proveniente de mudas com porta-enxertos IAC766 e IAC313 que apresentavam sintomas de podridão radicular. Estacas de videira proveniente do porta-enxerto IAC766 obtidas em vinhedos na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) foram enraizadas e utilizadas para a inoculação dos isolados em casa de vegetação. A base do caule do porta-enxerto foi lesionada antes da inoculação e algodão estéril umedecido foi acondicionado ao lado oposto a fim de manter a umidade e facilitar o processo de infecção. Sobre a lesão foi aderido o micélio fúngico contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) ( $\varnothing$  5,0 mm), na qual o grupo controle foi composto por plantas inoculadas apenas com BDA. O delineamento inteiramente casualizado foi utilizado com seis plantas por repetição. Cerca de 90 dias após a inoculação, os caules e as raízes das mudas foram cortados para exame dos sintomas em microscópio estereoscópio e o agente causal reisolado de fragmentos sintomáticos. Análises de microscopia eletrônica de varredura também foi realizado para corroborar com os resultados obtidos, determinando o perfil da composição química dos porta-enxerto após o experimento. Após a realização dos ensaios, foi constatado três isolados (JM040, JM041 e JM037) como possíveis agentes causais da podridão radicular da videira. Os isolados JM040, JM041 e JM037 foram os mais virulentos, com incidência de 100% das plantas, apresentando escurecimento do feixe vascular. O perfil químico do porta-enxerto 766 após inoculação de *Fusarium*, atestou atividade de defesa da planta com o aumento da concentração de silício (Si) nos feixes vasculares da planta. A identificação destes isolados a nível molecular será importante para conhecer a(s) espécie(s) que está(ão) ocasionando a podridão radicular de mudas em videira, bem como sua biologia e ecologia nos vinhedos.

**Palavras-chave:** *Fusarium* spp., Patogenicidade, Porta-enxertos, Uva, *Vitis vinífera* L.,

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Perfil eletroforético das ampliações de BOX-PCR dos isolados selecionados.....	21
Figura 2 - Incidência de podridão dos feixes vasculares em porta-enxerto de videira .....	23
Figura 3 - Eletromicrografia de varredura dos vasos do xilema de videira ( <i>Vitis vinífera</i> L.) .....	24
Figura 4 - Microanálise de raio x destacando o mapeamento de silício (Si) e cálcio (Ca) em tecidos com podridão radicular de videira ( <i>Vitis vinífera</i> L.). .....	25

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO .....	9
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	10
3.MATERIAL E MÉTODOS .....	17
4.RESULTADOS.....	21
5.DISSCUSSÃO .....	26
6.CONCLUSÃO .....	27
7.REFERÊNCIAS.....	28



## 1 INTRODUÇÃO

A videira (*Vitis vinifera* L.) destaca-se por sua elevada importância econômica e por seus frutos apresentarem excelente qualidade com ampla diversidade morfológica e genética, sendo uma das culturas agrícolas mais antigas do mundo, cultivada principalmente para a produção de frutas de mesa, frutas secas, suco e vinho (OLIVEIRA et al., 2020; MILOVANOV et al., 2019). No sudeste brasileiro concentram-se a produção de uvas para a elaboração de vinhos finos, durante o outono-inverno, empregando-se o manejo de dupla poda (REGINA et al., 2010; FAVERO et al., 2011; ALMEIDA JR et al., 2019).

No Sul de Minas Gerais, a produção comercial de estacas enxertadas é realizada por enxertia mecânica e esse processo envolve a refrigeração das estacas enxertadas a 4°C, após retirada do viveiro, por um período de 2 meses. Este procedimento quebra a dormência e conserva as estacas enxertadas antes do plantio definitivo no campo (REGINA et al., 2012). No entanto, durante a produção comercial em viveiros, vários fitopatógenos podem afetar negativamente o pegamento de mudas dos porta-enxertos de cultivares de videiras comerciais, reduzindo a produtividade e vigor, como a podridão radicular de mudas (ARMIJO et al., 2016).

A podridão radicular é uma doença que tem um impacto significativo na produção agrícola global. Dependendo do agente causal, da suscetibilidade do hospedeiro e das condições ambientais, as perdas de colheitas podem variar desde o limiar econômico até a perda de campos completos (WILLIAMSON-BENAVIDES e DHINGRA, 2021). Nas estacas de videira, a podridão radicular ocorre durante a refrigeração e causa a morte das estacas enxertadas afetadas no campo. Observações dos técnicos do NTEUV indicam que a podridão radicular é mais comum nos porta-enxertos híbridos IAC313 e IAC766, que estão entre os mais utilizados devido ao seu alto desempenho no sistema de manejo de poda dupla (REGINA et al., 2012; DIAS et al., 2017; SOUZA et al., 2020), alto vigor e resistência à filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) (LEAO et al., 2020).

As análises da alteração morfológicas e composição química dos tecidos doentes são importantes ferramentas na geração de informações que possibilitam a identificação do agente causal, danos ocasionados, atividade de patogenicidade e compreensão do sistema de defesa das plantas, que posteriormente darão suporte no desenvolvimento de um controle eficaz (CALDWELL e IYER-PASCUZZI, 2019; ROCHA et al., 2022). Diante do exposto, objetivou-se determinar o agente causal da podridão radicular em mudas de videira verificando as alterações morfológicas e químicas induzidas em estacas de videira.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Importância da videira

A produção de *Vitis vinifera* L. tem grande destaque tanto para a produção alimentar mundial quanto à nível econômico. Estima-se que em 2019 a área total de cultivo da videira para todos os usos (vinho, uva de mesa e passas) é de 7,4 milhões de hectares, de acordo com a Organização internacional da Vinha e do Vinho (OIV) (PIRRELLO et al., 2023). As cultivares de videira europeia são as mais cultivadas no mundo por apresentarem frutos com alta qualidade e, são utilizados principalmente para a produção de frutas secas, sucos e na fabricação de vinhos finos e espumantes. (DE OLIVEIRA et al., 2020).

No Brasil, o cultivo da videira também tem grande importância econômica e ocupa uma área de aproximadamente de 84 mil hectares, com uma produção de 1,4 mil toneladas, deste montante cerca de 40% é destinado para a produção de vinhos. A região Sul se destaca na produção de uva, porém nos últimos anos outras regiões do país ganharam espaço no cultivo da videira e realizam um papel de destaque no cenário da produção de uva no Brasil (WURZ; BRIGHENTI, 2019). A região sudeste, por exemplo, apresenta excelente capacidade para produção de uvas com qualidade, utilizando o manejo de dupla poda com o intuito de melhorar a qualidade das uvas alterando o seu período de colheita. (REGINA et al., 2010).

A técnica mais empregada hoje para a produção comercial de mudas de videira é a enxertia de mesa e, os principais estados produtores são Minas Gerais e Rio Grande do Sul, com produção de aproximadamente 1 milhão e quinhentas mil mudas por ano (REGINA et al., 2012).

### 2.2 Propagação Vegetativa de Videira

**Enxertia:** a enxertia é um método utilizado para propagação vegetativa de plantas, é amplamente utilizada na fruticultura e horticultura e, consiste no principal método para produção comercial de mudas de videira. É realizado por meio da união da copa com o porta enxerto, de modo que estabeleça uma conexão vascular, acarretando na formação de uma nova planta com características dos dois componentes. O objetivo da utilização deste método é de melhorar o rendimento das plantas e proporcionar resistência a estresses bióticos e abióticos,

além disso têm influência direta na duração dos estádios fenológicos, estrutura da copa, crescimento e qualidade dos frutos. Foi adotada na produção de videira devido à ocorrência de filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*), que é um inseto sugador de seiva que destrói as raízes das plantas e, a partir deste acontecimento os produtores da Europa tiveram que alterar o modo de propagação das videiras. Posteriormente a este fato foram estudados alguns porta enxertos de videiras americanas que eram resistentes a doença, a partir deste momento começou-se a produzir mudas de videira enxertadas com o porta enxerto de videira americana como solução eficaz contra a praga e, além disso oferecem alternativa contra problemas de doenças transmitidas pelo solo. A principal técnica de enxertia utilizada é a enxertia de mesa e, para garantir o seu sucesso é preciso se atentar as condições fitossanitárias do local, escolher a copa e o porta enxerto que sejam compatíveis e que atendam às necessidades do vinhedo e realizar a enxertia de maneira correta, para que no campo a muda se desenvolva adequadamente e produza frutos de qualidade (SALAMA et al., 2023),(BEKAR, 2019),(TEDESCO et al., 2022).

**Estaquia:** a estaquia é um método de propagação vegetativa utilizada na produção comercial de mudas de frutíferas e tem por objetivo promover o enraizamento de partes da planta, que podem ser ramos, raízes e folhas. É amplamente utilizado na produção de mudas de videira por ser um método simples, rápido, econômico e que não necessita de locais amplos para a sua realização. Alguns fatores podem afetar o enraizamento das estacas e, podem ser internos ou externos. Os fatores internos que afetam o enraizamento das mudas referem-se à idade e maturidade do tecido e a formação de calos e raízes adventícias. Os fatores externos estão ligados ao meio de cultivo das estacas, tratamentos químicos, hormônios, luz, temperatura e tratamento mecânico (JALETA, 2019),(KUMAR SINGH, 2020).

### 2.3 Doenças da videira

A videira é uma frutífera que pode ser afetada por vários patógenos que causam doenças durante todo o seu ciclo, causando baixa qualidade nos frutos. Dentre esses patógenos, os mais importantes são mofo cinzento (*Botrytis cinera*), oídio (*Erysiphe necator*) e míldio (*Plasmopara viticola*) (ARMIJO et al., 2016).

**Mofo Cinzento** (*Botrytis cinera*): patógeno necrotrófico, que se alimenta de hospedeiros senescentes e, para isso apresenta características de virulência que acarreta em morte do seu hospedeiro, como a produção de proteínas efetoras, toxinas e enzimas, a produção dessas substâncias afeta a capacidade de defesa da planta e a torna susceptível ao ataque do patógeno. Pode causar em perdas de produção de 30% ao ano e em casos mais agravantes pode

gerar perdas de 50%. As condições ambientais favoráveis para a ocorrência da doença são temperaturas amenas e alta umidade relativa do ar. Os sintomas aparecem principalmente nos cachos de uvas que quando infectados apresentam uma podridão mole com odor desagradável. É uma doença que também pode ocorrer em pós colheita. O método de controle mais utilizado é o uso de fungicidas, porém se usados indiscriminadamente podem causar resistência do patógeno aos princípios ativos, além de causar danos ambientais e à saúde humana. Por isso, deve-se rotacionar os mecanismos de ação dos fungicidas e buscar outros métodos de controle da doença como por exemplo a utilização de variedades resistentes e, como o patógeno pode afetar o fruto na pós colheita é necessário utilizar métodos de controle que protejam o fruto nas etapas de armazenamento, transporte e comercialização. (YOUSSEF & ROBERTO, 2021) ;(LOVATO et al., 2019) ;(LI et al., 2021) ;(SUN et al., 2021).

**Oídio** (*Erysiphe necator*): patógeno biotrófico obrigatório, que afeta galhos, folhas e frutos da planta. Porém os tecidos jovens podem ser mais susceptíveis ao patógeno causando um crescimento branco na superfície do tecido do hospedeiro. Condições favoráveis para a germinação dos conídios na superfície das folhas são temperatura entre 20 a 27°C. Ocorre perda de qualidade dos frutos e redução do rendimento, diminuindo o teor de açúcar e acidez. A alta incidência dessas doenças faz com que muitos produtores de uva sejam dependentes de produtos químicos, já que seu controle depende de várias aplicações durante o ciclo da cultura e, o seu uso pode acarretar em perda de qualidade na produção do vinho pois os fungicidas podem alterar o seu gosto. Além disso, o uso de fungicidas de mesmos mecanismos de ação pode acarretar em uma resistência da planta aos químicos, por isso é importante que seja feita uma rotação de princípios ativos para controle eficaz da doença em videiras. (ARMIJO et al., 2016) (GOYAL et al., 2020). (LUKŠIĆ et al., 2022) (FAYYAZ et al., 2021) (YU et al., 2019).

**Míldio** (*Plasmopara viticola*): um dos principais patógenos causadores de doença na videira. É um oomiceto biotrófico que infecta todas as partes verdes da planta como folhas, inflorescências e cachos. Os danos do patógeno afetam a qualidade causando danos diretos às bagas, além de perdas quantitativas. Os sintomas da doença podem aparecer como lesões nas folhas de cor amarela ou marrom-avermelhadas na face adaxial e, crescimento de cor branca na face abaxial, podem ter um aspecto oleoso que se localiza entre as nervuras da planta. As condições favoráveis para a ocorrência da doença são temperaturas amenas e alta umidade relativa do ar e molhamento foliar. O ciclo biológico do patógeno apresenta uma fase assexuada que acontece no período vegetativo e uma fase sexuada, que é responsável pela sobrevivência do patógeno durante o inverno. Em regiões temperadas, os oósporos são a fonte primária de inóculos. O controle da doença é feito principalmente com o uso de fungicidas, porém o seu

uso indiscriminado pode acarretar em perdas de qualidade das uvas além de selecionar organismos resistentes, que torna o uso de químicos cada vez mais limitado e, por isso, deve-se controlar o patógeno utilizando outros métodos de controle além do uso de agrotóxicos, como por exemplo a produção em cultivo protegido. (TOFFOLATTI et al., 2018) ;(BOSO et al., 2014) ;(NASCIMENTO-GAVIOLI et al., 2020) ;(GOYAL et al., 2021).

**Doenças do tronco da videira:** além da ocorrência de doenças foliares a videira também pode ser afetada por doenças do tronco, como Eutypa, Botryosphaeria diebacks e doença de Esca. A ocorrência destas doenças associadas ao tronco da videira afeta negativamente no crescimento, rendimento e na qualidade da videira, e se caracteriza por ser de progressão lenta, ou seja, os sintomas podem aparecer depois de anos após a infecção. Os sintomas podem apresentar diferenças ao longo dos anos, este fato pode estar relacionado com ocorrência de estresses bióticos e abióticos. Estas doenças podem ser causadas por diferentes tipos de fungos que atacam os tecidos lenhosos da videira. Na família Botryosphaeriaceae estão incluídas as espécies *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila* e *Botryosphaeria dothidea*, além disso, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp., e outros gêneros e espécies de fungos têm sido associados as doenças do tronco da videira. Estes fungos penetram na planta por meio de ferimentos de poda, danos causados por insetos e rachaduras naturais no tronco da planta. Os sintomas da doença se caracterizam por deteriorar o sistema vascular da planta, afetando o desenvolvimento de estruturas vegetativas e, conseqüentemente, acarreta da redução drástica no rendimento, aumentando os custos de produção e prejuízos econômicos. Os sintomas também podem aparecer na parte aérea da planta, pois os fungos podem produzir metabólitos secundários com atividade fitotóxica, que são translocados para as folhas através do xilema. Para que o controle dessas doenças seja efetivo é necessário realizar o manejo por meio de métodos de controle físicos, químicos e biológicos (JIHANE KENFAOUI et al., 2023), (MUNTEAN et al., 2022).

Além dos patógenos citados, há a ocorrência da podridão radicular em mudas de videira produzidas comercialmente por meio da enxertia, principalmente em viveiros no sul de Minas Gerais. O agente acusador da doença ainda é desconhecido, porém análises mostram uma associação com o gênero *Fusarium* (Núcleo Tecnológico da Uva e do Vinho EPAMIG - NTEUV).

## 2.4 *Fusarium*

O gênero *Fusarium* é um dos mais estudados do reino fúngico e, apresenta uma diversidade morfológica e filogenética que dá a ele a capacidade de causar diversas doenças em plantas importantes no cenário agrícola (EZRARI et al., 2021). Muitas espécies do gênero *Fusarium* podem ser encontradas no solo e, podem ser parasitas, endofíticos e patógenos de plantas (AOKI; O'DONNELL; GEISER, 2014). Além disso, algumas espécies podem se disseminar por meio de gotículas de água da chuva e pela água utilizada na irrigação, como também por meio do vento podem atingir longas distâncias causando perdas econômicas em áreas cultivadas (RAMPERSAD, 2020). Vários fatores podem influenciar no crescimento, sobrevivência, disseminação e incidência do fungo, como por exemplo a susceptibilidade do hospedeiro e as condições climáticas e, conseqüentemente, podem agravar os sintomas da doença. Além disso as diferentes espécies do fungo podem responder de maneiras distintas às variações climáticas, e as que mais influenciam nessa diversidade são a temperatura e umidade. Portanto, a ocorrência da doença depende principalmente de condições ambientais favoráveis, que tornam o hospedeiro suscetível a entrada do patógeno (DOOHAN et al., 2003).

Por meio de técnicas de sequenciamento molecular foi possível identificar mais de trezentas espécies fitopatogênicas dentro do gênero *Fusarium* (REFs). As ferramentas moleculares permitiram agrupar as espécies fitopatogênicas de *Fusarium* em quatro complexos: complexo de espécies *F. solani*, *F. solani sensulato*, em que as espécies são responsáveis pelo apodrecimento de raiz em vários hospedeiros; complexo de espécies *F. oxysporum*, que são as espécies causadoras de murcha vascular e podridão radicular e incluem mais de 100 formações especiais (f. sp.); complexo de espécies *F. graminearum* e complexo de espécies *F. fujikuroi* (EZRARI et al., 2021).

O uso de técnicas moleculares para a identificação de fungos é um método amplamente utilizado para obter respostas seguras e assertivas quanto à identificação de espécies fitopatogênicas. A técnica mais utilizada é o sequenciamento do DNA, com o uso de primers específicos para espécies (MISHRA et al., 2002). O processo de identificação de espécies do gênero *Fusarium* é demorado e necessita de técnicas moleculares para uma identificação segura e eficiente. Vários genes são utilizados como o fator de alongamento de tradução-1 alfa (EF-1 $\alpha$ ), calmodulina,  $\alpha/\beta$ -tubulina e a região do espaçador transcrito interno (ITS) do DNA ribossômico (rDNA) foram avaliados como ferramentas moleculares de diagnóstico para identificar isolados de *Fusarium* (CAO et al., 2018).

O gênero *Fusarium* causa doenças que afetam tanto na qualidade dos frutos da videira como em termos econômicos. O fungo pode penetrar nos tecidos radiculares e levar a morte. A virulência da doença pode ser afetada também por organismos, como os insetos que provocam ferimentos na planta, tornando-as mais susceptíveis a entrada do *Fusarium*. (BRUM et al., 2012).

Os sintomas causados por *Fusarium* spp. nas videiras são: murcha, podridão e escurecimento dos ramos, amarelecimento e queda de folhas. Além disso, quando o patógeno penetra nas raízes, afeta o sistema vascular, prejudicando o transporte de água e nutrientes, ocasionando na morte da planta. Uma forma de controle da doença é a utilização de cultivares que tenham certa resistência ao fungo, porém o grau de resistência encontrado em *Vitis vinífera* é baixo e, portanto, não deve ser um método de controle utilizado isoladamente. Além disso, o fungo produz estruturas de resistência, os microescleródios e clamidósporos, que podem sobreviver no solo por longos períodos, essa característica do fungo o torna mais difícil de ser controlado (RUSSI; ALMANÇA; SCHWAMBACH, 2022) (BRUM et al., 2012).

## 2.5 BOX-PCR

BOX-PCR é uma técnica baseada em elementos do gene que se repetem e, é utilizada para analisar padrões específicos de grupos obtidos através da amplificação por PCR de elementos que se repetem no DNA. É um método que permite diferenciar grupos de microrganismos, como fungos, que estão diretamente relacionadas (BILUNG et al., 2018). Esta é uma variante de PCR palindrômico extragênico repetitivo (rep-PCR) que usa o iniciador BOX-A1R. Trata-se de uma impressão digital que se baseia em sequências repetitivas dispersa BOX, identificado pela primeira vez em *Streptococcus pneumoniae*. As sequências repetitivas BOX estão intercaladas por todo o genoma, o BOX-PCR é um método capaz de analisar simultaneamente muitas regiões de DNA espalhadas no genoma de microrganismos (BRUSETTI et al., 2008)

A ampla utilização da técnica de BOX-PCR se dá por ser um método rápido e barato. Os padrões de bandas gerados a partir de BOX-PCR não são afetados pela idade da cultura dos organismos que serão analisados e os resultados gerados a partir desta técnica podem ser facilmente analisados por meio da utilização da eletroforese em gel de agarose, por exemplo. Devido à essas características, o BOX-PCR tem sido uma ferramenta muito utilizada para estudos de diversidade microbiana. Apesar dos benefícios, a técnica de BOX-PCR apresenta algumas limitações, como baixa resolução de bandas e padronização de execução para

comparação dos diferentes perfis em diferentes géis. Para superar essas barreiras, é possível usar a separação de produtos marcados fluorescentes em sequenciador automatizado de DNA, mas essa melhoria foi aplicada raramente em análises ambientais e limitada a máquinas que realizam separação em longos géis de poliacrilamida (BRUSETTI et al., 2008).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### *Isolamento e preservação de microrganismos*

Mudas da variedade 'Syrah' cultivada no campo da estação experimental da EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), localizada na cidade de Caldas, Minas Gerais, Brasil, com sintomas de podridão radicular foram coletadas para isolamento de microrganismos. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas a 4 °C até o isolamento dos fungos no Laboratório de Fitopatologia Molecular da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Para o isolamento de fungos, fragmentos de tecidos radiculares de plantas sintomáticas foram esterilizados superficialmente por imersão em álcool (70%) por 1 min, seguida de imersão em NaClO (1%) por 3 min e finalmente enxaguado três vezes com água estéril. Posteriormente os fragmentos foram transferidos para meio batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. Culturas puras dos microrganismos isolados foram purificadas e conservadas em glicerol (40%) à - 80 °C e também no método de Castellani (1939) em temperatura ambiente.

#### *Identificação e agrupamento dos microrganismos*

A identificação preliminar dos isolados a nível de gênero foi realizada por meio de suas estruturas reprodutivas, com o auxílio de microscópio óptico, estereoscópico e literatura especializada (SEIFERT et al., 2011). Os isolados do gênero fúngico mais prevalente foram selecionados para extração do DNA gnômico e agrupamento por meio de BOX-PCR *fingerprint*.

Para a extração de DNA, os fungos foram crescidos no meio batata-dextrose (BD) líquido por aproximadamente 5 dias, com micélio coletado e armazenado a 20 °C. Posteriormente o micélio foi macerado em cadinho de porcelana em contato com N<sub>2</sub> líquido. Em seguida, aproximadamente 20 mg do macerado foi transferido para microtubos de 2 mL, aos quais foram adicionados 800 µL de um tampão constituído por: Tris-HCl 200 mM, pH 8,0, EDTA 0,5M, pH 8,0, NaCl 5M, SDS 10% e b-mercaptoetanol 1%. O macerado foi misturado ao tampão e os tubos mantidos em banho-maria (70 °C) por 1 h, sendo agitados a cada 10 min. Após a incubação, foi realizada a precipitação das proteínas, adicionando-se 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Em seguida as amostras foram agitadas, por suaves

inversões, por 10 min e centrifugados a 14.000 rpm, por 10 min a 4 °C. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para microtubos de 2,0 mL estéril. Para a precipitação do DNA, foi adicionado ao sobrenadante 14 µL de NaCl 5M e 500 µL de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a -20 °C por 2 h e, a seguir, centrifugados novamente por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 70 % gelado e seco à temperatura ambiente na câmara asséptica por meia hora. Posteriormente, os ácidos nucleicos totais foram ressuspensos em 100 µl de água ultra pura contendo RNase na concentração de 40 µg/ml e transferidos para um banho-maria por 30 min a 37 °C para a completa ressuspensão (AUSUBEL et al., 1992).

O BOX-PCR *fingerprint* foi realizado em um volume de reação de 25 µL contendo: 60 ng de DNA genômico, 2,5 µL de tampão PCR 1X, 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 2 µL de primer (10 pmol; BOXA1R, 5'- CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3'), 0,5 µL de dNTPs (10 mM de cada) e 0,3 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL, Ludwig Biotecnologia). A mistura reacional foi amplificada usando um termociclador TC9639 (Loccus, Brasil) com condições de PCR como segue: uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 3 min, seguida por 35 ciclos a 95 °C por 1 min, 55°C por 45 seg e 72 °C por 1 min e 30 seg, com extensão final a 72 °C por 5 min. Os amplicons foram corados com GelRed® (Biotium, USA) e analisados em gel de agarose à 2,0% em tampão TAE 1,0x por eletroforese conduzida a 70V durante 4 horas. Posteriormente, os amplicons de DNA BOX foram visualizados e documentados sob um transiluminador MiniBIS Pro® (DNR Bio-Imaging Systems, USA). Os tamanhos das bandas foram atribuídos por comparação direta com uma régua de DNA de baixo alcance executada simultaneamente a mais um marcador de 1 Kb Plus DNA Ladder (Cellco, Brasil). A comparação da similaridade genética foi com base em dados comuns de cada banda de BOX-PCR, que foi realizado na presença (1) ou ausência (0) de produtos de PCR amplificados de mesmo comprimento. Um dendograma foi construído usando o método de agrupamento de média aritmética de grupos de pares não ponderados com o algoritmo de alinhamento hierárquico.

### ***Teste de patogenicidade***

Estacas de videira proveniente do porta-enxerto IAC766 obtidas em vinhedos na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) foram enraizadas e utilizadas para a inoculação dos isolados em casa de vegetação. O teste de patogenicidade foi conduzido utilizando-se 10 isolados do gênero mais prevalente nos isolamentos, proveniente de mudas

com porta-enxertos IAC766 e IAC313 que apresentavam sintomas de podridão radicular. A base do caule do porta-enxerto foi lesionada antes da inoculação e algodão estéril umedecido foi acondicionado ao lado oposto a fim de manter a umidade e facilitar o processo de infecção. Sobre a lesão foi aderido o micélio fúngico purificado contendo BDA ( $\varnothing$  5,0 mm) com 7 dias de crescimento, na qual o grupo controle foi composto por plantas inoculadas apenas com BDA. Após 90 dias com a reprodução dos sintomas de podridão radicular, os fungos foram reisolados das lesões e comparados com as culturas puras originais para comprovar a patogenicidade dos isolados de acordo com os postulados de Koch.

Os ensaios foram repetidos duas vezes e conduzidos em triplicata utilizando o delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições. As análises estatísticas foram realizadas no software R (R Core Team, 2023) com os dados submetidos aos testes de normalidade dos resíduos por Shapiro-Wilk e homogeneidade das variâncias por Bartlett's. As diferenças significativas foram analisadas aplicando o teste de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0.05$ ) com as medianas comparadas pelo teste de Dunn ( $p \leq 0.05$ ) utilizando o ajuste do p-valor por Bonferroni.

### *Alterações químicas e morfológicas*

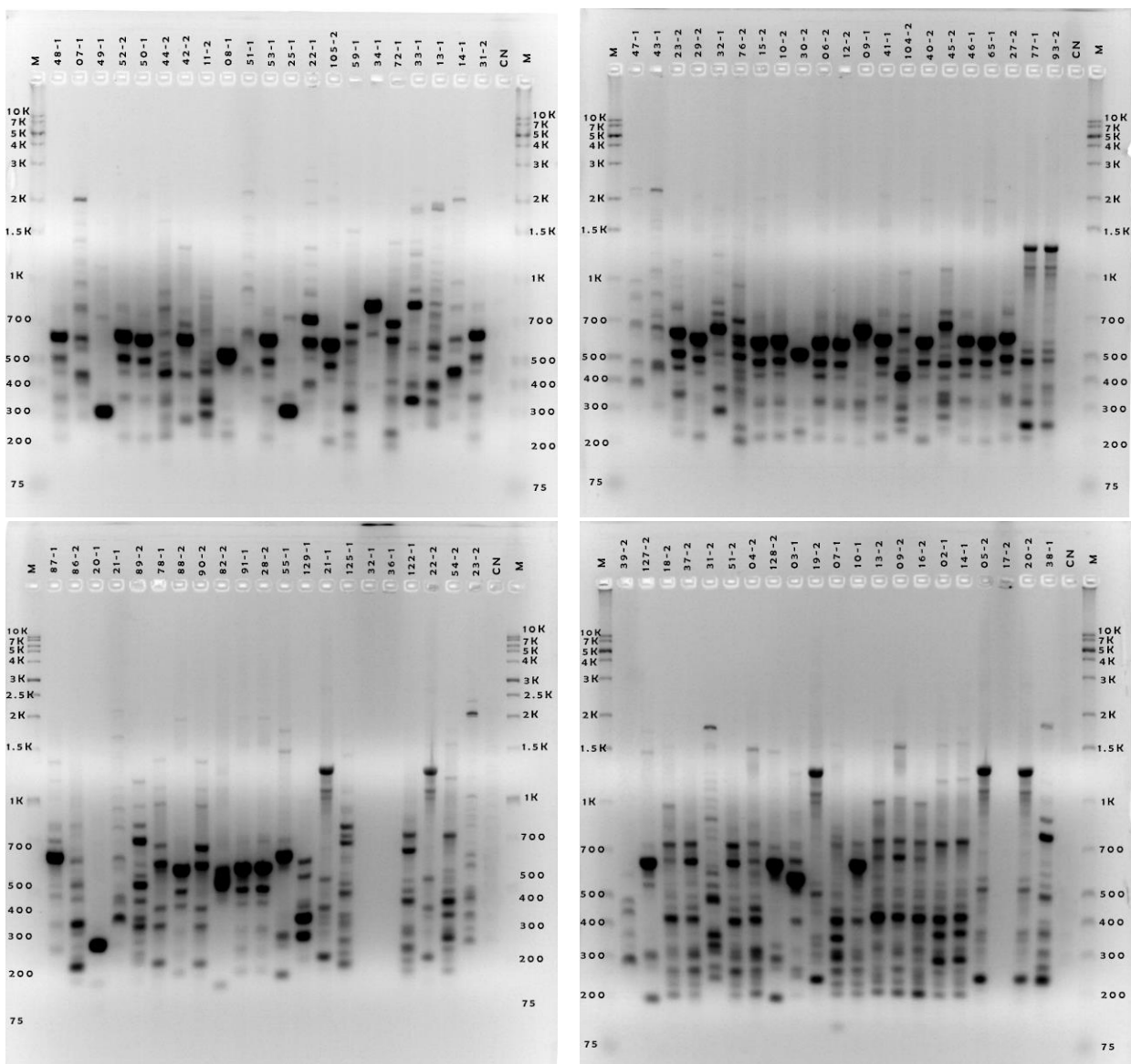
A composição química dos portas-enxertos sadios e sintomáticos foram analisadas em fragmentos da zona de transição entre a raiz e caule, na qual foram cortados com auxílio de tesoura de poda e aderidos em stubs de alumínio (revestidos de papel alumínio) com fita adesiva dupla face de carbono devidamente identificados. Esses espécimes foram mantidos em dessecador contendo sílica gel por 24 horas para desidratação. Posteriormente, foram levados à máquina de sputtering (MED 010, Balzer) e cobertos com uma camada de carbono. As amostras foram observadas em MEV (LEO EVO 40 XVP) acoplada ao sistema de detecção MAX: EDS X-Flash Detector 5010 (Bruker) e analisadas com o software ESPIRIT 1.9 (Bruker). Foram realizado mapeamento qualitativo dos elementos minerais das amostras de áreas com tecido assintomático e sintomático da zona de transição entre a raiz e caule. As imagens foram geradas e capturadas digitalmente sob condições de trabalho de 20 kV, distância de 9,0 mm, aumento de  $\pm 160$  vezes e Kcps variando entre 3 e 4. Selecionamos os nutrientes que apresentaram variação na distribuição ao longo do perfil sintomático e assintomático e elaboramos gráficos de distribuição.

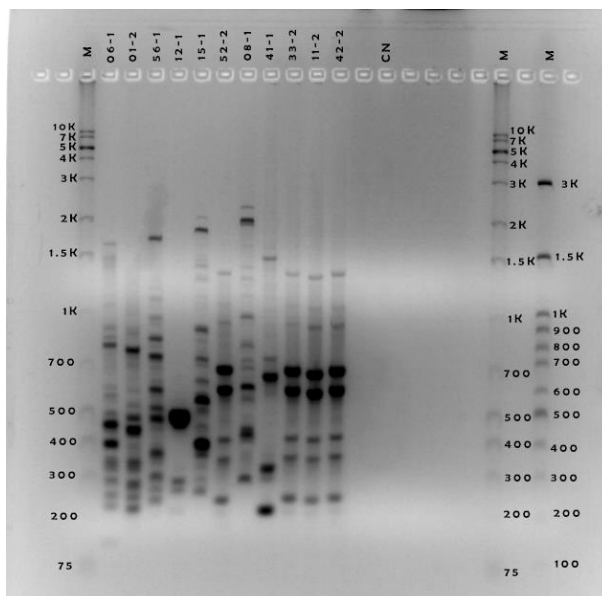
Para analisar as alterações morfológicas dos porta-enxertos sadios e sintomáticos, fragmentos da zona de transição entre a raiz e caule foram cortados com auxílio de tesoura de

poda e fixados em Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2, CaCl<sub>2</sub> 0,001M) por Alves et al. (2013), permanecendo nessa solução por 24 horas. As amostras foram então lavadas com tampão cacodilato (0,05M) e transferidas para desidratação sequencial em acetona 25%, 50%, 70%, 90% por 10 min cada e 100% 3 vezes por 10 min cada. Posteriormente, as amostras foram submetidas a secagem ao ponto crítico em CO<sub>2</sub> (Baltec, modelo CPD 030; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA). Os espécimes foram aderidos em stubs de alumínio (revestidos de papel alumínio) com dupla fita de carbono e aplicado o revestimento em ouro (Balzers SCD 050), sendo mantidos em dessecador com sílica gel até a observação (ALVES et al., 2013). As micrografias eletrônicas foram obtidas utilizando Microscópio Eletrônico de Varredura – MEV (LEO EVO 40 XVP, Carl Zeiss, Alemanha) e as imagens processadas utilizando o software CorelDRAW versão 22.0.

## 4 RESULTADOS

O gênero *Fusarium* foi o mais prevalente entre os 257 isolados obtidos, com um total de 95 culturas purificadas, sendo todas as culturas isoladas de mudas de videira com sintomas da podridão radicular. Os resultados do BOX-PCR *fingerprint* indicam uma alta diversidade de espécies associadas a porta-enxerto sintomáticos de videira, que deverá ser comprovada com análises moleculares de sequenciamento genético em genes específicos para o gênero (Figura 1).

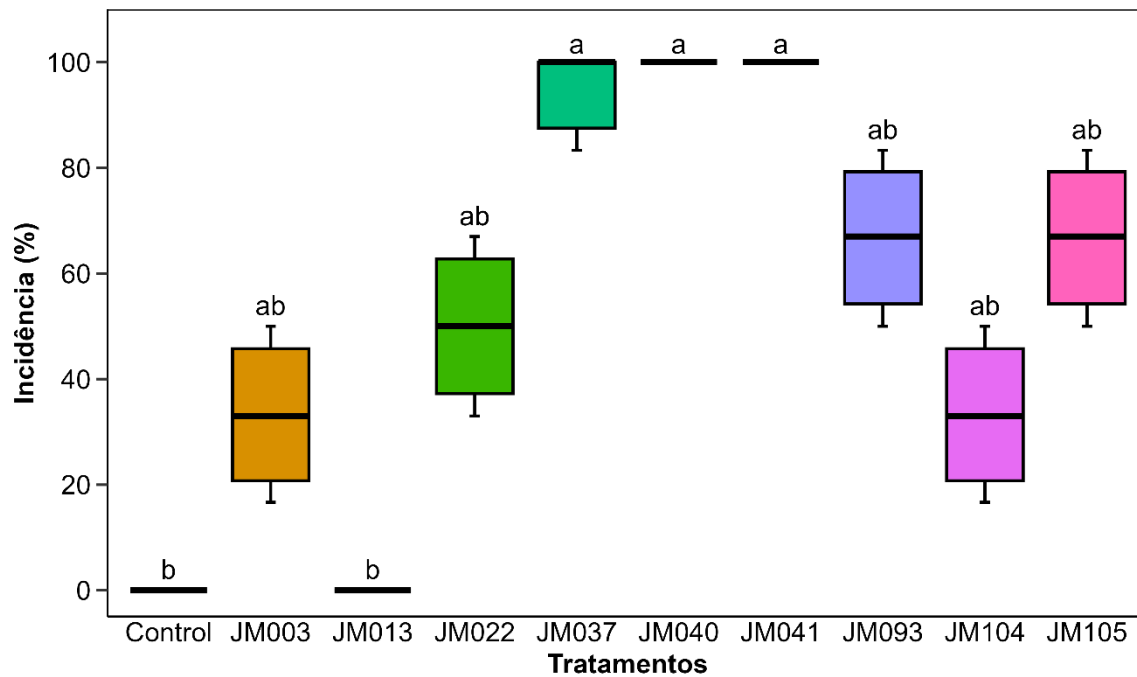




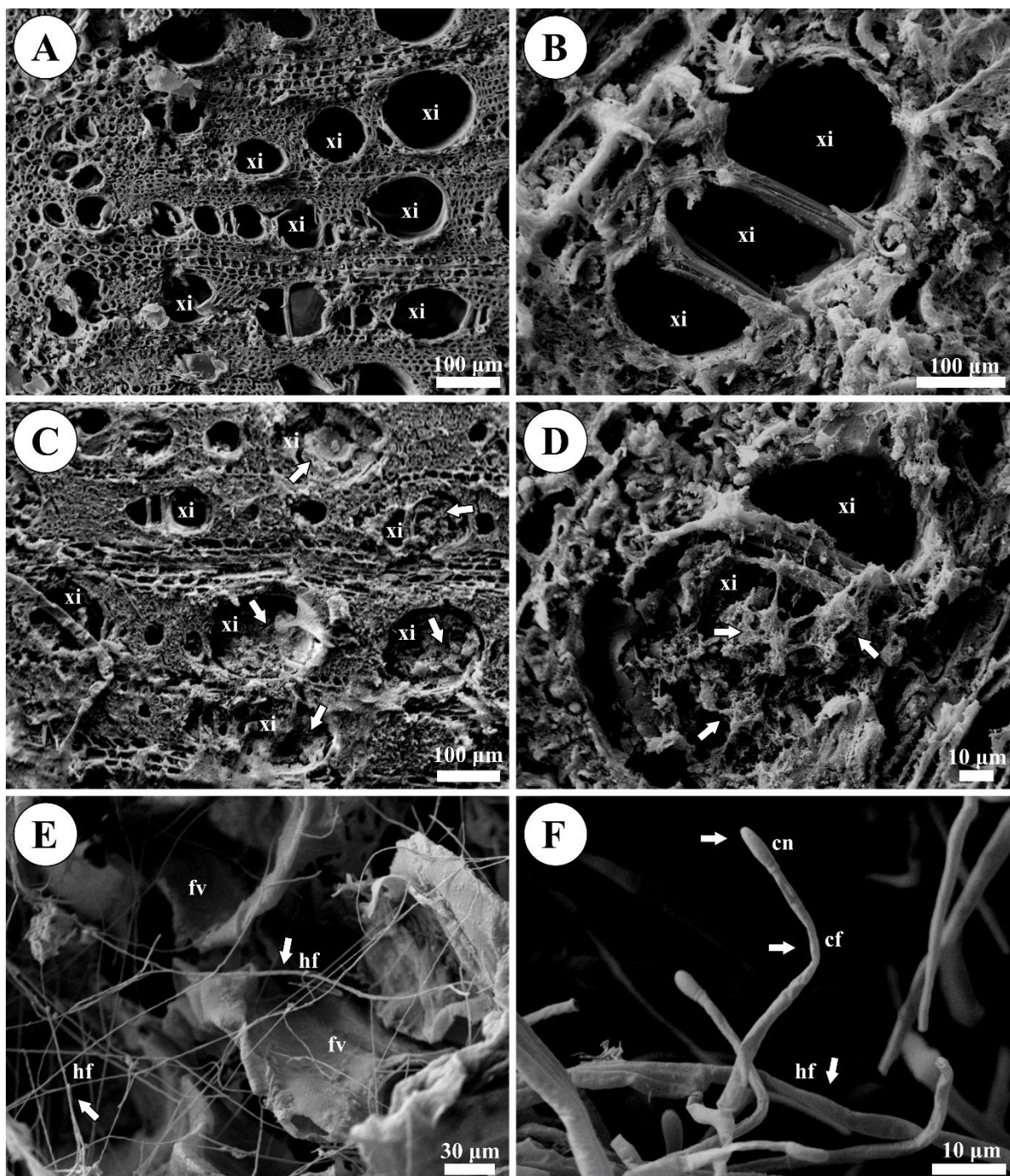
**Figura 1.** Perfil eletroforético das ampliações de BOX-PCR dos isolados selecionados. Análise em gel de agarose 2% corado com GelRed (Biotium, USA). Peso molecular 1kb DNA Ladder.

Devido a associação constante patógeno-hospedeiro na presença da doença, 10 isolados de *Fusarium* foram selecionados (JM003, JM013, JM022, JM037, JM040, JM041, JM046, JM093, JM104, JM105) com base em suas características morfológicas como, coloração das colônias, tamanho de conidióforo, presença e ausência de macro e microconídios, tipo de micélio e crescimento micelial. Verificou-se que os isolados JM037 (94%), JM040 (100%) e JM041 (100%) ocasionaram o escurecimento dos feixes vasculares e foram os únicos que diferiram significativamente do tratamento controle, evidenciando a alta capacidade de virulência. Os demais isolados apresentaram baixa incidência e apenas o isolado JM013 (0%) não foi considerado patogênico ao porta-enxerto de videira (Figura 2). Entretanto, apesar dos isolados terem ocasionado esta sintomatologia, os sintomas iniciais de podridão radicular na qual foram isolados não foram reproduzidos.

A análise por microscopia eletrônica de varredura indicou diferenças morfológicas entre os tecidos de videira sadios e doentes da cultivar IAC 766 (Figura 3). Nos tecidos que estavam livres de sintomas, verificou-se vasos condutores do xilema sem alterações estruturais (Figura 3A) ou vestígios do patógeno em seu interior (Figura 3B). Entretanto, em amostras sintomáticas de podridão radicular, observou-se obstrução em quase todos os vasos do xilema, conforme indicados pelas setas (Figura 3C), além de crescimento de micélio fúngico no seu interior (Figura 3D). Foi possível observar também a presença de micélio fúngico do gênero *Fusarium*, colonizando o feixe vascular do porta-enxerto (Figura 3E), produzindo microconídios em fiáldes longas (Figura 3F).



**Figura 2.** Incidência de podridão dos feixes vasculares em porta-enxerto de videira (*Vitis vinifera* L.) inoculadas com *Fusarium* sp. aos 90 dias após a inoculação.

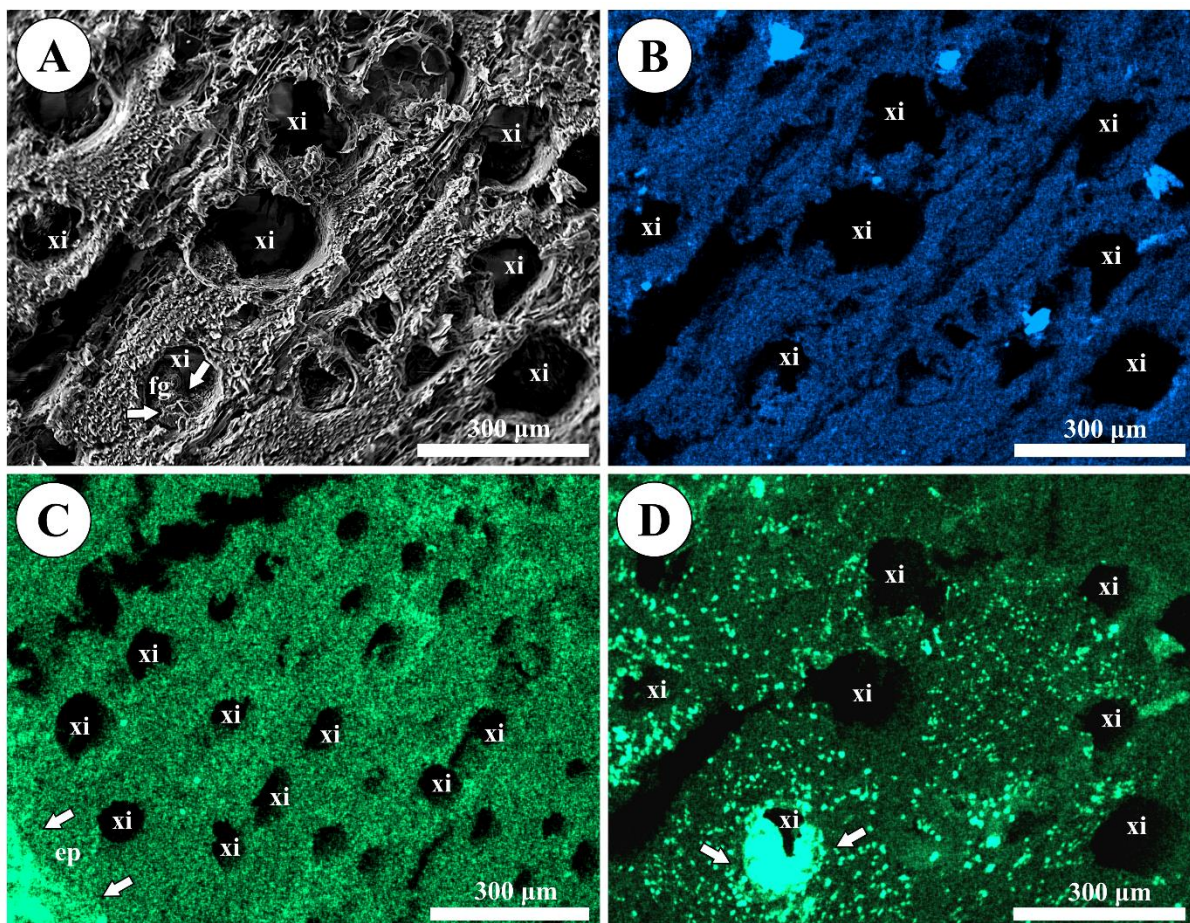


**Figura 3.** Eletromicrografia de varredura dos vasos do xilema de videira (*Vitis vinifera* L.) mostrando os danos ocasionados devido a colonização de *Fusarium* sp. **A:** Tecido sadio. **B:** Xilema sadio. **C:** Tecido infectado com material heterogêneo. **D:** Xilema infectado por *Fusarium* sp. obstruindo o vaso condutor de seiva bruta. **E:** Presença de hifas de *Fusarium* sp. no interior do feixe vascular. **F:** Conidiogênese de *Fusarium* sp. no interior do feixe vascular. **xi** = xilema, **hf** = hifa, **fv** = feixe vascular, **cn** = conídio e **cf** = conidióforo.

A microanálise de raios ‘X’ permitiu identificar elementos minerais na composição dos tecidos sadios e sintomáticos (Figura 4), como a presença/distribuição de silício no tecido infectado e sua ausência em tecido sadio (Figura 4B). Gradientes de cálcio no sentido de xilemas infectados foram observados (Figura 4D), diferentemente em tecidos sadios onde



apresentava-se distribuído em todo o tecido, com maiores concentrações na epiderme do porta-enxerto (Figura 4C). O gradiente de cálcio observado no tecido doente, coincidiu com a presença de micélio fúngico no vaso do xilema (Figura 4A).



**Figura 4.** Microanálise de raio x destacando o mapeamento de silício (Si) e cálcio (Ca) em tecidos com podridão radicular de videira (*Vitis vinifera* L.). **A:** Eletromicrografia de varredura dos vasos do xilema infectado com *Fusarium* sp. **B:** Distribuição do silício (Si) no tecido doente. **C:** Distribuição do cálcio (Ca) no tecido sadio. **D:** Distribuição do cálcio (Ca) no tecido doente. **xi** = xilema, **ep** = epideme e **fg** = fungo.

## 5 DISCUSSÃO

Atividade do gênero *Fusarium* colonizando tecido vascular do xilema foram demonstradas recentemente por Caldwell e Iyer-Pascuzzi, (2019) em tomateiro selvagem e por Rocha et al. (2022) em bananeira, por meio de micrografias eletrônicas de varredura. Sabe-se que durante o processo de infecção, a hifa progride intercelularmente através das células corticais da raiz até entrar no tecido do xilema. Ao atingir o tecido vascular, o fungo se ramifica profusamente e produz microconídios e macroconídios que são transportados acropetalmente pela atração transpiracional do sistema vegetal, na qual posteriormente os microconídios germinam e as hifas se espalham sistemicamente por todo o hospedeiro (JANGIR et al., 2021; YADETA e & THOMMA, 2013).

Geralmente, para evitar a propagação do fungo, as plantas produzem compostos antifúngicos e ocluem o lúmen do vaso do xilema, esta resposta em hospedeiros susceptíveis é geralmente retardada até estágios posteriores da infecção. O bloqueio dos vasos do xilema eventualmente resulta em escurecimento do tecido vascular, um sintoma proeminente da murcha de *Fusarium*. Entretanto em plantas lenhosas a murcha pode ser pouco perceptível devido ao alto conteúdo de lignina, observando apenas a podridão radicular devida morte do tecido radicular (JENKINS et al., 2021; JANGIR et al., 2021).

O silício presente nos tecidos das plantas doentes possivelmente indica atividade de resistência da planta contra o agente patogênico, podendo aliviar a doença por meio da prevenção da penetração de patógenos via reforço estrutural, inibindo a colonização de patógenos por meio do estímulo da resistência sistêmica adquirida, por meio de agentes antimicrobianos e produção de compostos, bem como por meio do aumento da resistência da planta ativando múltiplas vias de sinalização e defesa expressão gênica relacionada (WANG et al., 2017; ISLAM et al., 2020; POZZA et al., 2015).

O comportamento do cálcio no sentido das áreas com presença fúngica, pode indicar a atividade de homeostase intracelular modulado durante as respostas de defesa das plantas contra patógenos (TAIZ et al. 2017). O cálcio é deslocado devido à reação de defesa da planta, principalmente quando ocorre ruptura de membranas, pois é essencial na formação de barreiras estruturais e/ou químicas, manutenção da integridade da membrana plasmática e seletividade do transporte de íons (ALDON et al., 2018; ZHANG et al. 2014; KÖSTER et al., 2022). O cálcio também é essencial para regular os processos celulares, desde o controle da transcrição e sobrevivência celular até a liberação de sinais químicos ou segundos mensageiros (ZHANG et al. 2014; TAIZ et al. 2017).

## 6 CONCLUSÃO

Os isolados JM040, JM041 e JM037 foram os mais virulentos, com incidência de 100% das plantas, induzindo o escurecimento dos feixes vasculares. Os sintomas iniciais presentes nas estacas coletadas não foram reproduzidos, esta resposta pode estar ligada ao aumento da atividade de defesa da planta, com aumento da concentração de silício (Si) nos feixes vasculares da planta que foi capaz de atenuar o processo de infecção. A identificação destes isolados a nível molecular torna-se necessária para conhecer a(s) espécie(s) que está(ão) ocasionando a podridão radicular de mudas em videira, bem como sua biologia e ecologia nos vinhedos.

## 7 REFERÊNCIAS

- ALDON, D. et al. Calcium signalling in plant biotic interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 665, 2018.
- ALMEIDA JR. O. et al. Effect of pruning strategy on 'Syrah' bud necrosis and fruitfulness in Brazilian subtropical Southeast. **Vitis**, v. 58, p. 87–94, 2019.
- ALVES, E. et al. Scanning electron microscopy for fungal sample examination. In: **Laboratory protocols in fungal biology**. Springer, New York, NY, 2013. p. 133-150.
- AOKI, T. et al. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: Current status and future challenges. **Journal of General Plant Pathology**. Springer-Verlag Tokyo, v.80, p. 189-201, 2014.
- ARMIJO, G. et al. Grapevine pathogenic microorganisms: Understanding infection strategies and host response scenarios. **Frontiers in Plant Science**. Frontiers Media S.A., 30 mar. 2016.
- ARMIJO, G. et al. Grapevine pathogenic microorganisms: Understanding infection strategies and host response scenarios. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 382, 2016.
- AUSUBEL, F.M. et al. 1992. **Short Protocols in Molecular Biology**. (John Wiley and Sons: New York).
- BEKAR, T. Grafting performance of some wine grape (*Vitis Vinifera* L.) cultivars grafted on different american grapevine rootstocks. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 17, n. 3, p. 5975–5985, 2019.
- BILUNG, L. M. et al. Evaluation of BOX-PCR and ERIC-PCR as Molecular Typing Tools for Pathogenic *Leptospira*. **Disease Markers**, v. 8, p. 220, 2018.
- BOSO, S. et al. Susceptibility to downy mildew (*Plasmopara viticola*) of different *Vitis* varieties. **Crop Protection. Elsevier Ltd**, v. 63, p. 26-35, 2014.
- BRUM, M. C. et al. Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. ('Niagara Rosada') and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum*. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 11, n. 4, p. 4187–4197, 2012.
- BRUSETTI, L. et al. Fluorescent-BOX-PCR for resolving bacterial genetic diversity, endemism and biogeography. **BMC Microbiology**, v. 8, 2008.
- CALDWELL, D. et al. A scanning electron microscopy technique for viewing plant–microbe interactions at tissue and cell-type resolution. **Phytopathology**, v. 109, n.7, p. 1302-1311, 2019.
- CAO, S. et al. Diversity of *Fusarium* species associated with root rot of sugar beet in China. **Journal of General Plant Pathology**, v. 84, n. 5, p. 321–329, 1 set. 2018.

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

DE OLIVEIRA, G. L. et al. Genetic structure and molecular diversity of Brazilian grapevine germplasm: Management and use in breeding programs. **PLoS ONE**, v. 15, n. 10, out. 2020.

DIAS, F. A. N. et al. Rootstock on vine performance and wine quality of ‘Syrah’ under double pruning management. **Scientia Agricola**, v. 74, p. 134-141, 2017.

DOOHAN, F. M. et al. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 755-768, 2003.

EZRARI, S. et al. Characterization of *Fusarium* species causing dry root rot disease of citrus trees in Morocco. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 128, n. 2, p. 431–447, 1 abr. 2021.

FAVERO, A. C. et al. Double-pruning of ‘Syrah’ grapevines: A management strategy to harvest wine grapes during the winter in the Brazilian Southeast. **Vitis**, v. 50, p. 151-158, 2011.

FAYYAZ, L. et al. *Vitis* species from the southwestern United States vary in their susceptibility to powdery mildew. **Plant Disease**, v. 105, n. 9, 1 set. 2021.

GOYAL, N. et al. Genome-wide characterization revealed role of NBS-LRR genes during powdery mildew infection in *Vitis vinifera*. **Genomics**, v. 112, n. 1, p. 312–322, 1 jan. 2020.

GOYAL, N. et al. Identification of defense related gene families and their response against powdery and downy mildew infections in *Vitis vinifera*. **BMC Genomics**, v. 22, n. 1, p. 776, 1 Dez. 2021.

ISLAM, W. et al. Silicon-mediated plant defense against pathogens and insect pests. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 168, p. 104641, 2020.

JALETA, A. A Review on the Effect of Rooting Media on Rooting and Growth of Cutting Propagated Grape (*Vitis vinifera* L). **World Journal of Agriculture and Soil Science**, v. 3, n. 4, 29 out. 2019.

JENKINS, S. et al. Identification and Expression of Secreted in Xylem Pathogenicity Genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *psi*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 593140, 2021.

KENFAOUI, J. et al. Unlocking the potential of rhizobacteria in Moroccan vineyard soils: Biocontrol of grapevine trunk diseases and plant growth promotion. **Biological control**, v. 186, nov. 2023.

KÖSTER, P. et al. Ca<sup>2+</sup> signals in plant immunity. **The EMBO Journal**, v.41, p. e110741, 2022.

KUMAR SINGH, K. A review on vegetative propagation of grape (*Vitis vinifera* L.) through cutting. **Global journal of bio-science and biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 50-55, 2020.

LEAO, P. C. S. et al. Porta-enxertos e sua influência na produtividade e desempenho agrônomo de videiras " Syrah" e" Chenin Blanc" no Vale do São Francisco. Embrapa Semiárido, **Circular Técnica 125 (INFOTECA-E)**, p. 1-12, 2020.

LI, T. et al. VvXYLP02 confers gray mold resistance by amplifying jasmonate signaling pathway in *Vitis vinifera*. **Plant Signaling and Behavior**, v. 16, n. 10, 2021.

LOVATO, A. et al. Specific molecular interactions between *Vitis vinifera* and *Botrytis cinerea* are required for noble rot development in grape berries. **Postharvest Biology and Technology**, v. 156, p. 110-924, 1 out. 2019.

LUKŠIĆ, K. et al. Identification of powdery mildew resistance in wild grapevine (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* Gmel Hegi) from Croatia and Bosnia and Herzegovina. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.

MILOVANOV, A. et al. Genetic analysis of the grapevine genotypes of the Russian *Vitis* ampelographic collection using iPBS markers. **Genetica**, v. 147, n. 1, p. 91-101, 2019.

MISHRA, P. K. et al. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 218, p. 329-332, 2002.

MUNTEAN, M. D. et al. Fungal Grapevine Trunk Diseases in Romanian Vineyards in the Context of the International Situation. **Pathogens**, v. 11, n. 9, 2022.

NASCIMENTO-GAVIOLI, M. C. A. et al. Histopathological study of resistant (*Vitis labrusca* L.) and susceptible (*Vitis vinifera* L.) cultivars of grapevine to the infection by downy mildew. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 95, n. 4, p. 521–531, 3 Jul. 2020.

OLIVEIRA, G. L. et al. Genetic structure and molecular diversity of Brazilian grapevine germplasm: Management and use in breeding programs. **PloS one**, v. 15, n.1, p. e0240665, 2020.

PIRRELLO, C. et al. Past, present, and future of genetic strategies to control tolerance to the main fungal and oomycete pathogens of grapevine. **Journal of Experimental Botany Oxford University Press**, v. 74, n. 5, p. 1309-1330, 13 mar. 2023.

POZZA, E. A. et al. Silicon in plant disease control. **Revista Ceres**, v. 62, p. 323-331, 2015.

RAMPERSAD, S. N. Pathogenomics and management of fusarium diseases in plants. **PathogensMDPI AG**, , 1 maio 2020.

REGINA, M. A. et al. Propagação de *Vitis* spp. pela enxertia de mesa utilizando diferentes porta-enxertos e auxinas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, p. 897-904, 2012.

REGINA, M. A. et al. Viticulture for fine wines in Brazilian southeast. **Acta Horticulturae**, v. 910, p. 113-120, 2010.

ROCHA, A. D. J. et al. Molecular, histological and histochemical responses of banana cultivars challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* with different levels of virulence. **Plants**, v. 11, n. 18, p. 2339, 2022.

RUSSI, A. et al. *Bacillus subtilis* strain F62 against *Fusarium oxysporum* and promoting plant growth in the grapevine rootstock SO4. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 94, 2022.

SALAMA, A. M. et al. Anthocyanin Accumulation and Its Corresponding Gene Expression, Total Phenol, Antioxidant Capacity, and Fruit Quality of ‘Crimson Seedless’ Grapevine (*Vitis vinifera* L.) in Response to Grafting and Pre-Harvest Applications. **Horticulturae**, v. 9, n. 9, 1 set. 2023.

SEIFERT, K. et al. The genera of Hyphomycetes. **CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre: Utrecht**, 2011. 997p.

SOUZA, C. R. et al. Porta-enxertos e cultivares de uva para produção de vinhos de inverno. **Informe Agropecuário**, v. 41, p.1-12, 2020.

SUN, C. et al. Inhibition of *Botrytis cinerea* and control of gray mold on table grapes by calcium propionate. **Food Quality and Safety**, v. 5, p. 1-12, 2021.

TAIZ, L. et al. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6.ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2017. 888p.

TEDESCO, S. et al. Plant grafting and graft incompatibility: A review from the grapevine perspective. **Scientia Horticulturae**, v. 299, 2022.

TOFFOLATTI, S. L. et al. Unique resistance traits against downy mildew from the center of origin of grapevine (*Vitis vinifera*). **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 Dez. 2018.

WANG, M. et al. Role of silicon on plant–pathogen interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 701, 2017.

WILLIAMSON-BENAVIDES, B. A. et al. Understanding Root Rot Disease in Agricultural Crops. **Horticulturae**, v. 7, p. 33, 2021.

WURZ, D. A. et al. Analysis of Brazilian wine competitiveness. **BIO Web of Conferences**, v. 12, p. 03015, 2019.

YADETA, K. A. et al. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 97, 2013.

YOUSSEF, K. et al. Chitosan/silica nanocomposite-based formulation alleviated gray mold through stimulation of the antioxidant system in table grapes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 242–250, 31 jan. 2021.

YU, Y. H. et al. Grape (*Vitis vinifera*) VvDOF3 functions as a transcription activator and enhances powdery mildew resistance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 143, p. 183–189, 1 out. 2019.

ZHANG, L.; DU, L. et al. Calcium signaling and biotic defense responses in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 9, n. 11, p. e973818, 2014.

