

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Luciana Moreira de Souza

**EFICÁCIA DE DERIVADOS DA 8-HIDROXIQUINOLINA NO CONTROLE DE  
FUNGOS ASSOCIADOS À DOENÇAS DE TRONCO DE VIDEIRA**

Porto Alegre  
2023



Luciana Moreira de Souza

**EFICÁCIA DE DERIVADOS DA 8-HIDROXIQUINOLINA NO CONTROLE DE  
FUNGOS ASSOCIADOS À DOENÇAS DE TRONCO DE VIDEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador: Prof. Dr.: Alexandre Meneghello Fuentefria

Coorientadores: Prof. Dr.: Saulo Fernandes Andrade e Prof. Dr.: Marcus André Kurtz Almança

Porto Alegre

2023

iii

### CIP - Catalogação na Publicação

Souza, Luciana Moreira de Souza  
EFICÁCIA DE DERIVADOS DA 8-HIDROXIQUINOLINA NO  
CONTROLE DE FUNGOS ASSOCIADOS À DOENÇAS DE TRONCO DE  
VIDEIRA / Luciana Moreira de Souza Souza. -- 2023.  
125 f.  
Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria  
Fuentefria.

Coorientador: Saulo Fernandes Andrade Andrade.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e  
do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. 8-hidroxiquinolina. 2. Fungos de tronco de  
videira. 3. PH 151. 4. Doença de Petri. 5. Doença do  
pé-preto. I. Fuentefria, Alexandre Meneghello  
Fuentefria, orient. II. Andrade, Saulo Fernandes  
Andrade, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Valeu a pena? Tudo vale a pena  
Se a alma não é pequena.  
Quem quer passar além do Bojador  
Tem que passar além da dor.  
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,  
Mas nele é que espelhou o céu.”

Fernado Pessoa

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, em especial:

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade concedida.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, pela concessão de meu afastamento para capacitação. E, em particular, ao Campus Bento Gonçalves, pela permissão do uso do Laboratório de Fitopatologia e da casa de vegetação, onde foram realizadas grande parte das atividades práticas de pesquisa.

Ao meu orientador, prof. Dr. Alexandre Fuentefria, pela acolhida, confiança depositada, por todos os ensinamentos ao longo destes quatro anos, e pela liberdade que me proporcionou na realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Saulo Andrade, pela co-orientação e pela confiança.

Ao meu co-orientador, colega e amigo Dr. Marcus André Kurtz Almança, responsável pela escolha do tema da pesquisa, pelo aprendizado a respeito das doenças de tronco de videira, pela disponibilidade e parceria de sempre.

A todos os colegas do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada, em especial à Magda Chaves, Bárbara Costa e Paula Reginatto, pela amizade, coleguismo e valioso auxílio ao longo dos ensaios no Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada.

Ao meu amigo, parceiro e colega Evandro Ficagna, por todo o apoio e suporte familiar.

A todas as amigas que sempre estiveram presentes e dispostas a ouvir a respeito das pesquisas, e que, mesmo sem entender, me aconselharam e incentivaram.

Ao meu namorado, Eduardo Valenti, pelo apoio incondicional desde a confecção do projeto, seleção, aprovação no programa e todas as fases subsequentes.

A minha amada filha, Carolina de Souza Ficagna, por ser a pessoa que é, pela compreensão nos momentos de ausência, e por entender o quanto a nossa dedicação, estudo e trabalho são importantes para tornarmo-nos independentes.

# EFICÁCIA DE DERIVADOS DA 8-HIDROXIQUINOLINA NO CONTROLE DE FUNGOS ASSOCIADOS À DOENÇAS DE TRONCO DE VIDEIRA

Autor: Luciana Moreira de Souza

Orientador(a): Prof. Dr. Alexandre Meneguello Fuentefria

Co-orientador: Prof. Dr. Saulo Fernandes Andrade e Prof. Dr. Marcus A. K. Almança

## RESUMO

As doenças de tronco têm sido consideradas como um dos problemas mais sérios que afetam videiras, por restringirem drasticamente a vida útil e a produtividade das plantas. Este estudo teve como objetivos avaliar a eficiência de derivados da 8-Hidroxiquinolina (8HQ) no controle dos fungos *Ilyonectria liriodendri* e *Phaeomoniella chlamydospora*. Os ensaios *in vitro* consistiram em determinar a susceptibilidade dos fungos através dos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM), sinergismo duplo, inibição do crescimento micelial (CM) e determinação da concentração que inibe 50% do crescimento ( $EC_{50}$ ). Os ensaios *in vivo* consistiram na aplicação do derivado da 8HQ PH 151 e do fungicida mancozebe em ferimentos de mudas de videira, cultivares Isabel precoce (*Vitis labrusca*) e Gewüztraminer (*Vitis vinífera*), antes e após a inoculação de *I. liriodendri*. Em relação ao fungo *I. liriodendri* os resultados da CIM para o derivado PH 151, foram de  $6.25 \mu\text{g ml}^{-1}$ , demonstrando melhor atividade quando comparada aos fungicidas tebuconazole ( $> 50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) e mancozebe ( $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  para a cepa 176 e  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  para a cepa 1117). PH 151 inibiu o CM de *I. liriodendri*, enquanto mancozebe não diferiu do controle, ao final do experimento. Nos ensaios *in vivo* PH 151 demonstrou excelentes resultados, especialmente quando aplicada preventivamente. A respeito do fungo *P. chlamydospora*, dentre os fungicidas agrícolas, destacou-se o tebuconazole, com CIM de  $1,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ , seguido por captana, tiofanato metílico e mancozebe com CIMs de 4,06, 5,46 e  $10,62 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Os derivados de 8HQ clioquinol e PH 151 apresentaram CIMs de 1,09 e  $2,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ . PH 151 apresentou sinergismo quando associado a tebuconazole e captana e inibiu 95,8 % do CM na maior dose, já tebuconazole inibiu 100% do CM nas três maiores doses e a associação PH 151 + tebuconazole foi a que apresentou menores resultados de  $EC_{50}$  ( $0,863 + 0,0381 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A partir destes resultados, concluímos que o derivado da 8HQ PH 151 foi efetiva no controle dos fungos *I. liriodendri* e *P. chlamydospora in vitro*, tornando-se uma alternativa promissora para proteção de ferimentos de videira, tanto os oriundos da poda, quanto os gerados no processo de produção de mudas.

<sup>1</sup>Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (113 p.) março, 2023.

# THE EFFICACY OF 8-HYDROXYQUINOLINE DERIVATIVES IN CONTROLLING THE FUNGI ASSOCIATED WITH GRAPE TRUNK DISEASES

Author: Luciana Moreira de Souza

Advisor: Prof. Dr. Alexandre Meneguello Fuentefria

Co-Advisor: Prof. Dr. Saulo Fernandes Andrade e Prof. Dr. Marcus A. K. Almança

## ABSTRACT

Trunk diseases have been considered as one of the most serious problems affecting grapevines, as they drastically restrict the useful life and productivity of the plants. The purpose of this study was to evaluate the efficiency of derivatives of 8-Hydroxyquinoline (8HQ) in controlling the fungus *Ilyonectria liriodendri* and *Phaeomoniella chlamydospora*. The *in vitro* tests assessed the susceptibility to the minimal inhibitory concentration (MIC), checkerboard assay, mycelial growth (MG) inhibition, and determination of the concentration that inhibits 50% of the growth ( $EC_{50}$ ). While the *in vivo* tests consisted of applying and assessing the derivative 8HQ denominates PH 151 and the fungicide mancozeb for the protection of pruning wounds, in both preventive and curative forms. The cultivars Isabel precocious (*Vitis labrusca*) and Gewüztraminer (*Vitis vinifera*) were used. Regarding the fungus *I. liriodendri*, The MIC values for derivative PH 151 ( $6.25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) showed better results when compared to the fungicides tebuconazole ( $> 50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and mancozeb ( $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  for strain 176 and  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  for strain 1117). PH 151 inhibited mycelial growth, while mancozeb did not differ from the control. In *in vivo* tests, PH 151 again demonstrated excellent results, especially when applied preventively. For the fungus *P. chlamydospora*, among the agricultural fungicides, tebuconazole stood out, with MIC of  $1,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ , followed by captan, thiophanate methyl, and mancozeb with MICs of 4,06, 5,46, and  $10,62 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. The 8HQ clioquinol and PH 151 derivatives showed MICs of 1,09 and  $2,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ . PH 151 showed synergism when associated with tebuconazole and captan and inhibited 95,8% of MG at the highest dose. Tebuconazole inhibited 100% of MG at the three highest doses, and the association between PH 151 and tebuconazole showed the lowest  $EC_{50}$  results ( $0,863 + 0,0381 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). With these results, we conclude that the derivative of 8HQ PH 151 was effective in controlling the fungus *I. liriodendri* and *P. chlamydospora in vitro* and proved to be a promising option for protecting pruning wounds, both those arising from pruning and those generated in the seedling production process.

<sup>1</sup>Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (113 p.) march, 2023.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
3.1 Panorama da viticultura no Brasil.....	4
3.2 Doenças de tronco de videira.....	6
3.2.1 Doença do pé-preto da videira.....	10
3.2.2 Doença de Petri.....	13
3.3 Estratégias de manejo de GTDs.....	16
3.3.1 Proteção de ferimentos de poda.....	17
3.3.1.1 Fungicidas como protetores de ferimentos de poda.....	18
3.3.1.2 Agentes de biocontrole como protetores de ferimentos de poda.....	19
3.3.2 Proteção de ferimentos no processo de produção de mudas.....	21
3.4 A utilização da molécula 8-hidroxiquinolina como antifúngico.....	23
3.5 Desenvolvimento e registro agrotóxicos no Brasil.....	25
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
4.1 Derivados da 8-Hidroxiquinolina, fungicidas e cepas fúngicas.....	28
4.2 Determinação da Concentração inibitória mínima.....	30
4.3 Ensaio de Sinergismo.....	31
4.4 Crescimento micelial, Inibição relativa I (%) e EC50.....	31
4.5 Inoculação nas plantas e re-isolamento.....	33
<b>5. ARTIGOS</b> .....	36
5.1 Artigo 1.....	37
5.2 Artigo 2.....	49
<b>6. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	80
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	87
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	89
<b>9. ANEXOS</b> .....	106

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Doenças de tronco de videira que causam declínio e morte das plantas.....	7
Tabela 2. Características gerais dos ingredientes ativos dos fungicidas comerciais utilizados neste estudo.....	29
Tabela 3. Identificação das cepas de <i>Ilyonectria liriodendri</i> e <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> depositadas na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Federal do Rio Grande do Sul (IFRS), Campus Bento Gonçalves (ID Coleção IFRS) e no Genbank (ID Genbank), que foram utilizadas neste estudo.....	30
Tabela 4. Concentrações do fungicida tebuconazole, PH 151 e suas combinações para o ensaio de crescimento micelial.....	32

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Micélio de <i>Ilyonectria liriodendri</i> cultivado em meio ágar batata dextrose .....	11
Figura 2. Desenvolvimento dos sintomas de pé-preto ( <i>Ilyonectria</i> sp.) ao longo do caule de videira, a partir da base da planta.....	12
Figura 3. Micélio de <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> cultivado em meio ágar batata dextrose .....	14
Figura 4. Seção da cultivar Niágara Rosada, no porta-enxerto IAC 766, mostrando sintomas de doença de Petri nos vasos.....	15
Figura 5. Estrutura química da 8-hidroxiquinolina.....	24
Figura 6: Estruturas moleculares dos derivados da 8-hidroxiquinolina: 1- PH 151; 2- Clioquinol.....	28
Figura 7. Representação esquemática do experimento de inoculação dos produtos nas plantas. (A) mudas de videira cultivadas em vasos em casa de vegetação, (B) Poda do ramo com tesoura desinfestada com álcool 70%, (C) Ferimento ocasionado pela poda, (D)* Aplicação dos produtos em diferentes doses, (E) Introdução do disco micelial de <i>Ilyonectria liriodendri</i> 24h após a aplicação dos produtos, (F) Cobertura do ferimento contendo o disco micelial, (F) aspecto do ferimento apresentando infecção.....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8HQ	8-hidroxiquinolinas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de variância unidirecional
BDA	Ágar Batata Dextrose
CIM	concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
cv(s)	Cultivar(es)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC <sub>50</sub>	Concentração que inibe 50% do crescimento micelial
FIC	Concentrações inibitórias fracionadas
FICI	Índice de concentração inibitória fracionada
FRAC	Fungicide Resistance Action Committee
GTD	Doenças de tronco de videira
ha	Hectare
i.a.	Ingrediente ativo
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IFRS	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMA	Ministério do Meio Ambiente
RET	Registro Especial Temporário
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
SIA	Sistema de Informações sobre Agrotóxicos
Mg	Megagramas
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## 1. INTRODUÇÃO

A viticultura no Brasil é caracterizada por uma grande diversidade de condições ambientais, a área de cultivo estende-se desde o Rio Grande do Sul, até o Rio Grande do Norte e Ceará. Sendo o Rio Grande do Sul responsável por mais da metade da produção nacional. *Vitis vinifera* é caracterizada por ser hospedeira de uma ampla diversidade de fungos, e as condições de temperatura e umidade durante a primavera e verão no RS favorecem a sua incidência. Além das tradicionais doenças fúngicas de parte aérea, destacam-se as Doenças de Tronco da Videira (GTDs- grape trunk diseases), geradas por um complexo de fungos que penetram nas plantas a partir de ferimentos e colonizam seu tecido vascular. As GTDs, estão classificadas dentre os principais problemas da viticultura mundial, por restringirem drasticamente a vida útil das plantas e forçarem os agricultores a realizar o replantio, ocasionando grande aumento dos custos de produção.

As doenças de tronco pé-preto e Petri contribuem para o declínio de plantas jovens, com menos de 5 anos de idade, afetando o material de propagação da videira em viveiros e vinhedos recém-instalados. Sua incidência vem aumentando significativamente nas últimas décadas em todas as regiões do mundo. Grande parte das mudas são infectadas durante o processo de propagação, porém, podem se manter assintomáticas por longos períodos, tornando-se sintomáticas somente anos após a instalação do vinhedo. Não existe, até o momento, medidas de controle que sejam viáveis economicamente para estas doenças após sua instalação na planta, portanto, qualquer prática de manejo que impeça sua infecção e disseminação é de extrema importância para a manutenção da vida útil das plantas. Como estes fungos penetram na planta a partir de lesões, uma ação importante no controle seria a proteção dos ferimentos com produtos químicos ou biológicos. Contudo, no Brasil, ainda não se dispõe de produtos registrados para fungos do complexo GTD e nem que sejam específicos para proteção de ferimentos.

A utilização de derivados da 8-hidroxiquinolina (8HQ) pode ser uma alternativa para prevenção e manejo de infecções geradas pelos fungos associados ao complexo GTD. A infecção por estes fungos geralmente ocorre de forma simultânea, penetrando na planta a partir dos ferimentos, tanto aqueles oriundos do

processo da propagação, quanto os gerados pela poda. Os agentes causais das doenças pé-preto e Petri podem coexistir numa mesma planta e estarem associados a outras GTDs, como *Botryosphaeria* spp. e *Phomopsis* spp. formando complexos de doenças. Neste contexto, é primordial um produto de amplo espectro que atue como protetor de ferimentos. Derivados da 8HQ, além de demonstrarem um amplo espectro de ação como antifúngico, possuem baixa toxicidade e impacto ambiental reduzido. A crescente incidência global de GTDs, aliada a escassez de uma substância capaz de impedir a contaminação e de controlar os fungos *Ilyonectria liriodendri* e *Phaeomoniella chlamydospora*, tanto em viveiros, quanto a campo, justificam o presente estudo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência de derivados da 8-Hidroxiquinolina no controle dos fungos *Ilyonectria liriodendri* e *Phaeomoniella clamydospora*.

### 2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Determinar a concentração inibitória mínima de derivados da 8-hidroxiquinolina frente ao fungo *Ilyonectria liriodendri*;

2.2.2 Determinar a concentração inibitória mínima de derivados da 8-hidroxiquinolina frente ao fungo *Phaeomoniella clamydospora*;

2.2.3 Estabelecer a concentração inibitória mínima de fungicidas comerciais frente ao fungo *I. liriodendri*;

2.2.4 Estabelecer a concentração inibitória mínima de fungicidas comerciais frente ao fungo *P. clamydospora*;

2.2.5 Analisar o crescimento micelial do fungo *I. liriodendri* em meio sólido com adição de fungicidas e verificar a inibição relativa;

2.2.6 Analisar o crescimento micelial do fungo *P. clamydospora* em meio sólido com adição de fungicidas, verificar a inibição relativa e determinar a concentração fungicida que inibe 50% do crescimento micelial;

2.2.7 Verificar o efeito sinérgico entre o derivado da 8-hidroxiquinolina PH 151 e os fungicidas com melhor atividade frente a *P. clamydospora*;

2.2.8 Avaliar a eficiência *in vivo* do derivado da 8HQ PH 151, e do fungicida convencional mais efetivo *in vitro*, para o controle de *I. liriodendri* em mudas de videiras das cultivares Gewurztraminer (*Vitis vinifera* L.) e Isabel Precoce (*Vitis labrusca*) inoculadas com o agente fitopatogênico, antes e após a aplicação dos produtos em diferentes doses.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Panorama da viticultura no Brasil

No ano de 2021, a produção de uvas no Brasil foi de 1.748.197 Mg em 75.622 ha de área plantada, perfazendo um rendimento médio de 23.118 Kg por hectare (IBGE, 2022). Cerca de 80 % da produção refere-se a cultivares americanas (*Vitis labrusca*) e híbridas (Mello & Machado, 2021).

Dentre as cvs americanas e híbridas, destacam-se Isabel, Concord, Bordô, Niágara, Couderc e Moscato Embrapa (Rusin, 2017). Estas cvs possuem alta produtividade, maior resistência a doenças fúngicas e são destinadas ao consumo *in natura* e elaboração de vinhos de mesa e sucos de uva. As variedades Itália, Red Globe, Benitaka, Brasil, Crimson Seedless, Thompson Seedless, Superior Seedless, todas cultivares *Vitis vinifera*, são bastante utilizadas para consumo *in natura* e para processamento de vinhos finos. Dentre as uvas finas para processamento, no sul do país temos as tintas Cabernet Sauvignon, Merlot, Cabernet Franc, Tannat, Ancellota, Pinot Noir, Egiodola e as brancas Moscato Branco, Riesling Itálico, Chardonnay, Prosecco, Trebbiano, e Moscato Giallo. No Nordeste destacam-se as cvs tintas Syrah e Alicante Bouschet e as brancas Chenin Blanc, Moscato Canelli e Itália (Czermainski, 2021).

A viticultura brasileira está distribuída desde o Rio Grande do Sul, a 31°S de latitude, até o Rio Grande do Norte e Ceará, a 05°S de latitude e apresenta grande diversidade de condições ambientais e de cultivares produzidas (Camargo et al., 2011). A diversidade ambiental e climática entre as regiões produtoras estabeleceu polos com diferentes características de cultivo. Existem polos em que ocorrem períodos de repouso hibernar, com viticultura característica de regiões temperadas; polos em que a videira é cultivada em dois ciclos anuais, definidos em função de um período de temperaturas mais baixas e com risco de geadas, característico de regiões subtropicais; e polos onde é possível a execução de podas sucessivas, com a realização de dois e meio a três ciclos vegetativos por ano, que ocorrem nas regiões tropicais (Mello & Machado, 2021).

O Rio Grande do Sul faz parte do polo de viticultura temperada, e é o maior Estado produtor, sendo responsável por 54,41% da produção nacional. Na safra de



2021 foram colhidas 951.254 toneladas em uma área de 46.295 ha, destacando-se a Serra Gaúcha, que engloba vários municípios da região nordeste, como a maior área produtora do estado (IBGE, 2022).

As condições de temperatura e umidade durante a primavera e verão no RS favorecem a incidência de fungos, especialmente os que causam doenças como míldio, oídio, antracnose, escoriose, podridões e fusariose (Cavalcanti & Garrido, 2015), afetando o volume de uvas produzido. As regiões vitivinícolas do sul do Brasil apresentam altos índices de precipitação pluviométrica, com registros de 1.450 a 1.850 mm/ ano e uma média de 137 mm/mês (Alves & Tonietto, 2015). *V. vinifera* é conhecida por ser hospedeira de uma ampla variedade de patógenos, sendo os patógenos fúngicos de importância significativa, uma vez esta espécie é suscetível a 29 doenças fúngicas (Wilcox et al., 2015; Gramaje et al., 2018; Matinez-Diz, 2021). Portanto, dentre os fatores impactantes na sustentabilidade dos vinhedos tradicionais no sul do Brasil, os custos diretos e indiretos impostos pelas doenças fúngicas têm apresentado uma importância crescente. Além das tradicionais doenças de parte aérea, destacam-se as Doenças de Tronco da Videira (GTDs- grapevine trunk diseases), causadas por um complexo de fungos que penetram nas plantas a partir de ferimentos e colonizam seu tecido vascular. As GTDs, estão classificadas dentre os principais problemas da viticultura mundial (Bertsch et al., 2013; De La Fuente et al., 2016; Reis et al., 2019; Almança et al., 2021), por restringirem drasticamente a vida útil das plantas e forçarem os agricultores a realizar o replantio, o que aumenta os custos de produção.

Para o sucesso do cultivo em regiões propícias a ocorrências de doenças, o manejo integrado é de extrema importância. A utilização de diversas estratégias de manejo cultural como desbrota, desfolha, condução de ramos, sistema de sustentação adequado e uso de variedades com resistência genética, devem ser adotadas. É importante que os tratamentos sejam realizados de forma preventiva, nos períodos adequados, que antecedem a infecção, reduzindo assim os custos de produção e os danos ambientais (Rufato, 2021). O cultivo da videira gera custos substanciais, devido ao alto investimento financeiro inicial para o estabelecimento do vinhedo, e as dispendiosas operações anuais necessárias para a produção. Uma quantidade significativa desses custos está associada a programas intensos de manejo de pragas

e doenças, que incluem práticas culturais e custos relacionados a produtos químicos e/ou controle biológico e sua aplicação (Cooper et al., 2012; Gramaje et al., 2018).

### 3.2 Doenças de tronco de videira

As doenças de tronco tem sido consideradas como um dos problemas mais sérios que afetam videiras, tanto as plantas jovens, quanto as mais antigas (Agustí-Brisach et al., 2019). O termo GTD (Grapevine Trunk Diseases) foi estabelecido por Luigi Chiarappa juntamente com outros pesquisadores de todo o mundo no final dos anos 90. Este termo se refere a sintomas que são observados nas folhas e no tecido vascular de videiras, ocasionados por um grupo de fungos que penetram nas plantas, principalmente através de ferimentos de poda, e colonizam os seus tecidos vasculares (Mugnai, 2011). Os sintomas hoje denominados de GTDs e os fungos associados a eles são conhecidos há muito tempo. No entanto, o primeiro registro formal de um GTD remonta ao final do século IXX na França, onde os sintomas foliares da esca foram descritos pela primeira vez (Ravaz, 1898, 1909; Viala, 1926). O italiano Lionel Petri concluiu os postulados de Koch em 1912, demonstrando que *Cephalosporium* e *Acremonium* spp. eram responsáveis pela necrose observada no sistema vascular de videiras jovens (Petri 1912, Gramaje et al., 2018)

Os fungos GTD são o maior grupo de patógenos que infectam uvas (Trouillas et al. 2010; Gramaje & Armengol, 2011; Úrbez-Torres 2011; Agustí-Brisach & Armengol, 2013; Úrbez-Torres et al., 2013a; Cloete et al., 2015; Gramaje et al., 2015; Travadon et al., 2015; Lawrence et al., 2016; Araújo da Silva et al., 2017; Carlucci et al., 2017; Gramaje et al., 2018; Lawrence et al., 2019; Berlanas et al., 2020; Matinez Diz, 2020). Até o momento, 136 espécies de fungos de 35 gêneros foram relatadas por causar seis diferentes GTDs em todo o mundo (Gramaje et al., 2018; Aigoun-Mouhous et al., 2019; Lawrence et al., 2019; Berlanas et al., 2020). Este número vem aumentando continuamente devido ao aprimoramento das ferramentas para sua detecção e identificação (Matinez Diz, 2020). As cinco principais patologias relacionadas ao complexo GTD, que causam declínio e morte de videiras, conforme Bertsch et al. (2013); Gramaje et al. (2018) e Mondello et al. (2018a), são as doenças de Petri, pé-preto, esca, eutipiose e podridão descendente.

Os principais fungos fitopatogênicos relacionados as doenças citadas

acima e as fases da planta mais susceptíveis à infecção podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Doenças de tronco de videira que causam declínio e morte das plantas

<b>Doença</b>	<b>Fungos fitopatogênicos</b>	<b>Fase mais susceptível</b>
Doença de Petri	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> <i>Phaeoacremonium</i> sp.	Mudas e vinhedos jovens
Esca	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> <i>Phaeoacremonium</i> sp. <i>Fomitiporia</i> sp.	Vinhedos adultos
Podridão descendente	<i>Botryosphaeria</i> spp. (anamorfos <i>Neofusicoccum</i> spp. e <i>Lasiodiplodia</i> spp.) <i>Eutypa lata</i>	Mudas, vinhedos jovens e vinhedos adultos
Eutipiose	<i>Eutypa lata</i>	Vinhedos adultos
Pé-preto	<i>Cylindrocarpon destructans</i> sp. <i>Campylocarpon</i> sp.	Mudas e os vinhedos jovens

Fonte: Almança et al. 2020

As GTDs são causadas principalmente por fungos ascomicetos, mas também se acredita que alguns basidiomicetos contribuam neste complexo de doenças (Fischer, 2002; Cloete et al., 2015). A complexidade do patossistema GTD se deve (i) ao elevado número de espécies fúngicas envolvidas, (ii) GTDs que afetam videiras jovens e adultas compartilham patógenos fúngicos comuns, (iii) videiras individuais podem ser afetadas por um ou mais fungos ao mesmo tempo, pois todos infectam a planta a partir dos diversos ferimentos que ocorrem ao longo da estação e da vida da planta, (iv) videiras infectadas podem apresentar sintomas somente após um longo período de latência, (v) a inexistência de cv totalmente resistente (Bertsch et al., 2013 ; Guan et al., 2016), (vi) as diferentes GTDs compartilham sintomas externos e internos, que por vezes sobrepõem-se entre si e/ou assemelham-se a distúrbios abióticos, dificultando sua identificação (Gramaje et al., 2018; Mondello et al., 2018b, Martinez-Diz, 2020). Como exemplo podemos citar as doenças de Petri e pé preto, as duas GTDs mais comuns observadas em vinhedos com menos de 5 anos de idade. Os sintomas foliares associados a ambas as doenças, além de serem os mesmos, se confundem à sintomatologia associada a danos do inverno, geadas na primavera, estresse hídrico e/ou deficiência de nutrientes (Gramaje et al., 2018).

Embora as GTDs sejam conhecidas há longo tempo, seu impacto e importância para a saúde das plantas só foram reconhecidos recentemente. Os

sintomas de declínio aumentaram drasticamente nos últimos anos no mundo todo, gerando perdas consideráveis e comprometendo a produtividade e longevidade dos vinhedos (Gramaje & Armengol, 2011; Gramaje et al., 2018). Acredita-se que esse aumento se deva a aspectos relacionados ao ápice de implantação de vinhedos, que ocorreu na década de 1990, e que gerou não apenas a circulação de material de plantio possivelmente infectado (Gramaje & Armengol, 2011), mas também a expressão dos sintomas, em função da idade atingida por estas plantas; a modificação nos sistemas de produção com o aumento da densidade de plantas e vinhedos, e um número significativamente maior de feridas de poda (Gramaje et al., 2018); a proibição dos fungicidas mais eficazes no início do século XX, devido à alta toxicidade ambiental e elevado risco para saúde humana (Decoin, 2001; Larignon et al., 2008; Spinosi et al., 2009), como arsenito de sódio, benzimidazóis e brometo de metila (Mondello et al., 2018; Martinez-Diz, 2020).

As GTDs caracterizam-se como um problema mundial, pois tratam-se das mesmas enfermidades relatadas em vinhedos da Itália (Grasso, 1984), Portugal (Rego et al., 2000), Califórnia (Scheck et al., 1998), Espanha (Armengol et al., 2001), Grécia (Rumbos; Rumbou, 2001) e demais países produtores de uva (Cavalcanti et al., 2013). Os primeiros relatos de pé-preto e doença de Petri no Brasil ocorreram em vinhedos do Rio Grande do Sul (Garrido et al., 2004), a doença de Petri no Nordeste foi relatada por Correia et al., (2012) e no Sudeste por Ferreira et al., (2013a).

No Brasil, não existem dados relativos ao percentual de plantas infectadas em vinhedos. Mas há registros sobre a ocorrência de fungos associados a GTDs em plantas sintomáticas. Nas áreas com declínio de videiras na Serra Gaúcha, Rusin et al. (2015) verificaram que em torno de 90% das plantas com sintomas de clorose/necrose foliar, perdas de vigor e morte continham, pelo menos, uma espécie de fungo causador de GTD. *P. chlamydospora* foi encontrado em 70 % das plantas, seguido por *Botryosphaeria* spp. e outros gêneros relacionados à família Botryosphaeriaceae (54,9%), *Phaeoacremonium* spp. (31,4%) e *Cylindrocarpon* spp. (7,8%). Importante mencionar que foram isolados mais de um fungo por planta. Correia et al. (2013), relataram 32 isolados de *Botryosphaeria*, *Campylocarpon*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, *Phaeoacremonium* e *Phaeomoniella* no Nordeste do Brasil. Silva et al. (2017) obtiveram na mesma região 22 isolados de

*Phaeoacremonium* spp. No estado de São Paulo, Ferreira et al. (2017), caracterizaram 12 isolados de *Phaeoacremonium* spp. e *Phaeomoniella* spp.

Ao se associar a incidência de fungos de tronco a outros fatores relacionados ao declínio de videiras, como *Eurhizococcus brasiliensis*, inseto conhecido como pérola-da-terra, a relevância das GTDs tem sido maior (Almança et al., 2021). Rusin et al. (2015), relata que 90 % das plantas com sintomas de declínio continham fungos associados aos GTDs e, somente 27% das mesmas plantas apresentavam pérola-da-terra nas raízes.

Não há até o presente momento, um resultado de pesquisa que revele precisamente o nível de dano econômico gerado pelas doenças de tronco sobre a viticultura brasileira e da Serra Gaúcha. Porém, observações e levantamentos de campo, realizados principalmente no Rio Grande do Sul, alertam para o crescimento da incidência dessas doenças em vinhedos (Cavalcanti et al., 2013). De acordo com Lazzarotto et al. (2016), para recuperar o capital investido na instalação de um vinhedo e apresentar viabilidade econômica adequada, este deve ter uma vida útil, com alta produtividade, de no mínimo 15 anos. Entretanto, há relatos frequentes de produtores e técnicos no Rio Grande do Sul e Santa Catarina de morte antecipada e declínio das plantas em períodos que antecedem 10 anos de plantio/replanteio. (Lazzarotto et al., 2016; Almança et al., 2021).

Para além das perdas de produção e dos custos de substituição das plantas, a ocorrência de doenças em zonas de “denominação de origem controlada”- (D.O.C) gera risco de substituição de videiras individuais. Caso ocorra a diminuição de uma determinada percentagem de plantas (20% para a denominação francesa de origem controlada), a região perde o D.O.C agravando assim o impacto econômico das GTDs (Mondello et al., 2018b).

A principal forma de infecção por fungos GTDs é através de ferimentos. Na videira os ferimentos ocorrem mais frequentemente durante a poda (seca ou em verde) ou nas etapas de produção de mudas, como enxertia e enraizamento (Gramaje; Armengol, 2011; Rolshausen et al., 2010; Gramaje et al., 2018; Almança et al., 2021). Ascósporos e conídios são liberados sob condições ambientais favoráveis, associadas a eventos de chuva e/ou alta umidade relativa (Úrbez-Torres et al., 2010a , 2010b; van Niekerk et al., 2010). O solo também pode

ser uma fonte primária de patógenos. Diante destas formas de infecção, uma ação importante no controle das GTDs é a proteção dos ferimentos com produtos químicos ou biológicos (Halleen et al., 2010). Contudo, no Brasil, ainda não se dispõe de produtos registrados que sejam específicos para proteger ferimentos de poda (Brasil, 2022).

A complexidade das doenças de tronco de videira, o papel das práticas de poda na disseminação destas doenças, e os riscos de infecções durante o processo de propagação de plantas em viveiros foram destacados em diversos estudos realizados nos últimos 20 anos em todo o mundo (Mondello et al., 2018b). Conforme Halleen & Fourie (2006); Agustí-Brisach & Armengol (2013); Gramaje et al., (2018); Martínez-Diz, et al., (2020) as doenças pé-preto e de Petri são consideradas as GTDs mais comuns que afetam o material de plantio em viveiros, videiras recém-plantadas e plantas jovens, com menos de 5 anos de idade.

### 3.2.1 Doença do pé-preto da videira

A doença do pé-preto da videira é uma das principais GTDs que afetam as plantas jovens, conforme Halleen et al. (2003); Chaverri et al. (2011); Agustí-Brisach & Armengol (2013); Cavalcanti et al. (2015), Carlucci et al. (2017), Gramaje et al. (2018) e Aigoun-Mouhous et al. (2019). Sua incidência vem aumentando significativamente nas últimas décadas em todas as regiões do mundo (Gramaje & Armengol 2011; Agustí-Brisach & Armengol 2013; Agustí-Brisach et al., 2015; Carlucci et al., 2017).

Esta doença foi mencionada pela primeira vez referindo-se à espécie "*Cylindrocarpon*" na Itália em 1975 (Grasso & Magnano Di San Lio, 1975), e seus sintomas foram descritos no início da década de 60 na França sob o nome de "gangrena" (Maluta & Larignon, 1991; Marinez-Diz, 2020).

A presença de pé-preto foi relatada em vinhedos de diversos países, como Austrália (Sweetingham 1983; Whitelaw-Weckert et al., 2007), França (Maluta e Larignon, 1991), Portugal (Rego, 1994; Rego et al., 2000), África do Sul (Fourie & Halleen, 2001), Brasil (Garrido et al., 2004), Estados Unidos (Petit & Gubler, 2005), Espanha (Alaniz et al., 2007; Agustí-Brisach & Armengol, 2013) Canadá (O'Gorman et al., 2009; Petit et al., 2011), Itália (Carlucci et al., 2017), dentre outros.

Pé-preto foi atribuído inicialmente, ao fungo *Cylindrocarpon destructans* (teleomorfo *Neonectria radicola*). Mais tarde, grande parte dos isolados revelaram pertencer à espécie *C. liriodendri* (teleomorfo *Neonectria liriodendri*) (Halleen et al., 2006b) e a *C. macrodidymum* (teleomorfo *Neonectria macrodidyma*) (Rego et al., 2005). Revisões taxonômicas foram realizadas para *Neonectria/Cylindrocarpon* e conduziram ao enquadramento do teleomorfo destas espécies ao gênero *Ilyonectria* (Chaverri et al., 2011) e de diversas espécies em *I. radicola* e *I. macrodidyma* (Cabral, et al., 2011a, 2011b). São citadas na literatura 24 espécies dos gêneros *Campylocarpon*, *Cylindrocladiella*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria*, *Neonectria* e *Thelonectria* como agentes causadores de pé-preto em videira (Agustí-Brisach e Armengol 2013; Carlucci et al., 2017, Cardoso, 2011).

Os fungos do gênero *Ilyonectria* habitam o solo e a rizosfera, onde vivem como saprófitas em detritos vegetais, ou como patogênicos causando necrose e podridão de raízes (Brayford, 1993; Halleen et al., 2004; Chaverri et al., 2011). Sobrevivem no solo como micélio e sob a forma de conídios e clamidósporos (Chaverri et al., 2011). Esses fungos são identificados tradicionalmente pelas características morfológicas que incluem pigmentação da colônia, taxa de crescimento, produção de clamidósporos, tamanho e formato dos microconídios e macroconídios (Garrido & Gava, 2014). Os isolados em geral produzem colônias com textura aveludada, micélio aéreo, variando do branco ao acinzentado (Figura 1), em meio ágar batata dextrose (BDA).



Figura 1. Colônia de *Ilyonectria liriodendri* cultivado em meio ágar batata dextrose. Foto: Luciana Souza

Podem sobreviver por longos períodos sob a forma de micélio hibernante nos órgãos infectados ou como saprófita no solo (Matturi & Stenton, 1964; Booth, 1966; Grasso, 1984; Halleen et al., 2004). Em viveiros, as principais contaminações

por *Ilyonectria* spp. ocorrem a partir de inóculo existente no solo, infectando as plantas através das raízes e da base dos porta-enxertos (Halleen et al., 2003; Cardoso, 2011).

Os sintomas externos do pé-preto incluem nanismo geral, brotamento tardio, entrenós encurtados, folhagem clorótica com margens necróticas e murcha de folhas ou brotos inteiros. Os sintomas internos são bem característicos, a planta apresenta coloração escura e necrose dos tecidos, que se desenvolvem partindo da base do porta-enxerto, podendo causar a morte de plantas jovens (Halleen et al., 2006). Os sintomas externos podem ser observados na figura 2.



Figura 2. Desenvolvimento dos sintomas de pé-preto (*Ilyonectria* sp.) ao longo do caule de videira, a partir da base da planta. Base da planta indicada pela seta. Foto: Marcus A. K. Almança.

As espécies associadas ao pé-preto infectam as plantas através do tecido radicular (Halleen et al., 2003). A remoção da casca revela intensa coloração escura e necrose do tecido lenhoso, que se desenvolve a partir da base do porta-enxerto. Quando observados ao microscópio, os tecidos infectados revelam a presença de hifas nos raios celulares do floema e do xilema primários. A presença de hifas nos raios celulares faz com que estas se alastrem para o centro do tronco. Grande parte da reserva de amido da videira é armazenada nas raízes, provendo fonte de carbono para o fungo, que é capaz de secretar amilases (Halleen et al., 2006, Cavalcanti et al., 2013).

Apesar de a forma mais comum de contaminação ser a partir das raízes, os esporos podem penetrar na planta a partir de qualquer ferimento, principalmente ferimentos de poda. Whitelaw-Weckert et al., (2013) observaram a ocorrência de agentes causadores de pé-preto em diferentes partes de videiras enxertadas, não somente nas raízes. Assim como (Fourie & Halleen, 2004), que o isolaram de plantas-mãe de porta-enxertos, (Halleen et al., 2003; Aroca et al., 2006; Dubrovsky & Fabritius 2007), de estacas de porta-enxertos enraizados (Oliveira et al., 2004; Rumbos &



Rumbou 2001) de videiras jovens enxertadas e (Agustí-Brisach et al., 2014) de videiras maduras.

### 3.2.2 Doença de Petri

A doença de Petri contribui para o declínio de plantas jovens, com menos de 5 anos de idade, afetando o material de propagação da videira em viveiros e vinhedos recém-instalados (Gramaje e Armengol, 2011; Úrbez-Torres et al., 2015; Gramaje et al., 2018). As principais espécies fúngicas associadas à doença são *Phaeomoniella chlamydospora*, diversas espécies do gênero *Phaeoacremonium*, *Pleurostoma richardsiae* e *Cadophora* sp. (Halleen et al., 2007; Gramaje & Armengol, 2011; Gramaje et al., 2015; Travadon et al., 2015; Araújo da Silva et al., 2017; Gramaje, et al., 2018). *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* sp. também estão associados ao complexo da Esca, que acomete vinhedos com idade superior a 7 anos.

Petri (1912) isolou dois fungos do gênero *Cephalosporium* e um do gênero *Acremonium* em videiras sintomáticas. Posteriormente, com base na sua descrição, estes foram nomeados *Phaeoacremonium (Pm.) chlamydosporum* e *Pm. aleophilum*, respectivamente (Mugnai et al., 1999). *Pm. chlamydosporum* foi reclassificado por Crous & Gams (2000), e passou a se chamar *Phaeomoniella chlamydospora*. A doença de Petri é causada a partir de uma combinação de vários fungos, sendo os mais importantes *Phaeomoniella chlamydospora* e várias espécies de *Phaeoacremonium* sp. (Scheck et al., 1998). Dezesesseis espécies de *Phaeoacremonium* foram isoladas em videiras, sendo, *P. minimum (Pm. aleophilum)* a mais comumente encontrada. Entretanto, *P. chlamydospora* é o fitopatógeno mais frequentemente associado aos sintomas típicos da doença de Petri (Mugnai et al., 1999; Gramaje et al., 2015, Cavalcanti et al., 2013; Marraschi, 2019).

Crous & Gams (2000) foram os pioneiros na reclassificação de *P. chlamydospora*. Posteriormente, diversos estudos foram realizados em locais onde os patógenos são comumente encontrados, como Portugal (Sofia et al., 2015), Nova Zelândia (Pottinger et al., 2002; Smetham et al., 2010), Espanha (Cobos & Martin, 2008; Tello et al., 2010), África do Sul (Mostert et al., 2006) e França (Borie et al., 2002; Smetham et al., 2010). No Brasil, agentes causais da doença de Petri foram relatados inicialmente no estado do Rio Grande do Sul (Garrido et al., 2004). Porém

há registros na região Nordeste (Correia et al., 2013), nos estados de Pernambuco (Correia et al., 2013), São Paulo (Ferreira et al., 2017), Minas Gerais, Santa Catarina, Mato Grosso e Paraná (Marraschi, 2019). No Sudeste do Brasil, a partir de um levantamento sobre a presença de GTDs em Niágara Rosada jovem, constatou-se maior frequência de isolamento de *P. chlamydospora* em relação a *Phaeoacremonium* sp. (Ferreira et al., 2013a; Cavalcanti et al., 2013).

O fungo *P. chlamydospora* pertence a divisão Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Diaporthales e família Togniniaceae (Crous & Gams, 2000). Até o momento, se conhece apenas a forma anamófica do fungo, sendo comum o relato de população com alta homogeneidade (Mostert et al., 2006; Cobos & Martin, 2008; Tello et al., 2010; Sofia et al., 2015). O micélio de *P. chlamydospora* possui hifas septadas e ramificadas, podem apresentar-se isoladas ou em grupo, tuberculadas, com verrugas e paredes castanhas (Figura 3). Formam clamidósporos, geralmente isolados, mas podem ser vistos em cadeias de até 5, com coloração de olivácea a castanha-esverdeada, lisos e tuberculados. (Crous & Gams, 2000; Pinto, 2010). O fungo possui crescimento lento em meio BDA, crescendo em torno de 0,1 mm por dia.



Figura 3. Colônia de *Phaeoacremonium chlamydospora* cultivado em meio ágar batata dextrose. Foto: Luciana Souza

A doença de Petri é caracterizada pela presença de compostos fenólicos de cor escura nos vasos do xilema, que exalam quando os vasos são cortados transversalmente (Figura 4), e formam-se estrias escurecidas longitudinalmente (Rooney-Latham et al., 2005). Os sintomas externos característicos são crescimento atrofiado, brotação atrasada ou ausente, entrenós encurtados, folhagem clorótica e esparsa com margens necróticas, murcha de folhas e brotos, interrupção do

crescimento e morte da planta (Gramaje e Armengol, 2011). Estes sintomas frequentemente se assemelham aos de distúrbios abióticos e são de difícil distinção daqueles causados pela doença pé-preto.



Figura 4: Seção da cultivar Niágara Rosada, no porta-enxerto IAC 766, mostrando sintomas de doença de Petri nos vasos. No detalhe (canto superior direito), a lesão aparece ampliada. Foto: Ana B. M. Ferreira e César B. Júnior (Garrido, 2013).

Existem várias evidências de que alguns fungos GTD, como *P. chlamydospora*, *P. minimum* e várias *Botryosphaeria* spp. possuem uma fase endofítica em videiras (González & Tello, 2011). Estes fungos foram isolados a partir de plantas assintomáticas, jovens e adultas, por diversas vezes (Aroca et al., 2010; Edwards & Pascoe, 2004; Fourie & Halleen 2004b; Halleen et al., 2003, 2007a; Hofstetter et al., 2012). Há hipóteses de que podem se tornar patogênicos quando a planta é submetida a diferentes fatores de estresse biótico e/ou abiótico. (Ferreira et al., 1999, Gramaje et al., 2018).

O material de propagação vegetativa infectado (mudas), o processo de propagação para formação das mudas, o inóculo aéreo e solos infectados são as principais fontes de inóculo dos fitopatógenos da doença de Petri (Mostert et al., 2006). Plantas-mãe de porta-enxertos e garfos geralmente estão infectados por fungos GTD (Rego et al., 2001; Oliveira et al., 2004; Pinto et al., 2005), dando origem a estacas como fontes de inóculo, especialmente para os patógenos da doença de Petri (Brambatti, 2019). Grande parte das mudas para a instalação dos vinhedos são assintomáticas, vindo a desenvolver a doença anos após o plantio. Na época do plantio, as extremidades basais dos porta-enxertos estão parcial ou totalmente expostas à infecção por patógenos de solo. É comum ocorrer a quebra de calos radiculares no processo, ocasionado pequenos ferimentos que permitem a infecção

(Cavalcanti et al., 2013). Devido a sua habilidade produzir clamidósporos, *P. chlamydospora* sobrevive em solos úmidos, favorecendo aos conídios penetrarem através das injúrias radiculares, em viveiros ou vinhedos (Cavalcanti et al., 2013). Paralelamente a isto, os fungos associados à doença de Petri e Esca possuem mecanismos próprios para lançar os conídios no ar após a chuva podendo infectar plantas de videira através de qualquer tipo de ferimento (Surico et al., 2006; Quaglia et al., 2009).

Não existem, até o momento, medidas de controle que sejam viáveis economicamente para esta doença depois de instalada no vinhedo (Cavalcanti et al. 2013; Gramaje, et al. 2018). Qualquer prática de manejo que impeça a infecção de plantas e a sua disseminação é de extrema importância para a manutenção da vida útil das plantas.

### 3.3 Estratégias de manejo de GTDs

O gerenciamento de GTDs tem sido intensivamente estudado nas últimas décadas. As pesquisas para um maior entendimento das GTDs tiveram início ao final da década de 1980, a partir de estudos relacionados à Esca, primeiramente na França e Itália, e posteriormente na África do Sul e Califórnia (Chiarappa, 2000). Diversos avanços foram conquistados a respeito da epidemiologia, sintomatologia, etiologia e impacto das doenças de tronco. No entanto, nenhuma medida de controle efetiva foi desenvolvida para reduzir o impacto após sua instalação na planta, tornando muito difícil sua gestão no campo (Gramaje, et al., 2018; Mondello et al., 2018). Fator também influenciado pelo tipo de doença e/ou patógenos envolvidos e pelo fato de ser muito comum uma mesma videira estar infectada por várias GTDs ao mesmo tempo (Gramaje et al., 2018).

A principal prioridade durante a última década, tanto para pesquisadores quanto para a indústria vitivinícola, têm sido a busca por novos ingredientes ativos, agentes de biocontrole e compostos naturais, cultivares de videira mais resistentes, bem como práticas culturais que possam reduzir com sucesso a infecção por patógenos GTD (Úrbez-Torres, 2011; Matinez Diz, 2020; Calzarano et al., 2014; 2017; Calzarano & Di Marco, 2018; Mondello et al., 2018a). A sanitização de ferramentas e materiais, a utilização de mudas saudáveis, a eliminação de restos culturais, a poda dupla

ou pré-poda, e a proteção de ferimentos com produtos químicos ou biológicos, são algumas das práticas culturais que auxiliam na redução das doenças em um determinado local (Díaz & Latorre, 2013; Halleen et al., 2010; Sosnowski et al., 2013; Rusin, 2017).

A complexidade das doenças de tronco de videira, aliada a escassez de ingredientes ativos eficientes e aos altos riscos de infecção em viveiros e vinhedos, sugerem a adoção de estratégias integradas para limitar sua incidência (Armengol, 2014; Mondello et al., 2018b). Considerando que os ferimentos são os principais pontos de entrada dos fitopatógenos de tronco em videiras, as pesquisas sobre controle geralmente visam a proteção de ferimentos de poda e enxertia.

### 3.3.1 Proteção de Ferimentos de poda

Ferimentos de poda são considerados como a principal porta de entrada para os patógenos fúngicos colonizadores da madeira (van Niekerk *et al.*, 2011; Mutawila et al., 2015), portanto a proteção de ferimentos é essencial para reduzir infecções.

A suscetibilidade de ferimentos de poda de videira a patógenos GTD foi alvo de pesquisas em diversas regiões produtoras de uva, a partir de estudos com inoculação artificial, como Austrália (Ayres et al., 2016), Califórnia (Moller & Kasimatis, 1980; Munkvold & Marois, 1993; Eskalen et al., 2007; Úrbez-Torres & Gubler, 2011), França (Chapuis et al., 1998; Larignon & Dubois, 2000; Lecomte & Bailey, 2011), Itália (Serra et al., 2008), Michigan (Trese et al., 1982), África do Sul (van Niekerk et al., 2011) e Espanha (Elena & Luque, 2016). A suscetibilidade do ferimento depende do patógeno envolvido, do tempo decorrido entre a poda e os possíveis eventos de infecção, e do período do ano em que ocorre (Gramaje et al., 2018). A suscetibilidade diminui com o tempo, mas pode estender-se até quatro a sete semanas para a maioria dos fungos GTD em condições favoráveis. Pouco se sabe sobre a taxa de infecções em condições naturais (Martinez-Diz, 2020). De acordo com o patógeno, as feridas podem permanecer suscetíveis à infecção por até 2 a 4 meses (Eskalen et al., 2007; Rolshausen et al., 2010; Serra et al., 2008; Van Niekerk et al., 2011; Mondello et al., 2018b).

Existem diversos estudos utilizando fungicidas como protetores de

ferimentos, e alguns foram relatados como eficazes (Mutawila et al., 2015; Mondello et al., 2018), porém sua eficácia na proteção de feridas de poda é de curta duração (Larignon & Dubos, 2000; van Niekerk et al., 2011). Novas formulações foram propostas e estão em desenvolvimento (Díaz & Latorre, 2013), incluindo proteção química, física e agentes de biocontrole. Estas formulações têm como objetivo fornecer proteção por períodos mais prolongados, característica essencial para um produto que vise proteção de ferimentos (Mondello et al., 2018b).

#### 3.3.1.1 Fungicidas como protetores de ferimentos de poda

Os tratamentos com fungicidas podem conter um ingrediente ativo ou mais, com diferentes modos de ação. Podem ser aplicados via solo, injeções de tronco, inseridos em pastas ou tintas para ferimentos de poda ou através da pulverização dos produtos formulados. Porém sua eficiência poderá ser menor, de acordo com a facilidade de o produto ser lavado pela chuva (Rolshausen et al., 2010). Diversos experimentos com testes *in vitro* e *in vivo* apresentaram redução do crescimento micelial e re-isolamento de patógenos utilizando produtos químicos, no entanto a eficácia é muito variável de acordo com a espécie do patógeno (Amponsah et al., 2012; Bester et al., 2007; Rolshausen et al., 2010; Rusin, 2017).

A eficácia de tratamentos de feridas com fungicidas contra *Botryosphaeriaceae* spp. e *P. chlamydospora* foi demonstrado na Austrália (Pitt et al., 2012), Califórnia (Rolshausen et al., 2010), Chile (Díaz e Latorre, 2013), Nova Zelândia (Amponsah et al., 2012; Sosnowski & Mundi, 2019) e África do Sul (Mutawila et al., 2015). O uso de barreiras físicas como tintas e pastas formuladas com ou sem fungicidas também se mostraram eficazes no controle de infecções causadas por Fungos *Botryosphaeriaceae* e *P. chlamydospora* (Epstein et al., 2008; Rolshausen et al., 2010; Pitt et al., 2012; Díaz e Latorre, 2013).

De acordo com Gramaje et al., (2018), dos fungicidas avaliados, com base na frequência de relatos da literatura, o grupo de modo de ação do metil benzimidazol carbamato (benomil, carbendazim e tiofanato metílico) é o mais eficaz contra os patógenos *Botryosphaeria* e *Eutypa*. Inibidores de desmetilação (tebuconazole e flusilazol) a anilinopirimidina (pirimetanil), o inibidor externo de quinona (piraclostrobina) e a 2,6-dinitro-anilina (fluazinam), também foram bastante eficazes.

Em relação aos patógenos do complexo da Esca, Rolshausen et al. (2010) demonstraram que o tiofanato metílico foi eficiente no controle de *P. minimum*, *P. parasiticum* e *P. richardsiae*, mas não apresentou bom desempenho contra *P. chlamydospora*. Para *P. chlamydospora*, a aplicação de boro em feridas de poda foi mais efetiva. Díaz e Latorre (2013) avaliaram a eficácia de aplicações de fungicidas em pasta e em spray na proteção de feridas de poda contra *D. seriata*, *Inocutis* sp. e *P. chlamydospora*, e concluíram que a mistura da pasta com tiofanato metílico proporcionou o melhor controle para estes patógenos. Aplicações com fosetil-Al limitaram a extensão necrótica da madeira em videiras jovens inoculadas com *P. chlamydospora* (Laukart et al., 2001), e *P. chlamydospora* e *P. minimum* (Di Marco et al., 2011), e além de reduzirem a expressão dos sintomas da Esca em folhas, também reduziram a mortalidade de videiras em condições de campo.

Os tratamentos para proteção de ferimentos contra fungos GTD são aplicados à mão com um pincel ou aplicadores especialmente projetados. Essa forma de aplicação se torna dispendiosa, com um custo de aplicação duas a quatro vezes maior do que quando aplicado com um pulverizador montado em trator (Sosnowski & McCarthy, 2017). Portanto, há necessidade de fungicidas com formulação líquida eficazes, que possam ser aplicados com um pulverizador. No entanto, produtos limitados são registrados para uso em videiras, e existem muitas espécies de patógenos taxonomicamente variáveis ainda por serem avaliadas. Pesquisas futuras devem se concentrar na expansão da gama de opções químicas e alternativas disponíveis para as indústrias em todo o mundo (Gramaje et al., 2018).

Apenas tratamentos que proporcionaram pelo menos 50% de redução do crescimento micelial em ágar ou no re-isolamento dos patógenos mencionados acima em comparação com o tratamento controle foram citados. Para a doença do pé-preto, de uma maneira geral, as pesquisas concentram-se na proteção de ferimentos relacionados à produção de mudas, enxertia e no momento do plantio. Os estudos são realizados em nível de viveiros, tópico que será abordado no item 3.3.2- Proteção de ferimentos no processo de produção de mudas.

### 3.3.1.2- Agentes de biocontrole como protetores de ferimentos de poda

Agentes de biocontrole vêm sendo testados no manejo de doenças de tronco

de videira visando, principalmente, a proteção de ferimentos. Estes agentes podem atuar de forma direta contra os fitopatógenos através de mecanismos como parasitismo, antibiose, competição (espaço e nutrientes) e síntese de compostos metabólitos voláteis ou de substâncias antimicrobianas, no caso de bactérias (Lanna Filho et al., 2010). De forma indireta podem atuar como indutores de resistência em plantas (Machado et al., 2012; Rusin, 2017).

Ingredientes ativos químicos considerados eficazes, têm enfrentado grandes restrições na Europa, por apresentarem altos riscos ao meio ambiente e à saúde humana (Larignon et al., 2008; Spinosi et al., 2009). Portanto, novas alternativas para o controle de GTDs se tornaram necessárias. Nos últimos anos, pesquisas sobre controle o biológico de fungos GTD, utilizando micro-organismos antagonistas, tem demonstrado resultados promissores (Alfonzo et al., 2009; Mutawila et al., 2011; Haidar et al., 2016; Rezgui et al., 2016; Álvarez Pérez et al., 2017; Daignes et al., 2018; Mondello et al., 2018a; Del Frari et al., 2019; Mondello et al., 2019; Trotel-Aziz et al., 2019).

Ke-xiang et al. (2001), relataram que isolados de *Trichoderma* spp. foram eficientes sobre espécies de *Botryosphaeria*, com a vantagem de conseguirem colonizar e sobreviver em feridas da poda. Efeitos positivos de *Trichoderma* também foram demonstrados reduzindo infecções por *P. chlamydospora*, quando testados a campo (Halleen & Fourie, 2005), e *in vitro* e em casa de vegetação, de acordo com Di Marco et al. (2004). Pitt et al. (2010), relataram que o uso *Trichoderma* reduziu a incidência de colonização do *D. seriata* em ramos de videiras com um ano. *Trichoderma atroviride* (cepas SC1 e USPPT1) e *T. harzianum* apresentaram boa eficácia para a proteção de feridas de poda (Di Marco et al., 2004; Pertot et al., 2009; Halleen et al., 2010; Kotze et al., 2011). Na França, Pajot et al. (2012) e Mounier et al. (2016) relataram resultados promissores da cepa de *T. atroviride* I-1237 (Esquive WP®) contra o cancro da videira. Esta mesma cepa reduziu a incidência e gravidade da doença causada por *P. chlamydospora* e *N. parvum* em Portugal (Reis et al., 2016). Na Itália *T. asperellum* e *T. gamsii* (Remedier®) demonstraram bons resultados contra fungos relacionados ao complexo da Esca, reduzindo a mortalidade das plantas (Reggiori et al., 2014).

Outros agentes biológicos também têm sido relatados como eficazes contra



GTDs. Utilizando *Trichoderma* sp. em associação com *Bacillus subtilis*, Kotze et al. (2009) promoveram a proteção de ferimentos contra os fungos *Phomopsis viticola*, *Eutypa lata*, *P. Chlamydospora* e algumas espécies de Botryosphaeriaceae (*Neofusicoccum australe*, *N. parvum*, *Diplodia seriata* e *Lasiodiplodia theobromae*). Alfonzo et al. (2009) avaliaram *Bacillus subtilis* *in vitro*, e relataram o controle dos fungos *P. aleophilum*, *P. chlamydospora*, *Verticillium dahliae* e *Botryosphaeria rhodina*. Alguns compostos naturais como extrato de alho, lactoferrina, quitosana, oligossacarídeos, extrato de líquen, extrato de casca de limão e vanilina também demonstraram ser promissores no controle de GTDs, mas pesquisas adicionais são necessárias (Ayres et al., 2017; Cobos et al., 2015; Nascimento et al., 2007; Sosnowski et al., 2013).

Em experimentos de campo se observou que *Trichoderma* é capaz de permanecer no hospedeiro por diversos meses após a aplicação (Hunt et al., 2001). Sabe-se que a eficácia da proteção de tratamentos com base em *Trichoderma* spp. depende da capacidade destes fungos em colonizar ferimentos de poda da videira (John et al., 2008), bem como da interação com a planta, podendo ser mais ou menos eficaz de acordo com a cultivar (Mutawila et al., 2011). Outro fator importante está relacionado ao tempo necessário para a colonização da ferida pelos agentes de biocontrole, podendo criar um curto período de suscetibilidade à infecção por GTDs, em torno de 1 ou 2 semanas (Mondello et al., 2018).

A eficácia dos agentes de biocontrole depende do crescimento ativo do ingrediente ativo fúngico, que pode ser comprometido pela aplicação de fungicidas antes e/ou após o tratamento com o inóculo. Nesse sentido, Mutawila et al. (2015) desenvolveram cepas de *Trichoderma* mutantes resistentes ao benzimidazol, por meio de radiação gama, que foram eficazes na proteção de feridas de poda contra infecções fúngicas por patógenos no tronco.

### 3.3.2 Proteção de ferimentos no processo de produção de mudas

O processo de propagação em viveiros é constituído por várias etapas em que são realizados diversos tipos de cortes, provocando inúmeros ferimentos nas plantas, tornando o material de plantio vulnerável à infecção por patógenos GTD (Gramaje & Armengol, 2011). Em nível de viveiro, o manejo adequado deve ocorrer

de forma integrada, combinando o uso de medidas preventivas em todos os blocos-mãe do viveiro, em todas as fases de produção e durante plantio das mudas (Gramaje et al., 2018).

Inóculos viáveis de pé preto e doença de Petri foram encontrados em tesouras de poda lavadas, máquinas de enxertia e em tanques de hidratação (Agustí-Brisach et al., 2013; Aroca et al., 2010; Cardoso et al., 2013; Gramaje et al., 2011; Retief et al., 2006; Waite et al., 2013). Os processos de enxertia e de formação de calos são estágios críticos no processo de propagação da videira, pois necessitam formar feridas, que são vulneráveis à contaminação por patógenos GTD (Gramaje & Armengol, 2011).

A aplicação de fungicidas no controle de patógenos de tronco no processo de viveiro é difícil. Banhos químicos e sprays usados para o controle de patógenos externos não penetram nas estacas adequadamente para controlar fungos GTD (Waite, 2005). Contudo, a aplicação de fungicidas contra estes patógenos durante o processo de propagação é uma prática comum em viveiros de videiras em todo o mundo, porém os relatos sobre sua eficácia são variáveis. Em uma pesquisa realizada entre 146 viveiros europeus, apenas 8% relataram não usar fungicidas em nenhuma etapa do processo de propagação (Gramaje & Di Marco, 2015). O quinosol (sulfato de hidroxiquinolina) foi citado como sendo o fungicida mais utilizado, mas foi considerado ineficaz no controle de *P. chlamydospora* e *P. minimum* em viveiros espanhóis (Gramaje et al., 2009).

O tratamento padrão para porta-enxertos dormentes e explantes consiste em submergir estacas na água quente a 50°C durante trinta minutos, tempo necessário para inibir a maioria dos patógenos fúngicos e bacterianos, sem danificar gemas e brotos. (Fourie & Halleen 2004a; Waite, 2005). Porém, atualmente existe uma certa cautela a respeito do risco de dano térmico a partes meristemáticas de explantes de videira, promovido pelo tratamento com água quente (Serra et al., 2008; Gramaje & Armengol, 2011; Cavalcanti et al., 2013; Brambatti, 2019).

Diversos estudos sobre agentes de biocontrole de GTDs verificaram a eficácia de aplicações de *T. atroviride* e *T. harzianum* em viveiros. A incidência de *P. chlamydospora* e *Phaeacremonium* spp. em estacas de porta-enxertos foi reduzida a partir da imersão em formulações de *Trichoderma* (Di Marco et al., 2004; Fourie &

Halleen 2004a , 2006; Halleen & Fourie 2016). Plantas jovens infectadas imersas em soluções contendo a cepa I-1237 de *T. atroviride*, apresentaram redução de necrose causada por *D. seriata* e *P. chlamydospora* em viveiros franceses (Mounier et al., 2014). Pertot et al., (2016) demonstraram que a aplicação da *T. atroviride* cepa SC1 durante os estágios de hidratação, formação de calosidades e pré-plantio em viveiros italianos reduziu a infecção por *P. chlamydospora* e *P. minimum*, sendo os tratamentos de hidratação os mais eficazes.

Em viveiros, grande parte das pesquisas tem se concentrado em determinar a suscetibilidade de porta-enxertos de videira a patógenos do pé preto e doença de Petri. A incidência e gravidade dessas doenças tem sido significativamente afetadas pelo genótipo do porta-enxerto. Porém, nenhum dos porta-enxertos avaliados demonstrou resistência completa a esses patógenos (Alaniz et al., 2010; Eskalen et al., 2001; Gramaje et al., 2010b; Gubler et al., 2004 ; Jaspers et al., 2007). No sul do Brasil são utilizados, principalmente, os porta-enxertos Rupestris du Lot, 101-14, Solferino, Kober 5BB, SO4, 420 A e Paulsen 1103, sendo esse último de grande difusão devido a tolerância à fusariose (Camargo, 2003; Rusin, 2017).

As pesquisas realizadas nos últimos 50 anos promoveram avanços sobre a etiologia e biologia dos fungos GTD, identificando os riscos de infecções e os períodos de maior suscetibilidade. Esses fatores são importantes para o desenvolvimento de estratégias de manejo, a partir de práticas culturais apropriadas e da aplicação de fungicidas preventivos e/ou agentes de biocontrole nos ferimentos gerados pela poda ou durante a propagação em viveiros.

#### 3.4 A utilização da molécula 8-hidroxiquinolina como antifúngico

A molécula de 8HQ é composta por um anel heterocíclico de seis membros fundido a um anel benzênico, conforme demonstrado na Figura 5 (Sashidhara et al. 2009). Essa estrutura possibilita uma ampla versatilidade sintética, que viabiliza o desenvolvimento de projetos de novos antifúngicos. Esta molécula é considerada como uma estrutura de privilégio na química heterocíclica, pois apresenta capacidade quelante para vários íons de metais de transição, afinidade de ligações versáteis e possui propriedades semelhantes a outras drogas (Gupta, Luxami & Paul, 2021). Após sua síntese, diversas atividades biológicas foram citadas, dentre elas, efeito

neuroprotetor, antitumoral, antibacteriano, antisséptico, antioxidante, antimalárico, antiviral e atividade antifúngica (Dixit et al., 2010; Oliveri e Vecchio 2016; Pippi et al., 2017).

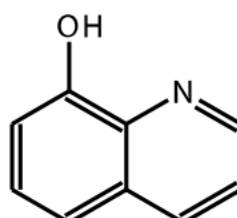


Figura 5. Estrutura química da 8-hidroxiquinolina (8HQ).

O modo de ação das 8HQs está relacionado a capacidade quelante do nitrogênio do anel quinolínico e da 8-hidroxila, que se liga a íons bivalentes (Prachayasittikul, et al., 2013). Estudos demonstram que os derivados de 8HQ possuem diferentes mecanismos de ação antimicrobiana, como inibição da síntese de RNA (Fraser et al., 1975) e inibição de metalopeptidases (Olaleye et al., 2011; Wangtrakuldee et al., 2013; Paolino et al., 2018, Joaquim, et al., 2021). Alguns trabalhos também relataram 8HQs como compostos com ação multimodo (Fu et al., 2019; Harbison-Price et al., 2020; Joaquim, et al., 2021). Derivados como clioquinol e os que contêm ácido sulfônico, demonstraram efeito na parede celular fúngica (Pippi et al., 2017). A conversão do ácido sulfônico em sulfonamida aumentou o efeito antifúngico, destacando-se o composto PH 151, 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-clorofenil)sulfonamida. Este composto foi ativo contra todas as espécies de fungos testadas, demonstrando um amplo espectro de ação (Joaquim *et al.* 2019) e baixa toxicidade (Pippi et al., 2017; Joaquim et al., 2019).

Os impactos ambientais gerados pela aplicação de fungicidas na agricultura sempre foram motivo de preocupação (Peña et al. 2018), aliado aos riscos que representam para a saúde do agricultor (Upadhayay et al., 2020), do desenvolvimento de resistência (Leroch et al., 2011; Hu et al., 2016) e dos resíduos nos alimentos produzidos. Portanto, o desenvolvimento de antifúngicos que gerem menores impactos ambientais e riscos no manuseio, que possibilitem a redução das doses aplicadas, mantendo a eficiência e seletividade são essenciais (Zhang et al.,

2020). A redução das doses de aplicação a partir da combinação de ingredientes ativos sinérgicos tem sido bastante utilizada pela indústria de agrotóxicos, além dessa redução, o desenvolvimento de resistência fúngica é suprimido ao utilizar ingredientes ativos com diferentes mecanismos de ação (FRAC, 2010).

Nesse contexto, dada a crescente incidência global de GTDs aliada a escassez de uma substância protetora capaz de impedir a contaminação e de controlar os principais agentes causais destas doenças, a utilização de derivados de 8HQ pode ser uma possibilidade para prevenção e manejo de infecções causadas por fungos associados as GTDs. Considerando que a infecção por estes fungos geralmente ocorre de forma simultânea, penetrando na planta a partir de ferimentos (Mondello et al., 2018a), é essencial um produto protetor de amplo espectro. Agentes causais das doenças pé-preto e de Petri podem coexistir numa mesma planta e estarem associados a outros como Botryosphaeriaceae e *Phomopsis* spp. formando complexos de doenças (Rego et al., 2000; Oliveira et al., 2004; Halleen et al., 2007; Coletto et al., 2018). Derivados da 8HQ demonstraram um amplo espectro de ação como antifúngico e possuem baixa toxicidade (Pipi et al. 2019a; 2019b).

### 3.5 Desenvolvimento e registro agrotóxicos no Brasil

De acordo com a redação dada pelo decreto 4.074/2002, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, agrotóxicos e afins são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (Brasil, 2002). Fungicidas, bactericidas e nematocidas, são os agrotóxicos mais utilizados para doenças de plantas. Os fungicidas são considerados como os agrotóxicos mais importantes para o controle de doenças, uma vez que representam o grupo que controla a maioria dos agentes fitopatogênicos (Amorim et al., 2018; Silva Junior & Behlau, 2018). Fungicidas são moléculas químicas, orgânicas ou inorgânicas, obtidas naturalmente ou

sintetizadas, utilizadas para evitar os processos de sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução de fungos, oomicetos, bactérias e algas causadoras de doenças de plantas (Zambolin et al., 2014; Amorim et al.; Silva Junior & Behlau, 2018). O conceito de fungicida foi atualizado, incluindo o controle de outros micro-organismos além dos fungos, pois estas moléculas possuem um espectro mais abrangente.

O desenvolvimento de um agrotóxico é um processo complexo, que pode ser dividido em três etapas principais: (i) pesquisa de síntese e triagem das moléculas; (ii) desenvolvimento; (iii) registro do produto. O processo de pesquisa tem por objetivo avaliar as características biológicas, químicas, toxicológicas, ambientais e comerciais das moléculas candidatas ao registro. A fase de desenvolvimento engloba diversos processos, como: a otimização do processo de produção da molécula; a avaliação da formulação; os ensaios de campo contra diferentes doenças e culturas em diferentes condições ambientais; e os testes toxicológicos e de impacto ambiental. Na posse destes dados, os resultados devem ser submetidos aos diferentes órgãos reguladores para análise do produto, que poderá ser liberado ou não para o registro e posterior comercialização. No Brasil, a regulamentação de agrotóxicos é regida pelas leis 7.802/89 e 9.974/00, pelos decretos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 4.074/02, 5.981/06 e 10.833/21, além de diversas instruções normativas do Instituto da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Amorim et al., 2018; Silva Junior & Behlau, 2018).

Os agrotóxicos só podem ser comercializados no Brasil se estiverem devidamente registrados. Para isso o produto deve passar pela avaliação de três órgãos do governo federal, o Instituto da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vinculada ao ministério da saúde, e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que integra o ministério do Meio Ambiente (MMA). Cada órgão realiza de forma independente avaliações específicas. O IBAMA é responsável pela elaboração do dossiê ambiental, que descreve o potencial toxicológico do produto no meio ambiente. O MAPA é responsável por avaliar a eficiência agrônômica e o potencial de uso do agrotóxico para controle de pragas, doenças ou plantas daninhas. A ANVISA é responsável pela elaboração do dossiê toxicológico, que está relacionado

com a nocividade do produto para o homem e a segurança alimentar. O MAPA concede o registro no Brasil somente se o agrotóxico for aprovado pelos três órgãos. (Amorim et al., 2018; Silva Junior & Behlau, 2018).

A partir do momento em que a empresa caracteriza uma molécula como agrotóxico, deve iniciar os procedimentos através do pleito do Registro Especial Temporário (RET). O RET é destinado a atribuir o direito de utilizar um agrotóxico, componente ou afim para finalidades específicas em pesquisa e experimentação, por tempo determinado, podendo conferir o direito de importar ou produzir a quantidade necessária à pesquisa e experimentação (Brasil, 2002). Este registro possibilita a importação/fabricação/formulação/utilização de quantidades específicas de agrotóxicos a serem utilizadas em pesquisas conduzidas no Brasil, para geração dos dados necessários para compor os Relatórios Técnicos a serem protocolados em cada órgão para pleito do registro definitivo (MAPA, 2012).

Para obtenção do RET, o requerente deve apresentar aos órgãos competentes requerimentos e relatórios, na forma prevista no Anexo III do Decreto 4.074/2002 (Brasil, 2002). As instituições de pesquisa, ensino e extensão que utilizem produtos à base de ingrediente ativo já registrado no País, desde que seu uso não ocorra em ambientes hídricos ou em florestas nativas, ficam dispensadas da emissão do RET. Neste caso, o RET será concedido automaticamente pelo órgão registrante, mediante inscrição em sistema informatizado integrado ao Sistema de Informações sobre Agrotóxicos – SIA (Brasil, 2006). O requerente deverá apresentar relatório de execução da pesquisa, quando solicitado, de acordo com instruções complementares estabelecidas pelos órgãos federais dos setores de agricultura, saúde e meio ambiente (Brasil, 2002).

Os demais tipos de registro são definitivos, e devem ser requeridos na forma do Anexo II do decreto 4.074/2002 (Brasil, 2002). São eles os registros de produto técnico, pré-mistura e produto formulado. O produto técnico é considerado uma matéria prima para o processo de produção do produto formulado e seu registro apenas permite o uso em instalações fabris para originar o produto formulado. As pré-misturas são preparações do produto técnico que tornam possível seu transporte ou formulação em diferentes unidades fabris, destina-se, portanto, exclusivamente à formulação de produto formulado. Sendo este último, o produto final, a ser utilizado

em ambiente agrícola visando o controle de pragas e doenças (Brasil, 2006; MAPA, 2012). Os requerimentos para pleito dos registros definitivo e RET (Anexos II e III), conforme o decreto 4.074/02, e atualizados de acordo com os decretos 5.981/06 e 10.833/21 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, estão disponíveis no anexo I.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.1 Derivados da 8-Hidroxiquinolina, fungicidas e cepas fúngicas

Os derivados da 8HQ testados neste estudo foram Clioquinol- 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina e PH 151- 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-clorofenil)sulfonamida (Figura 6). O clioquinol foi obtido através da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e a PH 151 foi sintetizada como descrito por Joaquim et al., (2019). Os derivados foram dissolvidos em DMSO (Sigma-Aldrich), diluídos em meio RPMI 1640 (Gibco; Grand Island, NY, EUA) e tamponados com MOPS (Sigma-Aldrich) para obter uma concentração máxima de 2% de DMSO para a realização dos experimentos.

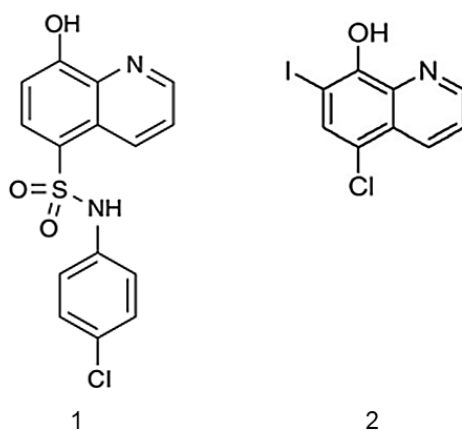


Figura 6: Estruturas moleculares dos derivados da 8-hidroxiquinolina: 1- PH 151; 2- Clioquinol.

Foram utilizados os princípios ativos químicos tebuconazole (Adama Brasil S/A, Brasil) e mancozebe (Dow AgroSciences Industrial Ltda, Brasil), para os fungos *I. liriodendri* e *P. clamydospora*. Para *P. clamydospora*, além dos já mencionados, foram utilizados também: tiofanato metílico (Iharabras S.A. Indústrias Químicas), captana (Adama Brasil S/A), iprodiona (FMC Quimica do Brasil LTDA), hidróxido de cobre (Mitsui & Co, Brasil S.A.) e o ativo biológico extrato de *Melaleuca alternifolia*



(Stockton-Agrimor do Brasil LTDA.). Informações mais detalhadas sobre os princípios ativos podem ser observadas na Tabela 2. Estes produtos foram utilizados pois são recomendados para o controle de outras doenças fúngicas em videira, aplicados em diferentes estádios fenológicos da planta e possuem diferentes mecanismos de ação.

Tabela 2. Características gerais dos ingredientes ativos (i.a.) dos fungicidas comerciais utilizados neste estudo.

Fungicidas Comerciais				
i.a.	Nome comercial	Grupo químico*	Mecanismo de Ação*	Modo de Ação
Tebuconazole 200 g L <sup>-1</sup>	Alterne®	Triazol	DMI- Inibidor da desmetilação do C14	Sistêmico
Mancozebe 800 g Kg <sup>-1</sup>	Dithane NT®	Ditiocarbamato	Atividade de contato multissítio	Protetor de contato
Tiofanato metílico 700 g Kg <sup>-1</sup>	Cercobin®	Benzimidazol	Montagem de $\beta$ -tubulina na mitose	Sistêmico
Captana 480 g L <sup>-1</sup>	Captan®	Dicarboximida	Atividade de contato multissítio	Protetor de Contato
Iprodiona 500 g L <sup>-1</sup>	Rovral®	Dicarboximida	MAP/Histidina-cinase na transdução do sinal osmótico	Protetor de Contato
Hidróxido de Cobre 538 g Kg <sup>-1</sup>	KOCIDE® WDG Bioactive	Inorgânico Cobre	Atividade de contato multissítio	Protetor de contato
Extrato de <i>Melaleuca alternifolia</i> 222,5 g L <sup>-1</sup>	Timorex Gold®	Orgânico- Extrato de <i>Melaleuca alternifolia</i>	Ruptura da membrana celular	Protetor de contato, mesostêmico e indutor de resistência

\* Fonte: FRAC (Fungicide Resistance Action Committee)

As cepas fúngicas (Tabela 3) foram obtidas da Micoteca do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Federal do Rio Grande do Sul, campus Bento Gonçalves (IFRS-BG), cadastro Sisgen nº A85766B. A identificação foi realizada pelo sequenciamento das regiões ITS 1 e 2 do rDNA.

Tabela 3. Identificação das cepas de *Ilyonectria liriodendri* e *Phaeomoniella chlamydospora* depositadas na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Federal do Rio Grande do Sul (IFRS), Campus Bento Gonçalves (ID Coleção IFRS) e no Genbank (ID Genbank), que foram utilizadas neste estudo.

Espécie	ID Coleção	
	IFRS	ID Genbank
<i>I. liriodendri</i>	TD 176	MK421586.1
<i>I. liriodendri</i>	TD 1117	MK421588.1
<i>P. chlamydospora</i>	TD 68	KY984085.1
<i>P. chlamydospora</i>	TD 463	*
<i>P. chlamydospora</i>	TD 455	KY984088.1
<i>P. chlamydospora</i>	TD 624	KY984091.1
<i>P. chlamydospora</i>	TD 487	KY984078.1
<i>P. chlamydospora</i>	TD 538	KY984079.1
<i>P. chlamydospora</i>	TD 336	KY984080.1
<i>P. chlamydospora</i>	TD 340	KY984073.1
<i>P. chlamydospora</i>	TD 458	KY984082.1
<i>P. chlamydospora</i>	TD 157	KY984071.1

\* Não tem depósito no Genbank

#### 4.2 Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM)

Os inóculos fúngicos utilizados nos ensaios consistiram em uma suspensão de conídios obtidos a partir de culturas de 10 e 15 dias de idade para *I. liriodendri* e *P. chlamydospora*, respectivamente, cultivados em meio BDA (ágar batata dextrose). A concentração final de conídios foi ajustada em câmara de Neubauer para  $2,5 \times 10^5$  conídios/mL (Spolti et al., 2012). A CIM, foi realizada segundo o protocolo M38-A2 da CLSI (2008), em meio RPMI 1640 utilizando-se placas de microdiluição estéreis, descartáveis, com múltiplos poços (96 poços em formato de U), conforme descrito (Ribas et al., 2016). Foi determinada como CIM, a menor concentração do fungicida em teste, capaz de produzir inibição total da germinação dos esporos e do crescimento micelial dos fungos. Quatro leituras (quaduplicata) foram feitas para cada combinação antifúngica. As leituras foram realizadas após 48 horas para *I. liriodendri* e 72 horas para *P. chlamydospora*, onde se observou ausência de turvação do meio. Confirmações da ausência de crescimento micelial foram realizadas com microscópio

óptico com aumentos de 10x e 40x. Foram testadas dez concentrações dos compostos entre os intervalos de 0,09 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 4.3 Ensaio de Sinergismo

A interação entre a PH 151 e os fungicidas tebuconazole, captana e tiofanato metílico foram avaliados para as cepas TD 157 e TD 336 do fungo *P. clamydospora* usando o método checkerboard (Johnson et al., 2004). Estas cepas foram selecionadas para dar continuidade ao estudo, pois apresentaram valores de CIM intermediários, dentre as dez cepas investigadas. Os três fungicidas comerciais com menores valores de CIM foram escolhidos para este ensaio. As concentrações testadas variaram de CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4 e CIMx8 para cada composto antifúngico, resultando em 49 combinações. Os experimentos foram realizados em triplicata e incubados a 32°C por 7 dias. O efeito da interação foi definido quantitativamente como um índice de concentração inibitória fracionada (FICI) expresso como a soma das concentrações inibitórias fracionadas (FIC), conforme definido pela seguinte equação:

$$\text{FICI} = \text{FICA} + \text{FICB} = \frac{\text{MIC}_A \text{ in combination}}{\text{MIC}_A \text{ tested alone}} + \frac{\text{MIC}_B \text{ in combination}}{\text{MIC}_B \text{ tested alone}}$$

O sinergismo é definido quando o  $\text{FICI} \leq 0.5$ , indiferente quando  $0.5 < \text{FICI} \leq 4$  e antagonismo quando  $\text{FICI} > 4$  (Odds, et al., 2003).

#### 4.4 Crescimento micelial, Inibição relativa I (%) e $\text{EC}_{50}$

Para a avaliação do crescimento micelial do fungo *I. liriodendri*, as colônias fúngicas da cepa TD 176 foram cultivadas em BDA por 15 dias. Após este período foram retirados discos miceliais de 5 mm de diâmetro que foram transferidos para o centro de novas placas de Petri. As novas placas foram preparadas com meio BDA contendo o fungicida mancozebe nas diluições 100 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e a PH 151 nas diluições de 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As concentrações citadas foram determinadas a partir dos seus valores de CIM (8x CIM e 16x CIM). Foram também preparadas placas controle, contendo somente o meio de cultura. Essas foram mantidas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  em escuro contínuo. O diâmetro das colônias foi medido diariamente, durante duas semanas, em duas direções perpendiculares. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento. O fungicida mancozebe foi utilizado neste e nos ensaios subsequentes,

pois foi o que demonstrou melhor atividade frente a *I. lirioidendri*.

Para a avaliação do crescimento micelial de *P. chlamydospora*, as colônias fúngicas da cepa TD 336 foram cultivadas em BDA por 15 dias para a retirada de discos miceliais de 7 mm de diâmetro. Os discos foram transferidos para o centro de novas placas de Petri com o meio BDA contendo separadamente o fungicida tebuconazole e a PH 151 em concentrações correspondentes aos seus valores de CIM. E em placas contendo a combinação dos dois produtos, levando em consideração as CIMs do ensaio de sinergismo. As concentrações testadas variaram entre 16xCIM, 8xCIM, 4xCIM, 2xCIM, CIM E CIM/2 e estão disponibilizadas na Tabela 4. Discos miceliais também foram transferidos para placas controle, contendo somente o meio de cultura. As placas foram mantidas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  em escuro contínuo. O diâmetro das colônias foi medido diariamente, durante 30 dias, em duas direções perpendiculares. Foram realizadas três repetições por tratamento.

Tabela 4. Concentrações finais em meio de cultura sólido do fungicida tebuconazole, derivado da 8- hidroxiquinolina PH 151 e suas combinações para o ensaio de crescimento micelial de *Phaeomoniella chlamydospora*.

	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$			
	PH 151	Tebuconazole	PH 151+Tebuconazole*	
16xCIM	50	6,24	21,76	0,96
8xCIM	25	3,12	10,88	0,48
4xCIM	12,5	1,56	5,44	0,24
2xCIM	6,25	0,78	2,72	0,12
CIM**	3,125	0,39	1,36*	0,06*
CIM/2	1,56	0,195	0,68	0,03

\*Concentrações inibitórias mínimas determinadas através do checkerboard assay.

\*\* Concentração inibitória mínima

As porcentagens de inibição I (%), foram determinadas a partir da fórmula:  $I (\%) = \frac{[(C - d) - (T - d)]}{(C - d)} \times 100$ , onde d corresponde ao diâmetro inicial das colônias (5 mm), C ao diâmetro atingido pelo controle e T ao diâmetro atingido pelo fungo em cada tratamento (Agarwal, et al., 2001; Yin et al., 2019)

O  $EC_{50}$ , concentração que inibe 50% do crescimento micelial, foi calculado utilizando o software GrafPad Prism 8, as concentrações dos fungicidas foram transformadas em  $\log_{10}$ , e os dados submetidos a análise de regressão.

Os dados de CIM foram submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA). Seguido pelo teste de Duncan (5% probabilidade). Nos dados de inibição

relativa (I%), foi aplicada análise de variância bidirecional, seguida de teste de Duncan a nível de 5% de probabilidade. Estas análises estatísticas foram realizadas através do software R® (R CORE TEAM, 2022) utilizando o pacote Agricolae v.1.3-5 (Mendiburu, 2022).

#### 4.5 Inoculação nas plantas e re-isolamento

Os testes *in vivo* foram realizados após os resultados dos testes *in vitro* em mudas de videiras das cultivares Gewürztraminer (*Vitis vinifera*) e Isabel (*Vitis labrusca*), utilizando-se os porta-enxertos Paulsen 1103 e SO4, respectivamente. As mudas foram obtidas no Viveiro Sinigaglia, Bento Gonçalves/RS e mantidas em vasos contendo uma mistura composta por um terço de composto orgânico para produção de mudas e dois terços de solo, em casa de vegetação no IFRS-BG.

Os tratamentos consistiram na aplicação dos produtos em diferentes doses (10 x CIM, 50 x CIM e 100 x CIM) na proteção de ferimentos, a partir de duas formas: combinação dos modos preventivo + curativo e somente modo curativo. O ferimento nos ramos foi efetuado utilizando-se tesoura de poda desinfectada com álcool 70%. Logo em seguida, no modo preventivo + curativo, foi aplicado no local do ferimento o tratamento com o auxílio de uma micropipeta. Transcorridas 24 horas após a aplicação, as videiras foram inoculadas com discos miceliais de 5 mm de *I. liriodendri* cultivados previamente em BDA por 15 dias. Para a avaliação do modo curativo os produtos (fungicida mancozebe e o derivado da 8HQ PH 151) foram aplicados 24h após a introdução dos discos miceliais. Os discos miceliais foram colocados sobre os ferimentos tratados e cobertos com Parafilm® M (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA) para evitar a desidratação. Foram efetuadas 4 aplicações do derivado da 8HQ PH 151 e do fungicida mancozebe, nas doses mencionadas acima, quinzenalmente, durante 60 dias. Para o controle negativo foram utilizados discos de BDA sem colonização de fungos, e para o controle positivo foram utilizados os discos miceliais sem nenhum tratamento fungicida no ramo. Obteve-se um total de 14 tratamentos por cultivar, sendo 6 tratamentos para cada forma de aplicação, mais os controles positivo e negativo. Para cada tratamento foram realizadas 10 repetições (10 ferimentos), um ferimento por ramo da planta. A figura 7 demonstra ilustrativamente os procedimentos descritos.

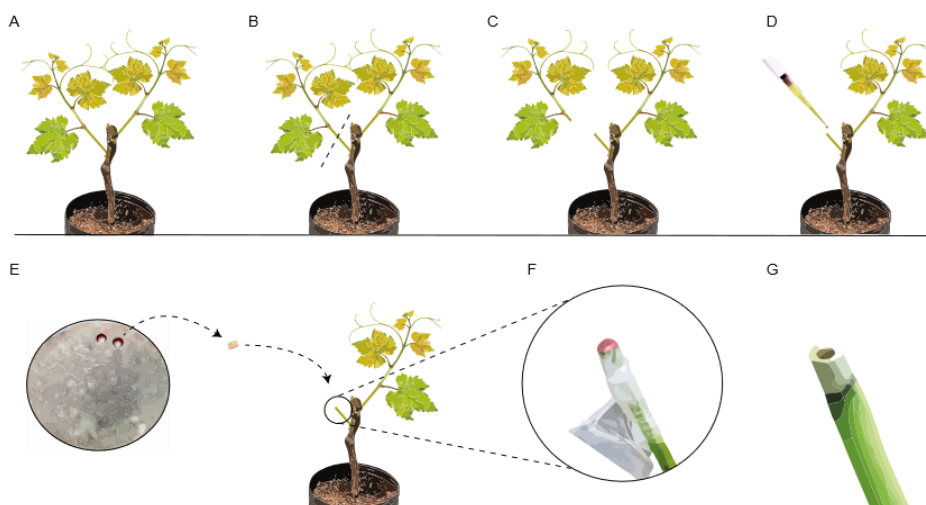


Figura 7. Representação esquemática do experimento de inoculação dos produtos nas plantas. (A) mudas de videira cultivadas em vasos em casa de vegetação, (B) Poda do ramo com tesoura desinfestada com álcool 70%, (C) Ferimento ocasionado pela poda, (D)\* Aplicação dos produtos em diferentes doses, (E) Introdução do disco micelial de *Ilyonectria liriodendri* 24h após a aplicação dos produtos, (F) Cobertura do ferimento contendo o disco micelial, (F) aspecto do ferimento apresentando infecção. \* Na forma curativa os produtos foram aplicados 24h após a introdução dos discos miceliais.

Após 60 dias, tempo necessário para o desenvolvimento dos fungos, dos sintomas característicos e para ação dos produtos, os ramos inoculados foram podados e observados em relação à presença de sintomas internos, caracterizados pela coloração negra e necrose dos tecidos lignificados. A avaliação dos índices de re-isolamento, nas duas formas de aplicação (curativa e preventiva) foi realizado seguindo a metodologia de Almança et al. (2013), em que os ramos podados são desinfestados com álcool 70% por 30 segundos com hipoclorito de sódio 2,5% por 2 minutos e novamente imersas em álcool 70% por 30 segundos. Posteriormente foram retirados 10 fragmentos de lenho de cada ramo e dispostos em placas de Petri contendo BDA. Estes foram mantidos em estufa a 26°C por 30 dias. O crescimento dos fungos a partir dos ramos foi observado diariamente durante o período de incubação e foi contabilizado o percentual de re-isolamento dos fitopatógenos inoculados de acordo com cada tratamento.

Para cada cultivar foi estruturado um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 x 3, envolvendo dois momentos

de aplicação (preventivo e curativo), duas moléculas diferentes (PH 151 e mancozebe), três doses diferentes em função da CIM de cada molécula, e mais dois tratamentos adicionais (controles positivo e negativo). Realizou-se cinco repetições em cada ensaio. Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância e testes de média com auxílio do programa estatístico Assistat (Silva e Azevedo, 2016). As médias dos tratamentos componentes do fatorial foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). As médias dos tratamentos adicionais foram comparadas com as médias dos tratamentos do fatorial por contraste ( $P < 0,05$ ). Para elaboração dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism, versão 6.01.

## 5. ARTIGOS

### 5.1. Artigo 1

The efficacy of 8-hydroxyquinoline derivatives in controlling the fungus *Ilyonectria liriodendri*, the causative agent of black foot disease in grapevines.

### 5.2. Artigo 2

The Efficacy of 8-hydroxyquinoline derivatives in controlling the *Phaeomoniella chlamydospora*, the causative agent of Petri disease in grapevines.



## 6. DISCUSSÃO GERAL

Neste estudo propomos avaliar a eficiência *in vitro* e *in vivo* de derivados da 8HQ no controle do fungo *I. liriodendri* agente causador da doença pé-preto em videira e *in vitro* no controle do fungo *P. chlamydospora*, um dos fungos responsáveis pela doença de Petri em viveiros e plantas jovens e relacionado ao complexo da Esca em plantas adultas. Para este último patógeno, também verificamos seu efeito sinérgico junto à fungicidas já utilizados em videiras para outras doenças fúngicas.

Os resultados referentes às concentrações inibitórias mínimas frente ao fungo *I. liriodendri* revelaram que as cepas utilizadas apresentaram maior sensibilidade a PH 151 quando comparadas aos fungicidas comerciais testados. Já em relação aos resultados frente a *P. chlamydospora*, podemos observar que as cepas testadas foram sensíveis ao fungicida comercial tebuconazole, e aos derivados de 8HQ clioquinol e PH 151. O derivado PH 151 apresentou efeito sinérgico quando associado aos fungicidas agrícolas tebuconazole e captana para *P. chlamydospora*. Nos ensaios de crescimento micelial a cepa TD 176 de *I. liriodendri* foi fortemente inibida pela PH 151 enquanto a inibição referente ao fungicida mancozebe foi semelhante ao controle negativo ao final do experimento. Para *P. chlamydospora*, tebuconazole isoladamente inibiu totalmente o crescimento do fungo, nas duas maiores doses avaliadas. A PH 151 isoladamente, na maior dose, inibiu 95,8 % do crescimento micelial. A associação entre PH 151 + tebuconazole inibiu totalmente o crescimento até o 15º dia aproximadamente, nas três maiores doses. A combinação entre PH 151 + tebuconazole apresentou os menores valores de EC<sub>50</sub>, bem inferiores aos dos produtos isolados. Nos testes *in vivo* a ação do derivado PH 151 destacou-se quando aplicado de forma preventiva para *I. liriodendri*, indicando potencial para uso como protetor de ferimentos.

A CIM do derivado PH 151 foi avaliado frente a leveduras e fungos filamentosos de importância clínica, e este derivado foi o mais potente da série, sendo ativo para todas as espécies de fungos testadas (Joaquim et al., 2019). Pippi et al., 2019a, verificaram que o mecanismo de ação desta molécula ocorre, possivelmente, a nível de parede celular, gerando alterações morfológicas nas células fúngicas. Resultados semelhantes foram obtidos por Yin et al., 2019, quando observaram o

aspecto das células fúngicas tratadas com outro padrão de derivado da 8HQ sintetizado pelo grupo. Este estudo expande a lista de ingredientes ativos testados contra fungos GTD, sendo os derivados de 8HQ clioquinol e PH 151 testados pela primeira vez. Um número considerável de agentes químicos e de biocontrole já foram avaliados para o controle de agentes patogênicos traqueomicóticos relacionados ao pé-preto, doença de Petri, complexo da Esca e demais fungos associados às GTDs nos últimos 20 anos (Mondello et al., 2018a). Apesar destas tentativas, o controle destes fungos ainda não foi alcançado. A determinação da concentração inibitória mínima a partir da microdiluição de fungicidas em meio líquido, em microplacas de titulação, não é um método amplamente utilizado nos ensaios relacionados às doenças de tronco de videira, mas é um método padrão para determinação de susceptibilidade de patógenos a fármacos na área clínica. A maioria dos ensaios *in vitro* para fungos GTD é conduzido em meio sólido medindo a inibição do micélio inoculado (Mondello et al., 2018b; Del Frari et al., 2018), o qual também realizamos. Propomos determinar a CIM em meio líquido pois (i) os resultados são obtidos de forma rápida (72h); (ii) a quantidade de produto testada é menor; e (iii) os resultados de CIM foram utilizados como critério para a condução dos experimentos subsequentes.

Verificamos que o fungo *I. liriodendri* apresentou maior sensibilidade a menores doses de PH 151 e clioquinol quando comparadas às dos fungicidas comerciais tebuconazole e mancozebe. No ensaio de crescimento micelial de *I. liriodendri* verificou-se que a PH 151 inibiu o desenvolvimento do fungo nas duas doses testadas, com inibições relativas de 94 e 98,5 %, não variando ao longo do experimento. Ao analisarmos a inibição referente ao fungicida mancozebe, percebe-se uma inibição inicial, mas ao final do experimento assemelha-se ao controle, com valores de inibição de 3 e 10,5%. Fourie e Halleen (2007) verificaram a ação de 13 fungicidas para o controle de pé-preto em videiras, dentre eles mancozebe e sulfato de hidroxiquinolina, os dois apresentaram baixa eficiência na redução do crescimento micelial. Resultados divergentes foram encontrados por Hassan, et al. 2013, testando fungicidas contra *Ilyonectria radicularis*, onde tanto o mancozebe, quanto o sulfato de hidroxiquinolina apresentaram inibição elevada do crescimento micelial. Porém, os mesmos não foram efetivos no experimento *in vivo*, onde as estacas foram imersas

nos fungicidas antes do plantio. Alaniz et al. (2011) testou 14 fungicidas contra *C. liriodendri* e *C. macrodidymum*, carbendazim, sulfato de hidroxiquinolina, imazalil e procloraz foram os fungicidas mais eficazes na redução do crescimento micelial em ambas as espécies de *Cylindrocarpon*. Derivados da 8HQ foram sintetizados e testados *in vitro* por Yin, et al. (2019), destacando-se o composto 2, que inibiu totalmente o crescimento micelial das cinco espécies de fungos fitopatogênicos testados, na concentração de 25 µg mL<sup>-1</sup>. Santos et al. (2013), concluíram que a quitosana (Tecnifol®Defender) e difenoconazol apresentaram resultados promissores nos testes *in vitro* para controle de *I. liriodendri*. Russi, et al. (2020), avaliou a atividade antifúngica da cepa F62 de *Bacillus subtilis* frente as cepas TD 176 e 1117 de *I. liriodendri* e verificaram que este agente reduziu o crescimento micelial em 69,7 e 69%, respectivamente. Santos et al. (2016) também verificaram redução nas porcentagens de inibição de crescimento de *Dactylonectria macrodidyma*, em ensaios com produtos comerciais contendo *B. subtilis*. Em ambos os trabalhos citados, as porcentagens de re-isolamentos fúngicos foram reduzidas com a aplicação dos agentes de biocontrole, sendo estes considerados promissores. Estes resultados são semelhantes aos demonstrados pela PH 151 na cv Gewürztraminer, e superiores aos da cv Isabel, quando aplicada de forma preventiva, na maior dose.

Nos ensaios *in vivo*, as menores porcentagens de recuperação do fungo *I. liriodendri* foram obtidas a partir dos ramos tratados preventivamente com a PH 151 nas maiores doses aplicadas. Destacando-se a cv Isabel onde obteve-se 17% de re-isolamento, e uma inibição de 81,5% na recuperação do patógeno, quando comparado ao controle positivo. Para a cv Gewürztraminer, observou-se maior dificuldade no controle, sendo o menor índice de re-isolamento de 55% e uma inibição frente ao controle positivo de 37,5%. Esses dados refletem suscetibilidades diferentes das cultivares em relação ao fungo testado, com a cv Isabel demonstrando uma melhor resposta ao tratamento preventivo. Os tratamentos curativos, para ambas as cultivares, não foram considerados eficazes.

A suscetibilidade de variedades de videira e porta-enxertos a vários GTD já foi amplamente avaliada, demonstrando a existência de diferentes níveis de suscetibilidade entre os diferentes materiais estudados (Eskalen et al., 2001; Feliciano et al. 2004; Gubler et al. 2004; Baumgartner & Rizzo, 2006; Sosnowski et al., 2007;

Jaspers et al., 2007; Alaniz, et al., 2010; Gramaje et al., 2016). Fourie & Halleen (2007) após a realização de testes *in vitro*, selecionaram os fungicidas mais efetivos para aplicação em porta-enxertos e raízes em viveiros antes do plantio. As porcentagens de isolamento observadas revelaram que mesmo os fungicidas mais efetivos *in vitro*, não apresentaram redução significativa frente as plantas controle, com exceção do fungicida benomyl. Na mesma linha de trabalho Alaniz et al. (2011), selecionou sete, dos catorze fungicidas testados *in vitro*, para avaliar de forma preventiva contra *C. liriodendri* e *C. macrodidymum* em estacas durante a fase de enraizamento. As porcentagens de re-isolamento variaram entre 70,5 e 91,1% dentre os fungicidas e espécies fúngicas, Halleen e Fourie (2016), após testarem vários fungicidas para GTD, concluíram que apenas o tratamento com água quente em estacas dormentes foi capaz de erradicar patógenos causadores de pé-preto em viveiros, além de diminuir a incidência de outros fungos de tronco.

Estratégias de controle preventivo e/ou curativo para o pé-preto tem se limitado a prevenir ou combater a doença a nível de viveiro, nas fases de preparação dos porta-enxertos e enraizamento. Nestes casos, o tratamento com água quente tem se mostrado eficaz. Porém os fungos causadores do pé-preto também penetram na planta a partir de ferimentos de poda frescos (Gramaje, et al., 2018), plantas aparentemente saudáveis podem ser infectadas por ferimentos de raízes e tronco (Halleen & Fourie 2006; Akgül 2020). Ferimentos estes, que a planta é submetida ao longo de toda a sua vida. Neste sentido, avaliamos o potencial da PH 151 em proteger ferimentos, de forma preventiva, e de eliminar o fungo após a penetração nos vasos do xilema, de forma curativa. Como o diferencial entre as formas de aplicação foi a aplicação inicial preventiva e curativa dos produtos, consideramos que a PH 151 demonstrou eficácia apenas como protetora. Resultados semelhantes foram obtidos por Díaz e Latorre (2013), que concluíram que independente dos fungicidas, as aplicações de forma preventiva foram superiores as de forma curativa contra *D. seriata*, *Inocutis* sp. e *Pa. chlamydospora* em videiras. Resultados positivos na proteção de feridas frescas também foram observados por Sosnowski et al. (2013), Ayres et al. (2017) e Sosnowski et al. (2019), utilizando diferentes fungicidas e formas de aplicação e por Kotze et al. (2011) e Mutawila et al. (2016), utilizando agentes de biocontrole, para diferentes GTD.

Para *P. chlamydospora*, verificou-se a sensibilidade de dez cepas do fungo frente a 9 fungicidas a partir do ensaio de concentração inibitória mínima. De maneira geral, houve uma pequena variação entre as cepas, com resultados de CIM variando entre um ponto de diluição abaixo ou acima. Estas variações entre as cepas são esperadas, porém pode-se observar que todas tiveram comportamento semelhante quanto a sensibilidade ou não aos fungicidas avaliados. Entre os fungicidas comerciais destacou-se o tebuconazole, seguido por captana, tiofanato metílico e mancozebe. Em relação aos derivados de 8HQ o clioquinol destacou-se, porém PH 151 não diferiu estatisticamente de tebuconazole e clioquinol, e foi superior aos demais fungicidas avaliados. Del Frari et al. (2018), conduziu ensaios de CIM para *P. chlamydospora* e *P. minimum*, avaliando produtos químicos promissores, onde peróxido de hidrogênio e prata elementar tiveram CIMs 15 e 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Os demais produtos avaliados tiveram valores acima de 37  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

A associação entre fungicidas com distintos mecanismos de ação vêm sendo amplamente utilizada na agricultura. Estas associações diminuem o desenvolvimento de resistência, associando ingredientes ativos sistêmicos e protetores de contato, potencializam a ação dos produtos, que atuam em diferentes alvos, e reduzem a dose efetiva aplicada (Zambolim, et al., 2014; Amorim et al.; Silva Junior & Behlau, 2018). De acordo com o FRAC, o risco de ocorrência de resistência em fungos, é dependente do patógeno, do grupo químico do fungicida e das medidas agrônomicas adotadas. Neste estudo verificamos a ação sinérgica entre a PH 151 e os fungicidas tebuconazole e captana. O mecanismo antifúngico de ação da PH 151 ainda não é bem compreendido, mas estudos recentes realizados por Pippi et al. (2019a) demonstraram que atua na parede celular de *Candida* sp. e dermatófitos. Tebuconazole é um fungicida inibidor da desmetilação do C<sup>14</sup> na síntese do ergosterol, principal lipídio constituinte da membrana plasmática dos fungos, cujo mecanismo bioquímico de ação é amplamente conhecido. Captana é um fungicida protetor de contato com atividade multissítio, atuando em diferentes fases do metabolismo fúngico (FRAC). Assim uma ação na parede celular dos fungos poderia facilitar a penetração dos demais fungicidas, aumentando a quantidade do ingrediente ativo disponível para exercer seu efeito (Costa et al., 2020). Não existem dados da associação desta

molécula com fungicidas pois está sendo testada pela primeira vez neste estudo. Mas neste trabalho as associações acima reduziram os valores de CIM de todos os produtos, e o EC<sub>50</sub> de PH 151 + tebuconazol, em comparação com o EC<sub>50</sub> dos produtos isolados.

O experimento de crescimento micelial permitiu a obtenção das porcentagens de inibição e das concentrações que inibem 50% do crescimento de *P. chlamydospora*, mas também nos permitiu avaliar o comportamento do patógeno ao longo de 30 dias. Desta forma, podemos observar uma inibição inicial importante no tratamento com PH 151 na maior dose até o 13º dia. Após este período o patógeno teve um leve crescimento, mas com uma inibição relativa de 95,8%. Souza et al. (2020) encontrou inibição do crescimento de 94% com a mesma concentração de PH 151 (50 µg mL<sup>-1</sup>) para *I. liriodendri*. A associação entre PH 151 + tebuconazole também teve um comportamento semelhante, inibindo o crescimento no mesmo período inicial, nas três maiores doses. Tebuconazole inibiu totalmente o crescimento micelial nas duas maiores doses (6,24 e 3,12 µg mL<sup>-1</sup>), com o EC<sub>50</sub> de 0,235 µg mL<sup>-1</sup>.

Hernández (2018) após testar diferentes fungicidas utilizados em videiras no Chile, verificou que tebuconazole, tiofanato metílico, hidróxido de cobre e óxido cuproso foram os mais efetivos, todos com inibição na faixa de 98%. Porém nós não obtivemos resultados satisfatórios com o hidróxido de cobre, no ensaio de concentração inibitória mínima. Strydom (2019) encontrou EC<sub>50</sub> médio entre as cepas testadas de 0,105 µg mL<sup>-1</sup> para tebuconazole. Resultados semelhantes foram encontrados por Crous et al. (2001); Jaspers (2001) e Gramaje et al. (2009) onde tebuconazole efetivamente preveniu o crescimento micelial de *P. chlamydospora*. Apesar da associação entre PH + tebuconazole não ter inibido totalmente o crescimento micelial, seus valores de EC<sub>50</sub> foram bem inferiores quando comparados aos das substâncias isoladamente. A redução nos valores de EC<sub>50</sub> no tratamento com os fungicidas combinados, pode ser explicada pelos diferentes mecanismos de ação dos produtos. Enquanto tebuconazole atua a nível de membrana celular, inibindo a síntese do ergosterol, PH 151 atua a nível de parede celular fúngica. Os resultados sugerem que um ajuste de dose da PH 151 poderia inibir totalmente o crescimento micelial do fungo quando utilizada isoladamente. Já a combinação PH + tebuconazole

poderia ser uma estratégia de manejo para *P. chlamydospora*, visando a proteção de ferimentos e a diminuição das doses aplicadas de fungicidas de alta toxicidade.

A avaliação de novos ingredientes ativos, bem como de práticas culturais que possibilitem uma redução efetiva das infecções causadas por patógenos GTD, tem sido a principal prioridade para a indústria e para pesquisadores durante as últimas décadas (Úrbez-Torres, 2011; Gramaje, et al., 2018). Verificamos que a PH 151 teve efeito sobre o crescimento dos fungos *Ilyonectria liriodendri* e *P. chlamydospora in vitro* e demonstrou potencial para proteção de ferimentos. Estes resultados são importantes pois ambos os fungos afetam plantas jovens e atingem os vasos a partir de lesões. *P. chlamydospora* e *I. liriodendri* estão presentes em viveiros, onde penetram na planta a partir de lesões oriundas da produção de mudas, e a campo, penetrando a partir de ferimentos de poda. Portanto, é necessário um produto que proteja contra a infecção concomitante por diferentes espécies de fungos GTD. Desta forma, derivados da 8HQ, como a PH 151, destacam -se como uma alternativa promissora para proteção de ferimentos em videiras. O fato desta apresentar um mecanismo de ação seletivo, que altera a parede celular do fungo e não danifica estrutura e funções da membrana plasmática das células (Pippi, et al., 2019b), a torna um produto seguro para quem realiza seu manuseio.

Os fungicidas mais efetivos para a proteção de ferimentos contra a infecção de fungos GTD tem uma toxicidade elevada, o que reduziu as opções de uso, devido a retirada do mercado de alguns no início dos anos 2000 (Decoin, 2001). A associação entre derivados de 8HQ e fungicidas comerciais já registrados para uso em videira, poderia ser uma estratégia de manejo utilizada na proteção de ferimentos, tanto no processo de produção de mudas, quanto a campo. Associações entre substâncias que possuam diferentes alvos são positivas, pois potencializam a ação dos produtos e possibilitam a aplicação de menores doses, reduzindo riscos aos agricultores, de resistência fúngica e gerando menor impacto ambiental.

## 7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, concluímos que o derivado da 8HQ- 8 hidroxiquinolina-5-(N-4 clorofenil)sulfonamida (PH 151) foi efetiva no controle *in vitro* dos fungos *Ilyonectria liriodendri* e *Phaeomoniella clamydospora*, e, para este último, apresentou efeito sinérgico com captana e tebuconazole. Este derivado demonstrou ser uma alternativa promissora para a proteção de ferimentos de videira, tanto para os ferimentos gerados no processo de produção de mudas, quanto aos relacionados à poda. Ademais concluímos o seguinte:

- 1) O fungo *I. liriodendri* demonstrou sensibilidade frente aos derivados da 8-hidroxiquinolina PH151 e clioquinol nos ensaios de concentração inibitória mínima, sendo seus valores inferiores aos fungicidas convencionais avaliados.
- 2) O fungo *P. chlamydospora* demonstrou sensibilidade frente aos derivados da 8-hidroxiquinolina PH151 e clioquinol nos ensaios de concentração inibitória mínima, sendo seus valores inferiores à maioria dos fungicidas convencionais avaliados.
- 3) O fungo *I. liriodendri* não foi sensível ao fungicida tebuconazole dentro da faixa de concentração testada, sendo mais sensível ao fungicida mancozebe.
- 4) O fungo *P. chlamydospora* demonstrou grande sensibilidade ao fungicida tebuconazole. Demonstrou também sensibilidade para os fungicidas captana, tiofanato metílico e mancozebe e não foi sensível para os fungicidas extrato de *M. alternifolia*, hidróxido de cobre e iprodiona.
- 5) No ensaio de crescimento micelial PH 151 inibiu fortemente o desenvolvimento de *I. liriodendri*, nas duas doses testadas, ao contrário do fungicida mancozebe.
- 6) Para o ensaio de crescimento micelial de *P. chlamydospora*, tebuconazole inibiu totalmente o crescimento do fungo, nas duas maiores doses avaliadas. PH 151 inibiu fortemente o desenvolvimento do fungo na sua maior dose, e a associação entre PH + tebuconazole nas três maiores doses. Esta associação apresentou os menores valores de EC<sub>50</sub>.
- 7) Observou-se relação sinérgica de PH 151 entre tebuconazole e captana, frente à *P. chlamydospora*. A combinação entre PH 151 e tiofanato metílico foi



classificada como indiferente.

- 8) Nos ensaios *in vivo*, as menores porcentagens de recuperação do fungo *I. liriodendri* foram obtidas a partir dos ramos da cv. Isabel tratados preventivamente com a PH 151 na maior dose. Os tratamentos curativos, para ambas as cultivares, não foram considerados eficazes.

## 8. REFERÊNCIAS

- Agarwal M, Walia S, Dhingra S, Khambay BP. 2001. Pest Manage Sci 57, 289–300.
- Agust-Brisach C, Gramaje D, García-Jimenez J, Armengol J. 2013b. Detection of black-foot disease pathogens in the grapevine nursery propagation process in Spain. Eur. J. Plant Pathol. 137:103-112.
- Agustí-Brisach C, Armengol J. 2013. Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. Phytopathol. Mediterr. 52:245-261.
- Agustí-Brisach C, Gramaje D., García-Jimenez J, Armengol J. 2013a. Detection of black-foot and Petri disease pathogens in natural soils of grapevine nurseries and vineyards using bait plants. Plant Soil 364:5-13.
- Agustí-Brisach C, León M, García-Jiménez J, Armengol J. 2015. Detection of grapevine fungal trunk pathogens on pruning shears and evaluation of their potential for spread of infection. Plant Disease, v. 99, n. 7, p. 976-981.
- Agustí-Brisach C, López-Moral A, Raya-Ortega MC, Franco R, Roca-Castillo LF, Trapero, A. 2019. Occurrence of grapevine trunk diseases affecting the native cultivar Pedro Ximénez in southern Spain. Eur J Plant Pathol. 153: 599–625.
- Agustí-Brisach C, Mostert L, Armengol J. 2014. Detection and quantification of *Ilyonectria* spp. associated with black-foot disease of grapevine in nursery soils using multiplex, nested PCR and real-time PCR. Plant Pathol. 63:316-322.
- Aigoun-Mouhous W, Elena G, Cabral A, León M, Sabaou N, Armengol J. 2019. Characterization and pathogenicity of *Cylindrocarpon*-like asexual morphs associated with black foot disease in Algerian grapevine nurseries, with the description of *Pleiocarpon algeriense* sp. nov. Eur. J. Plant Pathol. 154, 887-901.
- Akgül DS. 2020. Comparison of different inoculation methods in the investigation of fungal trunk diseases in grapevines. MKU J Agric Sci 25, 924–931.
- Alaniz S, Abad-Campos P, García-Jiménez J, Armengol J. 2011. Evaluation of fungicides to control *Cylindrocarpon liriodendri* and *Cylindrocarpon macrodidymum* *in vitro*, and their effect during the rooting phase in the grapevine propagation process. Crop Protection 30, 489–494.
- Alaniz S, García-Jiménez J, Abad-Campos P, Armengol J. 2010. Susceptibility of grapevine rootstocks to *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum*. Sci. Hortic. 125, 305-308.
- Alaniz S, León M, Vicent A, García-Jiménez J, Abad Campos P, Armengol J. 2007. Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black foot disease of grapevine in Spain. Plant Disease, 91(9), 1187–1193.
- Alfonzo A, Conigliaro G, Torta L, Burruano S, Moschetti G. 2009. Antagonism of *Bacillus subtilis* strain AG1 against vine wood fungal pathogens. Phytopathol. Mediterr. 48, 155-158.
- Almança M, Abreu C, Scopel F, Benedetti M, Halleen F, Cavalcanti F. 2013. Evidências morfológicas da ocorrência de *Phaeoconiella chlamydospora* em videiras no Estado do Rio Grande do Sul. Embrapa Uva e Vinho-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).
- Almança MAK, Fiorentin J, Grohs, DS, Santos HP. 2021. Avaliação de uma metodologia para inoculação e caracterização *in vivo* da agressividade de fungos associados às doenças de tronco em videira. Boletim de pesquisa e

desenvolvimento 21: Embrapa uva e vinho. Disponível em <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/228278/1/BolPEsqDes-21.pdf>> Acesso em: 15 nov. 2022.

- Álvarez-Pérez JM, González-García S, Cobos R, Olego MA, Ibañez A, Díez-Galán A, Garzón-Jimeno E, Coque JJR. 2017. Use of endophytic and rhizospheric actinobacteria from grapevine plants to reduce nursery fungal infections that lead to young grapevine decline. *Appl. Environ. Microb.* 83, e01564-17.
- Alves MEB, Tonietto J. 2015. Condições meteorológicas e sua influência na safra vitícola de 2015 em regiões produtoras de vinhos finos do sul do Brasil. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 16p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 173). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/130800/1/ComunicadoTecnico-173.pdf>>. Acesso em: 23 nov. 2022.
- Amorim L, Rezende JAM, Bergamim Filho A. 2018. Manual de Fitopatologia. Volume 1: Princípios e Conceitos. In: Silva Junior & Behlau. Controle Químico. 5ª ed. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres, 573p.
- Amponsah NT, Jones E, Ridgway HJ, Jaspers MV. 2012. Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* dieback diseases of grapevines. *Pest management science*, v. 68, n. 5, p. 676-683.
- Araújo da Silva M, Correia KC, Barbosa MAG, Câmara MPS, Gramaje D, Michereff SJ. 2017. Characterization of *Phaeoacremonium* isolates associated with Petri disease of table grape in Northeastern Brazil, with description of *Phaeoacremonium nordesticola* sp. nov. *Eur. J. Plant Pathol.* 179:695-709.
- Armengol J, Vicent A, Torné L, Garcia-Figueres F, Garciajiménez J. 2001. Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea, Bologna*, v. 40, p. S325-S329.
- Armengol J. 2014. Fungal trunk pathogens in grapevine nurseries: current status and future. In: COST Action FA1303 Sustainable control of Grapevine trunk diseases Workshop.
- Aroca A, García-Figueres F, Bracamonte L, Luque J, Raposo R. 2006. A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 115(2), 195.
- Aroca A, Gramaje D, Armengol J, García-Jimenez J, Raposo R. 2010. Evaluation of grapevine nursery process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* 126:165-174.
- Ayres MR, Billones-Baaijens R, Savocchia S, Scott E, Sosnowski M. 2016. Susceptibility of pruning wounds to grapevine trunk disease pathogens. *Wine Vitic J.* 31, 48-50.
- Ayres MR, Wicks TJ, Scott ES, Sosnowski MR. 2017. Developing pruning wound protection strategies for managing *Eutypa* dieback. *Aust. J. Grape Wine Res.* 23, 103- 111.
- Baumgartner K, Rizzo DM. 2006. Relative resistance of grapevine rootstocks to *Armillaria* root disease. *Am. J. Enol. Viticult.* 57, 408–414.
- Berlanas C, Ojeda S, López-Manzanares B, Andrés-Sodupe M, Bujanda R, MartínezDiz MP, Díaz-Losada E, Gramaje D. 2020. Occurrence and diversity of black-foot disease fungi in symptomless grapevine nursery stock in Spain. *Plant Dis.* 104, 94-104.

- Bertsch C, Ramírez-Suero M, Magnin-Robert M, Larignon P, Chong J, Abou-Mansour E, Spagnolo A, Clement C, Fontaine F. 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, v. 62, n. 2, p. 243-265.
- Bester W, Crous P, Fourie P. 2007. Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Australasian Plant Pathology*, v. 36, n. 1, p. 73-77.
- Booth C. 1966. The Genus *Cylindrocarpon*. *Mycological Papers* 104, 1-54.
- Brambatti F. 2019. Técnicas de desinfecção combinadas ou não com tratamento com água quente sobre o fungo *Phaeomoniella chlamydospora* e sobre estacas de videiras infectadas com o patógeno. Tese (Instituto Biológico) Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo, Brasil.
- Brasil. Decreto n. 10.833 de 07 de outubro 2021. Altera o Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. Disponível em < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/ato2019-2022/2021/decreto/D10833.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2019-2022/2021/decreto/D10833.htm)>. Acesso em: 27 nov. 2022.
- Brasil. Decreto n. 4.074 de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/2002/d4074.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm)>. Acesso em: 27 nov. 2022.
- Brasil. Decreto n. 5.981 de 06 de dezembro de 2006. Dá nova redação e inclui dispositivos ao Decreto no 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. Disponível em < [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Ato2004-2006/2006/Decreto/D5981.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Ato2004-2006/2006/Decreto/D5981.htm)>. Acesso em: 27 nov. 2022.
- Brasil. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários - AGROFIT. 2003. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 10 nov. 2022.
- Brayford D. 1992. *Cylindrocarpon*. In *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. L. L. Singleton, J. D. Mihail & C. M. Rush (eds.). American Phytopathological Society, St. Paul, 103-106.
- Cabral A, Groenewald J Z, Rego C, Oliveira H, Crous PW. 2011a. *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. *Mycological Progress*, pp. 1-34. doi:10.1007/s11557-011-0777-7.

- Cabral A, Rego C, Nascimento T, Oliveira H, Groenewald JW, Crous P. 2011b. Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. Fungal Biology doi:10.1016/j.funbio.2011.09.010.
- Calzarano F, Di Marco S, Cesari A. 2004. Benefit of fungicide treatment after trunk renewal of vines with different types of esca necrosis. Phytopathologia Mediterranea 43,116–124
- Calzarano F, Di Marco S. 2018. Further evidence that calcium, magnesium and seaweed mixtures reduce grapevine leaf stripe symptoms and increase grape yields. Phytopathologia Mediterranea 57, 459-471.
- Calzarano F, S Di Marco, V D'Agostino, S Schiff, L. Mugnai. 2014. Grapevine leaf stripe disease symptoms (esca complex) are reduced by a nutrients and seaweed mixture. Phytopathologia Mediterranea 53, 543-558.
- Calzarano F., F. Osti, V. D'Agostino, A. Pepe, and S. Di Marco, 2017. Mixture of calcium, magnesium and seaweed affects leaf phytoalexin contents and grape ripening on vines with grapevine leaf stripe disease. Phytopathologia Mediterranea 56, 445–457.
- Camargo UA, Tonietto J, Hoffmann A. 2011. Progressos na viticultura brasileira. Rev Bras Frut. 33(1):144-149.
- Camargo UA. 2003. Espécies e cultivares. In: Kuhn GB. (Ed.). Uva para processamento. Produção. Aspectos Técnicos. Bento Gonçalves: Embrapa Informação Tecnológica, p.134.
- Cardoso M, Ines D, Cabral A, Rego C, Oliveira H. 2013. Unrevealing inoculum sources of black foot pathogens in a commercial grapevine nursery. Phytopathol. Mediterr. 52:298-312.
- Cardoso MN. 2011. Detecção de fungos do género *Ilyonectria* em viveiro vitícola. Dissertação (Engenharia Agronómica) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- Carlucci A, Lopes F, Mostert L, Halleen F, Raimondo ML. 2017. Occurrence fungi causing black foot on young grapevines and nursery rootstock plants in Italy. Phytopathol. Mediterr. 56, 10-39.
- Cavalcanti FR, Bueno CJ, Almança MAK. 2013. Declínio e Morte de Plantas de Videira. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho (Embrapa Uva e Vinho, Documentos 82).
- Cavalcanti FR, Garrido LR. 2015. Produção integrada de uva para processamento: Controle de doenças. Brasília, DF: Embrapa v. 4, 85p.
- Chapuis L, Richard L, Dubos B. 1998. Variation in susceptibility of grapevine pruning wound to infection by *Eutypa lata* in south-western France. Plant Pathol. 47, 463-72.
- Chaverri P, Salgado C, Hirooka Y, Rossman AY, Samuels GJ. 2011. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. Studies in Mycology 68, 57-78.
- Chiarappa L. 2000. Summary report from the First International Workshop on Grapevine Trunk Diseases. Phytopathologia Mediterranea 39, 241-242.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard, 2nd ed, CLSI document M38-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

- Cloete M, Fischer M, Mostert L, Halleen F. 2015. Hymenochaetales associated with esca-related wood rots on grapevine with a special emphasis on the status of esca in South African vineyards. *Phytopathol. Mediterr.* 54, 299-312.
- Cobos R, Martin MT. 2008. Molecular characterisation of *Phaeomoniella chlamydospora* isolated from grapevines in Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*. v. 47, n. 1, p. 20-27.
- Cobos R, Mateos RM, Álvarez-Pérez JM, Olego MA, Sevillano, González-García S, Garzón-Jimeno E, Coqu, JJR. 2015. Effectiveness of natural antifungal compounds in controlling infection by grapevine trunk disease pathogens through pruning wounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6474-6483.
- Coletto TS, Nascimento T, Oliveira H. 2018. Interações entre fungos do pé negro da videira e do complexo da esca. *Revista de Ciências Agrárias*, 41(Especial): 82-91.
- Cooper M, Klonsky KM, De Moura, RL. 2012. Sample cost to establish vineyard and produce winegrapes (Cabernet Sauvignon) in the North Coast Region (Napa County). University of California Cooperative Extension.
- Correia KC, Câmara MPS, Barbosa MAG, Sales Jr R, Agustí-Brisach C, Gramaje D, León M, García-Jiménez J, Abad-Campos P, Armengol J, Michereff SJ. 2013. Fungal trunk pathogens associated with table grape decline in Northeastern Brazil. *Phytopathologia Mediterranea*, v. 52, n. 2, p. 380-387.
- Correia KC, Câmara MPS, Barbosa MAG, Sales Jr R, Agustí-Brisach C, Gramaje D, León M, García-Jiménez J, Abad-Campos P, Armengol J, Michereff SJ. 2012. Fungal species associated with trunk diseases of table grapes in Northeastern Brazil. *Phytopathologia Mediterranea, Bologna*, v. 51, n. 2, p. 427.
- Costa B, Pipi B, Kaminski TFA, Andrade SF, Fuentefria AM. 2020. In vitro antidermatophytic synergism of double and triple combination of clioquinol with ciclopirox and terbinafine. *Mycoses*, 00:1-9
- Crous PW, Gams, W. 2000. *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea* v. 39, p. 112-118.
- Crous PW, Swart L, Coertz, S. 2001. The effect of hot-water treatment on fungi occurring in apparently healthy cuttings. *Phytopathol. Mediterr.* 40, S464-S466.
- Czermainski ABC. *Árvore do Conhecimento: uva para processamento*. 2021. Embrapa Uva e Vinho. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva\\_para\\_processamento/arvore/CONT000g5f8cou802wx5ok0bb4szwyx060i6.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva_para_processamento/arvore/CONT000g5f8cou802wx5ok0bb4szwyx060i6.html)>. Acesso em: 25 nov. 2022.
- Daraignes L, Gerbore J, Yacoub A, Dubois L, Romand C, Zekri O, Roudet J, Chambon P, Fermaud M. 2018. Efficacy of *P. oligandrum* affected by its association with bacterial BCAs and rootstock effect in controlling grapevine trunk diseases. *Biol. Control* 119, 59-67.
- De La Fuente M, Fontaine F, Gramaje D, Armengol J, Smart R, Nagy ZA, Borgo M, Rego C, Corio-Costet MC. 2016. Grapevine Trunk Diseases. A review. Paris, Fr: OIV Publications. Disponível em: <http://www.oiv.int/public/medias/4650/trunkdiseases-oiv-2016.pdf>. Acesso em: 10 out. 2022.
- Decoin M. 2001. Grapevine products: news on withdrawals and restrictions. *Phytoma* 543, 28-33.
- Del Frari G, Cabral A, Nascimento T, Boavida Ferreira R, Oliveira H. 2019. *Epicoccum layuense* a potential biological control agent of esca-associated fungi in grapevine.

PLoS ONE 14, e0213273.

- Del Frari G, Costa J, Oliveira H, Boavida Ferreira R. 2018. Endotherapy of infected grapevine cuttings for the control of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium minimum*. *Phytopathologia Mediterranea*. 57 (3), 439-448.
- Di Marco S, Osti F, Calzarano F, Roberti R, Varonesi A, Amalfitano C. 2011. Effect of the application of fosetyl-aluminium, in formulations for downy mildew control, on grapevine towards “esca” and associated fungi. *Phytopathol. Mediterr.* 50:S285-S299.
- Di Marco S, Osti F, Cesari A. 2004. Experiments on the Control of Esca by *Trichoderma*. *Phytopathologia Mediterranea*, v. 43, n. 1, p. 108-115.
- Díaz GA, Latorre BA. 2013. Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against pathogens associated with grapevine trunk diseases in Chile. *Crop Protection*. 46, 106-112.
- Dixit RB, Vanparia SF, Patel TS, Jagani CL, Doshi HV, Dixit BC. 2010. Synthesis and antimicrobial activities of sulfonohydrazide substituted 8-hydroxyquinoline derivative and its oxinates. *Appl Organometal Chem*. 24: 408–413.
- Dubrovsky S, Fabritius AL. 2007. Occurrence of *Cylindrocarpon* spp. in nursery grapevines in California. *Phytopathologia Mediterranea*, 46(1), 84–86.
- Edwards J, Pascoe IG. 2004. Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. *Australas. Plant Pathol.* 33:273-279.
- Elena G, Luque J. 2016. Seasonal Susceptibility of Grapevine Pruning Wounds and Cane Colonization in Catalonia, Spain Following Artificial Infection with *Diplodia seriata* and *Phaeomoniella chlamydospora*. *Plant Dis.* 100, 1651-1659.
- Epstein L, Sukhwinder K, VanderGheynst JS. 2008. *Botryosphaeria*-related dieback and control investigated in non-coastal California grapevines. *Calif. Agric.* 62, 161-166.
- Eskalen A, Feliciano J, Gubler WD. 2007. Susceptibility of Grapevine Pruning Wounds and Symptom Development in Response to Infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. *Plant Disease* 91(9), 1100–1104.
- Eskalen A, Gubler WD, Khan A, 2001. Rootstock susceptibility to *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. *Phytopathol. Mediterr.* 40, S433-S438.
- Feliciano AJ, Eskalen A, Douglas W. 2004. Differential susceptibility of three grapevine cultivars to *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* in California. *Phytopathologia Mediterranea*. 43, 66–69.
- Ferreira ABM, Leite LG, Harakava R, Padovani CR, Bueno CJ. 2017. Incidência da doença de Petri na videira Niagara Rosada no estado de São Paulo – Brasil. *Summa phytopathologica*. v. 43, n. 2, p.124-131.
- Ferreira ABM, Migotto BC, Leite LG, Firmino AC, Furtado EL, Padovani, CR, Bueno CJ. 2013. Movimentação de *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phialemonium dimorphosporum* em Niágara rosada no estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica, Botucatu*, v. 39, 2013b. Suplemento. 1 CD-ROM.
- Ferreira JHS, Van Dyk PS, Calitz FJ. 1999. Slow dieback of grapevine in South Africa: stress-related predisposition of young vines for infection by *Phaeoacremonium chlamydosporum*. *South African Journal Enology and Viticulture, Dennesig*, v. 20, n. 2, p. 43–46.
- Fischer M. 2002. A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca

- of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). Mycol. Prog. 1:315-324.
- Fourie P, Halleen F. 2001. Diagnosis of fungal diseases and their involvement in dieback disease of young vines. Wynboer, 149, 19–23.
- Fourie P, Halleen F. 2004. Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. Australasian Plant Pathology, 33(2), 313–315.
- FRAC Brasil- Comitê de Ação a Resistência a Fungicidas. 2022. Disponível em <<https://www.frac-br.org>>. Acesso em 20 abr. 2022.
- Fraser RSS, Creanor J. 1975. The Mechanism of Inhibition of ribonucleic acid synthesis by 8-hydroxyquinoline and the antibiotic lomofungin. Biochem. J.,147, 401–410.
- Fu HG, Li ZW, Hu XX, Si SY, You XF, Tang S, Wang YX, Song DQ. 2019. Synthesis and biological evaluation of quinoline derivatives as a novel class of broad-spectrum antibacterial agents. Molecules 24, 548.
- Garrido L. Gava R. 2014. Manual de doenças fúngicas da videira. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho.
- Garrido LDR, Sônego OR, Gomes VN. 2004. 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, 2004.
- Garrido LDR, Sônego OR, Urban AF. 2004. *Cylindrocarpon destructans* causal agent of grapevine black-foot in Rio Grande do Sul. Fitopatologia Brasileira, 29(5), 548–550.
- Gonzalez M, Tello M. 2011. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. Fungal Divers. 47:29-42.
- Gramaje D, Armengol J. 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. Plant Dis. 95, 1040-1055.
- Gramaje D, Aroca A, Raposo R, García-Jimenez J, and Armengol J. 2009. Evaluation of fungicides to control Petri disease pathogens in the grapevine propagation process. Crop Prot. 28:1091-1097.
- Gramaje D, Baumgartner K, Halleen F, Mostert L, Sosnowski MR, Úrbez-Torres JR, and Armengol, J. 2016. Fungal trunk diseases: a problem beyond grapevines? Plant Pathology. 65, 355-356.
- Gramaje D, Di Marco S. 2015. Identifying practices likely to have impacts on grapevine trunk disease infections: a European nursery survey. Phytopathol. Mediterr. 54:313-324.
- Gramaje D, Mostert L, Armengol J. 2011. Characterization of *Cadophora luteo-olivacea* and *C. melinii* isolates obtained from grapevines and environmental samples from grapevine nurseries in Spain. Phytopathol. Mediterr. 50:S112-S126.
- Gramaje D, Mostert L, Groenewald JZ, Crous PW. 2015. *Phaeoacremonium*: from esca disease to phaeohyphomycosis. Fungal Biol. 119, 759-783.
- Gramaje D, Urbez-Torres JR, Sosnowski MR. 2018. Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. Plant Disease. 102(1), 12-39.
- Gramaje D, García-Jiménez J, Armengol J. 2010. Field Evaluation of Grapevine Rootstocks Inoculated with Fungi Associated with Petri Disease and Esca. Am. J.



- Enol. Vitic. 61, 512-520.
- Grasso S, Magnano Di San Lio G. 1975. Infezioni di *Cylindrocarpon obtusisporum* supiante di vite in Sicilia. *Vitis* 14, 38-39.
- Grasso S. 1984. Infezioni de *Fusarium oxysporum* e di *Cylindrocarpon destructans* associate a una moria di giovani piante di vite in Sicilia. *Informatore Fitopatologico* 34, 59-63.
- Guan X, Essakhi S, Laloue, H, Nick, P, Bertsch, C, Chong, J., 2016. Mining new resources for grape resistance against Botryosphaeriaceae: a focus on *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*. *Plant Pathol.* 65, 273-284.
- Gubler WD, Baumgartner K, Browne GT, Eskalen A, Rooney-Latham S, Petit E, Bayramian LA. 2004. Root diseases of grapevines in California and their control. *Australas. Plant Pathol.* 33, 157-165.
- Haidar R, Roudet J, Bonnard O, Dufour MC, Corio-Costet MF, Fert M, Gautier T, Deschamps A, Fermaud M. 2016. Screening and modes of action of antagonistic bacteria to control the fungal pathogen *Phaeomoniella chlamydospora* involved in grapevine trunk diseases. *Microbiol. Res.* 192, 172-184.
- Halleen F, Crous PW, Petrini O. 2003. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved on the decline of young vines. *Australasian Plant Pathology* 32, 47-52.
- Halleen F, Fourie P. 2005. Protection of grapevine pruning wounds against fungal infections. *Phytopathologia Mediterranea*, v. 44, p. 117-118.
- Halleen F, Fourie P. 2016. An integrated strategy for the proactive management of grapevine trunk disease pathogen infections in grapevine nurseries. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 37, 104-114.
- Halleen F, Fourie PH, Crous PW. 2006a. A Review of Black Foot Disease of Grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 45(4), 55–67.
- Halleen F, Fourie PH, Crous PW. 2007. Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathol.* 56, 637-645.
- Halleen F, Fourie PH, Lombard PJ. 2010. Protection of grapevine pruning wounds against *Eutypa lata* by biological and chemical methods. *South African Journal of Enology and Viticulture*. v. 31, n. 2, p. 125-132.
- Halleen F, Schroers HJ, Groenewald JZ, Crous PW. 2004. Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology, Utrecht*, v. 50, p. 431-455. Número especial, pt. 2.
- Halleen F, Schroers HJ, Groenewald JZ, Rego C, Oliveira H, Crous PW. 2006b. *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevines. *Studies in Mycology* 55, 227-234
- Harbison-Price N, Ferguson SA, Heikal A, Tairaoa G, Hards K, Nakatani Y, Rennison D, Brimble MA, El-Deeb IM, Bohlmann L, McDevitt CA, von Itzstein M, Walker M J, Cook GM. 2020. Multiple bactericidal mechanisms of the zinc ionophore PBT2. *mSphere*, 5, e00157–20.
- Hassan WA, Haleem RA, Saido KA. 2013. Chemical control of black foot disease caused by *Ilyonectria radicola* on grapevine cuttings. *Mesopotamia J. of Agric.* 41(1), 448-456.
- Hernández HMA. 2018. Sensibilidad in vitro de *Phaeomoniella chlamydospora* a fungicidas utilizados en vid vinífera. MSc thesis (Escuela de Agronomía), Universidad de Talca, Chile.

- Hofstetter V, Buyck V, Croll D, Viret O, Couloux A, Gindro K. 2012. What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? *Fungal Divers.* 54: 51-67.
- Hu M-J, Cox KD, Schnabel G. 2016. Resistance to increasing chemical classes of fungicides by virtue of “selection by association” in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology.* 106(12):1513– 1520.
- Hunt J, Gale D, Harvey I. 2001. Evaluation of *Trichoderma* as bio-control for protection against wood-invading fungi implicated in grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea*, v. 40, p. 485-486.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2022. Censo Agropecuário. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producaagropecuaria/uva/br>>. Acesso em: 24 out. 2022.
- Jaspers M. 2001. Effect of fungicides, in vitro, on germination and growth of *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathol. Mediterr.* 40, S453–458.
- Jaspers MV, Bleach CM, Harvey IC. 2007. Susceptibility of grapevine rootstocks to *Cylindrocarpon* disease. *Phytopathol. Mediterr.* 46, 114.
- Joaquim AR, Gionbelli MP, Gosmann G, Fuentefria AM, Lopes MS, Andrade SF. 2021. Novel Antimicrobial 8-Hydroxyquinoline-Based Agents: Current Development, Structure-Activity Relationships, and Perspectives. *Journal of Medicinal Chemistry.* 64 (22), 16349-16379.
- Joaquim AR, Pippi B, Cesar MA, Rocha DA, Boff RT, Staudt KJ, Ruaro TC, Zimmer AR. 2019. Rapid tools to gain insights into the interaction dynamics of new 8-hydroxyquinolines with few fungal lines. *Chem Biol Drug Des.* 93, 1186–1196.
- John S, Wicks T, Hunt J, Scott E. 2008. Colonisation of grapevine wood by *Trichoderma harzianum* and *Eutypa lata*. *Australian journal of grape and wine research*, v. 14, n. 1, p. 18-24.
- Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. 2004. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(3):693-715.
- Ke-Xiang G, Xiao-Guang L, Run-Fang G, Bao-Jian G, Tian-Bo Z. 2001. Mycoparasitism of *Trichoderma* spp. on five plant pathogenic fungi. *Journal of Shandong Agricultural University*, v. 33, n. 1, p. 37-42.
- Kotze C, Van Niekerk JM, Mostert L, Halleen F, Fourie P. 2011. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathologia Mediterranea* 50, S247–S263.
- Kotze C, Van Niekerk JM, Halleen F, Fourie PH. 2009. Identifying potential biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. 6th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases. Florence, Italy. *Phytopathologia Mediterranea.* p.184-184.
- Lanna Filho R, Ferro HM, De Pinho RSC. 2010. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 4, n. 2.
- Larignon P, Darné G, Ménard E, Desaché F, Dubos B. 2008. Comment agissait l'arsénite de sodium sur l'esca de la vigne? *Prog. Agric. Vitic.* 125, 642-651.
- Larignon P, Dubos B. 2000. Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. *Phytopathol. Mediterr.* 39, 184-189.
- Laukart N, Edwards J, Pascoe IG, Nguyen NK. 2001. Curative treatments trialled on young grapevines infected with *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathol. Mediterr.* 40:S459-S463.

- Lawrence D, Galarneau E, Travadon R, Baumgartner K. 2016. Water stress exacerbates the severity of *Botryosphaeria* dieback in grapevines infected by *Neofusicoccum parvum*. American Phytopathological Society Meeting. Tampa, Florida. Abstract 12-O.
- Lawrence DP, Nouri MT, Trouillas FP. 2019. Taxonomy and multi-locus phylogeny of *Cylindrocarpon*-like species associated with diseased roots of grapevine and other fruit and nut crops in California. *Fungal Syst. Evol.* 4, 59-75.
- Lazzarotto JJ, Taffarel JC, Monteiro R. 2016. Caracterização e análise de aspectos sociais, tecnológicos e econômico-financeiros da viticultura gaúcha e catarinense. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho (Documentos 97). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/144833/1/Doc97.pdf>. Acesso em: 30 de out. 2022
- Lecomte P, Bailey DJ. 2011. Studies on the infestation by *Eutypa lata* of grapevine spring wounds. *Vitis* 50, 35-41.
- Leroch M, Kretschmer M, Hahn M. 2011. Fungicide resistance phenotypes of *Botrytis cinerea* isolates from commercial vineyards in South West Germany. *Journal of Phytopathology.* 159(1):63–65.
- Machado DFM, Parzianello FR, Silva ACFD, Antonioli ZI. 2012. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 35, n. 1, p. 274-288.
- Maluta DR, Larignon P. 1991. Pied-noir: Mieux vaut prevenir. *Vitic.* 11, 71-72.
- MAPA- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2012. Manual de procedimentos para registro de agrotóxicos. Coordenação geral de agrotóxicos. 68p. Disponível em < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/arquivos/manual-de-procedimentos-para-registro-de-agrotoxicos.pdf/view>>. Acesso em 01 nov. 2022.
- Marraschi R. 2019. Caracterização de *Phaeomoniella chlamydospora* de Videiras do Brasil. Tese (Doutorado em Agronomia- Proteção de plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Unesp, Botucatu.
- Martinez-Diz MDP. 2020. Advances towards integrated management of fungal grapevine trunk diseases. Tese (Advanced Biotechnology) Universidade da Conuña-UDC, Coruña, Spain.
- Matturi ST, Stenton H. 1964. Distribution and status in the soil of *Cylindrocarpon* species. *Transactions of the British Mycological Society* 47, 577-587.
- Mello LMR, Machado CAE. 2021. Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2020. Comunicado Técnico 223: EMBRAPA. 18p.
- Mendiburu FA. 2022. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.3-5. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.
- Moller WJ, Kasimatis J. 1980. Protection of grapevine pruning wounds from *Eutypa* dieback. *Plant Dis.* 64, 278-280.
- Mondello V, Philippe Larignon P, Armengol J, Kortekamp A, Vaczy K, Prezma F, Serrano E, Rego C, Mugnai L, Fontaine F. 2018a. Management of grapevine trunk diseases: knowledge transfer, current strategies and innovative strategies adopted in Europe. *Phytopathologia Mediterranea* 57, 3, 369–383.
- Mondello V, Songy A, Battiston E, Pinto C, Coppin C, Trotel-Aziz P, Fontaine F. 2018b. Grapevine trunk diseases: a review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Dis.* 7, 1189-1217.
- Mondello V, Spagnolo A, Larignon P, Clément C, Fontaine F. 2019. Phytoprotection

- potential of *Fusarium proliferatum* for control of Botryosphaeria dieback pathogens in grapevine. *Phytopathol. Mediterr.* 58, 293-306.
- Mostert L, Groenewald JZ, Summerbell RC, Gams W, Crous PW. 2006. Taxonomy and pathology of Togninia (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. *Stud. Mycol.* 54:1-113.
- Mounier E, Boullisset F, Cortes F, Cadiou M. 2016. Esquive WP limits development of grapevine trunk diseases and safeguards the production potential of vineyards. Pages 160-170. In: *Biocontrol of Major Grapevine Diseases: Leading Research* (S. Compant and F. Mathieu, ed.), CABI, Wallingford, U.K.
- Mounier E, Cortes F, Cadiou M, Pajot E. 2014. The benefits of *Trichoderma atroviride* I-1237 for the protection of grapevines against trunk diseases: from the nursery to the vineyard. *Phytopathol. Mediterr.* 53:591-592.
- Moyo P, Allsopp E, Roets F, Mostert L, Halleen F. 2014. Arthropods vector grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathology* 104:1063-1069.
- Mugnai L, Graniti A, Surico G. 1999. Esca (Black Measles) and Brown Wood Streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease*. v. 83, p. 404-418.
- Mugnai L. Editors note and dedication. *Phytopathologia Mediterranea*. 2011. 50S: S3-S4.
- Munkvold GP, Marois JJ. 1993. Efficacy of natural epiphytes and colonisers of grapevine pruning wounds for biological control of *Eutypa* dieback. *Phytopathology* 83, 624- 629.
- Mutawila C, Fourie PH, Halleen F, Mostert L. 2011. Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. *Phytopathol. Mediterr.* 50, S264-S276.
- Mutawila C, Halleen F, Mostert L. 2015. Development of benzimidazole resistant *Trichoderma* strains for the integration of chemical and biocontrol methods of grapevine pruning wound protection. *BioControl* 60, 19387-19399.
- Mutawila C, Halleen F, Mostert L. 2016. Optimisation of time of application of *Trichoderma* biocontrol agents for protection of grapevine pruning wounds. *Aust. J. Grape Wine Res.* 22, 279-287.
- Nascimento T, Rego C, Oliveira H. 2007. Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. *Phytopathol. Mediterr.* 46, 218-224.
- O’Gorman DT, Haag P, Sholberg PL. 2009. News diseases causing decline of wine grapes in the Okanagan valley. In: *Canadian plant disease survey*. The Canadian Phytopathological Society, 90, 140–143.
- Odds FC. 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.*; 52:1.
- Olaleye O, Raghunand TR, Bhat S, Chong C, Gu P, Zhou J, Zhang Y, Bishai WR, Liu JO. 2011. Characterization of clioquinol and analogues a novel inhibitors of methionine aminopeptidases from. *Tuberculosis*, 91, S61–S65.
- Oliveira H, Rego M C, Nascimento T. 2004. Decline of young grapevines caused by fungi. *Acta Horticulturae*, 652, 295–304.
- Oliveri V, Vecchio G. 2016. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: a structural perspective. *Eur J Med Chem*. v. 120, p. 252-274.
- Pajot E, Mounier E, Blal B, Cortes F, Coutant A. 2012. Selection steps of the *Trichoderma atroviride* strain i-1237, and some practical results of the development of the fungi within the cankers diseases of grapevine and soil borne

- diseases of vegetables. In: Barker, E.A. and Clement, C. IOBC, Reims, 24–27 Working Group, Biological Control of Plant Pathogens: Biocontrol of Plant Pathogens in Sustainable Agriculture. Book of Abstracts. Universite de Reims, Reims, Champagne-Ardenne, France, p. 40.
- Paolino M, Brindisi M, Vallone A, Butini S, Campiani G, Nannicini C, Giuliani G, Anzini M, Lamponi S, Giorgi G, Sbardella D, Ferraris DM, Marini S, Coletta M, Palucci I, Mine Fu HG, Li, ZW, Hu XX, Si SY, You XF, Tang S, Wang YX, Song DQ. 2019. Synthesis and biological evaluation of quinoline derivatives as a novel class of broad-spectrum antibacterial agents. *Molecules*, 24, 548.
- Peña N, Antón A, Kamilaris A, Fantke P. 2018. Modeling ecotoxicity impacts in vineyard production: Addressing spatial differentiation for copper fungicides. *Science of the Total Environment*. 616:796–804.
- Pertot I, D Prodorutti, A Colombini, L Pasini. 2016. *Trichoderma atroviride* SC1 prevents *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* infection of grapevine plants during the grafting process in nurseries. *BioControl* 61(3), 257–267. <http://doi.org/10.1007/s10526-016-9723-6>.
- Pertot I, Oliveira Longa CM, Savazzini F, Michelon F, Prodorutti D, Pellegrini C, Ferrari A. 2009. *Trichoderma atroviride* SC1 for biocontrol of fungal diseases in plants IOBC-WPRS Bulletin 43, 185–188.
- Petit E, Barriault E, Baumgartner K, Wilcox WF, Rolshausen PE. 2011. *Cylindrocarpon* species associated with black-foot of grapevine in northeastern United States and southeastern Canada. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62, 177–183.
- Petit E, Gubler WD. 2005. Characterization of *Cylindrocarpon* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. *Plant Disease*, 89, 1051–1059.
- Petri L. 1912. Osservazioni sopra le alterazioni del legno della vite in seguito a ferite. *Staz. Sper. Agric. Ital.* 45:501-547.
- Pinto PSGC. 2010. Doença de Petri da videira: avaliação da eficácia de fungicidas na protecção de feridas de poda. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônômica) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Pinto R, Rodrigues T, Nascimento T, Rego C, Oliveira H. 2005. Microflora associada ao declínio de plantas-mãe de porta-enxertos de videira. In: *A Produção Integrada e a Qualidade e Segurança Alimentar*. 1:191-199.
- Pipi B, Reginatto P, Machado GRM, Bergamo VZ, Dalla Lana DF, Teixeira ML, Franco LL, Alves JR, Andrade SF, Fuentefria AM. 2017. Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Hits for Antifungal Drug Design. *Medical Mycology*. v. 55, nº. 7, p. 763-773.
- Pippi B, Joaquim AR, Lopes W, Machado GRM, Bergamo VZ, Giuliani L., Abegg MA, Cruz L, Vainstein MH, Fuentefria AM, Andrade SF. 2019a. 8-Hydroxyquinoline-5-sulfonamides are promising antifungal candidates for the topical treatment of dermatomycosis. *Journal of Applied Microbiology*. 128(4), 1038-1049.
- Pippi B, Lopes W, Reginatto P, Silva F, Joaquim AR, Alves JR, Silveira GP, Vainstein MH, Andrade SF, Fuentefria AM. 2019b. New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 27, 41–48.
- Pitt W, Sosnowski M, Taylor A, Rujuan H, Quirk L, Hackett S, Somers A, Steel C, Savocchia S. 2010. Management of *Botryosphaeria* canker of grapevines. *Australian Viticulture-Practical Vineyard Management*, v. 14, n. 2, p. 52-56.

- Pitt WM, Sosnowski MR, Huang R, Qui Y, Steel CC, Savocchia S. 2012. Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* canker of grapevines. *Plant Dis.* 96, 1303-1308.
- Pottinger B, Steward A, Carpenter M, Ridgway HJ. 2002. Low genetic variation detected in New Zealand populations of *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*, v. 41, p. 199–211.
- Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 2013. 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Des., Dev. Ther.*, 7, 1157–1178.
- Quaglia M, Covarelli L, Zizzerini A. 2009. Epidemiological survey on esca disease in Umbria, central Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, Bologna, v. 48, n. 1, p. 84-91.
- Ravaz L. 1898. Sur le folletage. *Rev. Vitic.* 10:184-186.
- Ravaz L. 1909. Sur l'apoplexie de la vigne. *Progres. Agric. Vitic.* 30:547-579.
- Reggiori F, Aloï C, Baleani M, Benanchi M, Bigot G, Bortolotti P, Bossio D, Cotromino M, Di Marco S, Faccini F, Freccero A, Osti F, Montermini A, Nannini R, Mugnai L. 2014. Remedier® (*Trichoderma asperellum* e *Trichoderma gamsii*): nuova opportunita di contenimento del complesso del mal dell'esca della vite. Risultati di quattro anni di sperimentazione in Italia [Remedier® (*Trichoderma asperellum* e *Trichoderma gamsii*). *Atti Giornate Fitopatologiche* 2, 363–372.
- Rego C, Farropas L, Nascimento T, Cabral A, Oliveira H. 2005. Black foot of grapevine: sensitivity of *Cylindrocarpon destructans* to fungicides. *Phytopathologia Mediterranea* 44, 118-119.
- Rego C, Nascimento T, Oliveira H. 2001. Characterization of *Cylindrocarpon destructans* isolates from grapevine in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S343-S350.
- Rego C, Oliveira H, Carvalho A, Philips A. 2000a. Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*, Bologna, v. 39, n. 1, p. 76-79.
- Rego C, Oliveira H, Carvalho A, Phillips A. 2000b. Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal [*Vitis vinifera* L.]. *Phytopathologia Mediterranea (Italy)*, 39, 76–79.
- Rego M. 1994. Nova e grave micose da videira em Portugal. Agente responsável: *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholten. *Publicação do Laboratório de Patologia Vegetal Veríssimo de Almeida*, 67, 1–4.
- Reis P, Magnin-Robert T, Nascimento A, Spagnolo E, Abou- Mansour F, Cristina C, Clément C, Rego C, Fontaine F. 2016. "Reproducing *Botryosphaeria* dieback foliar symptoms in a simple model system". *Plant Disease* 100, 1071-1079.
- Reis P, Pierron R, Larignon P, Lecomte P, Abou-Mansour E, Farine S, Bertsch C, Jacques A, Trotel-Aziz P, Rego C, Fontaine F. 2009. Vitis methods to understand and develop strategies for diagnosis and sustainable control of grapevine trunk diseases. *Phytopathology*, v. 109, n. 6, p. 916-931.
- Retief E, McLeod A, Fourie PH. 2006. Potential inoculum sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in South African grapevine nurseries. *Eur. J. Plant Pathol.* 115:331-339
- Rezgui A, Ben Ghnaya-Chakroun A, Vallance J, Bruez E, Hajlaoui MR, SadfiZouaoui, N, Rey P. 2016. Endophytic bacteria with antagonistic traits inhabit the wood tissues of grapevines from Tunisian vineyards. *Biol. Control* 99, 28-37.

- Ribas AD, Del Ponte EM, Dalbem AM, Dalla-Lana D, Bundchen C, Donato RK, Schrekker HS, Fuentefria AM. 2016. Imidazolium salts with antifungal potential for the control of head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum*. *Journal of Applied Microbiology*. 121, 445-452.
- Rolshausen PE, Baumgartner K. 2015. *Cadophora* species associated with wooddecay of grapevine in North America. *Fungal Biol*. 119, 53-66.
- Rolshausen PE, Úrbez-Torres, S, Rooney-Latham A, Eskalen RJ, Smith WD, Gubler. 2010. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *American Journal of Enology and Viticulture* 61(1), 113–119.
- Rooney-Latham S, Eskalen A, Gubler WD. 2005. Occurrence of *Togninia minima* perithecia in esca-affected vineyards in California. *Plant Dis*. 89, 867-871
- Rufato L, Marcon Filho JL, Brighenti AF, Bogo A, Kretzschmar AA. 2021. A cultura da videira: Vitivinicultura de Altitude- Série Fruticultura. Florianópolis: UDESC, 2021. (Série Fruticultura). 577 p.
- Rumbos I, Rumbou A. 2001. Fungi associated with esca and young grapevine decline in Greece. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(3), 330–335.
- Rusin C, Oliveira MR, Deus CNS, Nondillo A, Almança MAK. 2015. Presença de fungos relacionados a doenças de tronco e de pérola-da-terra em plantas de videira com sintoma de declínio In: Encontro Nacional Sobre Fruticultura De Clima Temperado, Fraiburgo. Anais... Caçador: Epagri, v. 2, p.108.
- Rusin C. 2017. Agentes biológicos, extratos vegetais e produtos químicos no controle de fungos associados a doenças de tronco da videira. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava-PR.
- Russi A, Almança MAK, Grohs DS, Schwambach J. 2020. Biocontrol of black foot disease on grapevine rootstocks using *Bacillus subtilis* strain F62. *Tropical Plant Pathology*. 45, 103-111.
- Santos RF, Blume E, Junges E, Rego MCNF. 2013. Atividade antifúngica de produtos alternativos sobre *Ilyonectria liriodendri* e *Phaeoconiella chlamydospora*. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia*. 9(17), 3765-3774.
- Santos RF, Heckler LI, Lazarotto M, Garrido .R, Rego C, Blume E. 2016. *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* for control of *Dactylonectria macrodidyma* in grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*. 55, 293–300.
- Sashidhara KV, Kumar A, Bhatia G, Khan MM, Khanna AK, Saxena JK. 2009. Antidyslipidemic and antioxidative activities of 8-hydroxyquinoline derived novel keto-enamine Schiff's bases. *Eur J Med Chem*. v. 44, p. 1813-1818.
- Scheck HJ, Vasquez SJ, Gubler WD. 1998. First report of blackfoot disease, caused by *Cylindrocarpon obtusisporum*, of grapevine in California. *Plant Disease, Saint Paul*, v. 82, n. 4, p. 448.
- Serra S, Mannoni MA, Ligios V. 2008. Studies on the susceptibility of pruning wounds to infection by fungi involved in grapevine wood diseases in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 47(3), 234–246.
- Silva F, De ASE, Azevedo CA. 2016. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *Afr. J. Agric. Res*, v.11, n.39, p.3733-3740.
- Silva MA, Correia KC, Barbosa MAG, Câmara MPS, Gramaje D, Michereff SJ. 2017. Characterization of *Phaeoacremonium* isolates associated with Petri disease of table grape in Northeastern Brazil, with description of *Phaeoacremonium nordesticola* sp. nov. *European Journal of Plant Pathology*, v. 149, p. 695-709.

- Smetham G, Ades P, Péros J, Ford R. 2010. Genetic structure of the grapevine fungal pathogen *Phaeomoniella chlamydospora* in south-eastern Australia and southern France. *Plant Pathology*. v. 59, p. 736–744.
- Sofia J, Trovão J, Portugal A, Carvalho HP, Mesquita N, Nascimento T, Rego C, Gonçalves MT. 2015. Molecular and phenotypic characterisation of *Phaeomoniella chlamydospora* isolates from the demarcated wine region of Dão (Portugal). *Phytopathologia Mediterranea*. v. 54, n.2; p. 403-413.
- Sosnowski M, McCarthy G. 2017. Economic impact of grapevine trunk disease management in Sauvignon Blanc vineyards of New Zealand. *Wine Vitic. J.* 32:42-48
- Sosnowski MR, Lardner R, Wicks TJ, Scott ES. 2007. The influence of grapevine cultivar and isolate of *Eutypa lata* on wood and foliar symptoms. *Plant Disease.*, 91, 924-931.
- Sosnowski MR, Loschiavo AP, Wicks TJ, Scott ES. 2013. Evaluating treatments and spray application for the protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Plant Disease*. 97, 1599-1604.
- Sosnowski MR, Mundi DC. 2019. Pruning Wound Protection Strategies for Simultaneous Control of *Eutypa* and *Botryosphaeria* dieback in New Zealand. *Plant Dis.* 103, 519-525.
- Souza L, Chaves MA, Joaquim AR, Gionbelli MP, Gava A, Fiorentin J, Ficagna E, Almança MAK, Teixeira ML, Andrade SF, Fuentefria AM. 2020. The efficacy of 8-hydroxyquinoline derivatives in controlling the fungus *Ilyonectria liriodendri*, the causative agent of black foot disease in grapevines. *Journal of Applied Microbiology*. 131, 1440-1451.
- Spinosi J, Févotte J, Vial G. 2009. Éléments techniques sur l'exposition professionnelle aux pesticides arsenicaux. Matrice cultures - expositions aux pesticides arsenicaux. Institut de veille sanitaire, Saint-Maurice, France.
- Spolti P, Jorge BC, Del Ponte EM. 2012. Sensitivity of *Fusarium graminearum* causing head blight of wheat in Brazil to tebuconazole and metconazole fungicides. *Tropical Plant Pathology*. 37(6), 419-423.
- Strydom S. 2019. Pruning wound protection of rootstock mother vines. MSc thesis (Faculty of Agricultural Science) Stellenbosch University, Stellenbosch, South Africa.
- Surico GL, Mugnai L, Marchi G. 2006. Older and more recent observations on esca: a critical overview. *Phytopathologia Mediterranea*, Bologna, v. 45, p. S68-S86.
- Sweetingham MW. 1983. Studies on the nature of the pathogenicity of soil-borne *Cylindrocarpon* species. Ph. D. Thesis. University of Tasmania.
- Tello ML, Gramaje D, Gómez A, Abad-Campos P, Armengol J. 2020. Analysis of phenotypic and molecular diversity of *Phaeomoniella chlamydospora* isolates in Spain. *Journal of Plant Pathology*. v. 92, p. 195-203.
- Travadon R, Lawrence DP, Rooney-Latham S, Gubler WD, Wilcox WF, Rolshausen PE, Baumgartner K. 2015. Cadophora species associated with wooddecay of grapevine in North America. *Fungal Biol.* 119, 53-66.
- Trese AT, Ramsdell CD, Burton CL. 1982. Effects of winter and spring pruning and postinoculation cold weather on infection of grapevine by *Eutypa armeniaca*. *Phytopathology* 72, 438-440.
- Trotel-Aziz P, Abou-Mansour E, Courteaux B, Rabenoelina F, Clément C, Fontaine F,



- Aziz A. 2019. *Bacillus subtilis* PTA-271 Counteracts Botryosphaeria Dieback in Grapevine, Triggering Immune Responses and Detoxification of Fungal Phytotoxins. *Front. Plant Sci.* 10, 25.
- Trouillas, F.P., Úrbez-Torres, J.R., Gubler, W.D., 2010. Diversity of Diatrypaceous fungi associated with grapevine canker diseases in California. *Mycologia* 102, 319-336.
- Upadhyay J, Rana M, Juyal V, Bisht SS, Joshi R. 2020. Impact of Pesticide Exposure and Associated Health Effects. *Pesticides in Crop Production: Physiological and Biochemical Action*:69–88.
- Urbez-Torres JR, Battany M, Bettiga LJ, Gispert C, McGourty G, Roncoroni J, Smith RJ, Verdegaal P, Gubler, WD. 2010a. Botryosphaeriaceae species spore-trapping studies in California Vineyards. *Plant Dis.* 94:717-724.
- Urbez-Torres JR, Buez E, Hurtado J, Gubler WD. 2010b. Effect of temperature on conidial germination of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Plant Dis.* 94:1476-1484.
- Úrbez-Torres JR, Gubler WD. 2011. Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. *Plant Pathol.* 60, 261-270.
- Úrbez-Torres JR, Peduto, F, Smith RJ, Gubler WD. 2013. Phomopsis dieback: A grapevine trunk disease caused by *Phomopsis viticola* in California. *Plant Dis.* 97, 1571-1579.
- Van Niekerk JM, Calitz FJ, Halleen F, Fourie PH. 2010. Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens in South Africa. *Eur. J. Plant Pathol.* 127:375-390.
- Van Niekerk JM, F Halleen, PH Fourie. 2011. Temporal susceptibility of grapevine pruning wounds to trunk pathogen infection in South African grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 50(SUPPL.), 139–150.
- Viala P. 1926. Recherces sur les maladies de la vigne. Esca. *Ann. Epiphyt.* 12:5-108
- Waite H, Gramaje D, Whitelaw-Weckert M, Torley P, Hardie WJ. 2013. Soaking grapevine cuttings in water: a potential source of cross contamination by micro-organisms. *Phytopathol. Mediterr.* 52:359-368.
- Waite H, May P. 2005. The effects of hot water treatment, hydration and order of nursery operations on cuttings of *Vitis vinifera* cultivars. *Phytopathol. Mediterr.* 44:144-152
- Wangtrakuldee P, Byrd MS, Campos CG, Henderson MW, Zhang Z, Clare M, Masoudi A, Myler PJ, Horn JR, Cotter PA, Hagen TJ. 2013. Discovery of inhibitors of *Burkholderia pseudomallei* methionine aminopeptidase with antibacterial activity. *ACS Med. Chem. Lett.*, 4, 699–703.
- Whitelaw-Weckert MA, Nair NG, Lamont R, Alonso M, Priest MJ, & Huang R. 2007. Root infection of *Vitis vinifera* by *Cylindrocarpon liriodendri* in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 36, 403–406.
- Whitelaw-Weckert MA, Rahman, Appleby LM, Hall A, Clark AC, Waite H, Hardie J. 2013. Co-infection by Botryosphaeriaceae and *Ilyonectria* spp. fungi during propagation causes decline of young grafted grapevines. *Plant Pathology* 62, 1226–1237.
- Wilcox WF, Gubler WD, Uyemoto, JK. 2016. *Compendium of grape diseases, disorders, and pests*, 2nd ed. The American Phytopathological Society.
- Yin XD, Sun Y, Lawoe RK, Yang GZ, Liu YQ, Shang XF, Liu H, Yang YD, Zhu JK,

- Huang XL. 2019. Synthesis and anti-phytopathogenic activity of 8-hydroxyquinoline derivatives. *RSC Adv.* 9, 30087–30099.
- Zambolim L, Jesus Jr WC, Rodrigues FA. 2014. *O Essencial da Fitopatologia: Controle de Doenças de Plantas*. Viçosa, MG: UFV, DFP, 576p.
- Zhang ZH, Zhao HY, Shen Q, Qi PP, Wang XQ, Xu H, Di SS, Wang ZW. 2020. Highthroughput determination of fungicides in grapes using thin-film microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science.* 43(8):1558–1565.

## **9. ANEXOS**

### a. Anexo 1

Requerimentos para pleito do registro definitivo (Anexo II) e do registro especial temporário- RET (Anexo III), conforme o decreto 4.074/02, e atualizados de acordo com os decretos 5.981/06 e 10.833/21.

Brasília, DF, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2\_\_\_\_.

Assinatura(s) do(s) Representante(s) do Órgão Registrante

CERTIFICADO DE REGISTRO DE AGROTÓXICOS, PRODUTOS  
TÉCNICOS E AFINS DESTINADOS EXCLUSIVAMENTE PARA EXPORTAÇÃO

O (A) (órgão registrante), de acordo com o (Capítulo II - das competências), do Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, e a Lei nº 9.974, de 6 de junho de 2000, certifica que se encontra registrado o produto abaixo descrito, para uso em conformidade com os termos especificados.

## 1. Produto

1.1 marca comercial	1.2 nº do registro
1.3 país importador	1.4 forma de apresentação (produto técnico ou tipo de formulação)
1.5 composição em g/kg, g/L ou %	
· Ingrediente ativo: _____ · Outros ingredientes: _____	

## 2. Classe de uso

(herbicida, inseticida, fungicida etc.)
---

## 3. Titular do registro (razão social)

3.1 nome	3.2 nº do cnpj
3.3 endereço	3.4 bairro
3.5 cidade	3.6 uf   3.7 cep

## 4. Fabricante

4.1 nome	4.2 nº do cnpj
4.3 endereço	4.4 bairro
4.5 cidade	4.6 uf   4.7 cep

## 5. Formulador

5.1 nome	5.2 nº do cnpj
5.3 endereço	5.4 bairro
5.5 cidade	5.6 uf   5.7 cep

## 6. Ingrediente ativo

6.1 nome comum	6.2 classificação taxonômica
6.3 nome químico	6.4 grupo químico

Brasília, DF, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2\_\_\_\_.

Assinatura(s) do(s) Representante(s) do Órgão Registrante

## ANEXO II

## Requerimento de Registro

(encaminhar em duas vias)

O requerente a seguir identificado requer ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, da Saúde (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e do Meio Ambiente (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), com base no Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, a avaliação do produto abaixo especificado, para fins de ( ) registro ( ) reavaliação de registro, para o que presta as informações a seguir e junta o Relatório Técnico competente:

## 1. Requerente

1.1 nome		1.2 endereço eletrônico		
1.3 endereço		1.4 bairro		
1.5 cidade		1.6 uf	1.7 cep	
1.8 ddd	1.9 fone	1.10 fax	1.11 celular	1.12 cnpj/cpf

## 2. Representante legal (anexar documento comprobatório)

2.1 nome		2.2 endereço eletrônico		
2.3 endereço		2.4 bairro		
2.5 cidade		2.6 uf	2.7 cep	
2.8 ddd	2.9 fone	2.10 fax	2.11 celular	2.12 cnpj/cpf

## 3. Fabricante (repetir o quadro com os dados dos demais fabricantes, se houver)

3.1 nome		3.2 endereço eletrônico		
3.3 endereço		3.4 bairro		
3.5 cidade		3.6 uf	3.7 cep	3.8 país
3.9 ddd	3.10 fone	3.11 fax	3.12 celular	3.13 cnpj/cpf

## 4. Formulador (repetir o quadro com os dados dos demais formuladores, se houver)

4.1 nome		4.2 endereço eletrônico		
4.3 endereço		4.4 bairro		
4.5 cidade		4.6 uf	4.7 cep	4.8 país
4.9 ddd	4.10 fone	4.11 fax	4.12 celular	4.13 cnpj/cpf

## 5. Finalidade

<input type="checkbox"/> 5.1 produção	<input type="checkbox"/> 5.2 importação	<input type="checkbox"/> 5.3 exportação	<input type="checkbox"/> 5.4 manipulação
<input type="checkbox"/> 5.5 comercialização	<input type="checkbox"/> 5.6 utilização	<input type="checkbox"/> 5.7 outro: .....	

## 6. Classe de uso

<input type="checkbox"/> 6.1 herbicida	<input type="checkbox"/> 6.2 inseticida	<input type="checkbox"/> 6.3 fungicida	<input type="checkbox"/> 6.4 outro: .....
--	---	--	---

## 7. Modo de ação

<input type="checkbox"/> 7.1 sistêmico	<input type="checkbox"/> 7.2 contato	<input type="checkbox"/> 7.3 total	<input type="checkbox"/> 7.4 seletivo	<input type="checkbox"/> 7.5 outro: .....
--	--------------------------------------	------------------------------------	---------------------------------------	---

## 8. Ingrediente ativo (repetir o quadro com os dados dos demais Ingredientes ativos, se houver)

8.1 nome químico na grafia internacional (de acordo com a nomenclatura iupac)	
8.2 nome químico em português (iupac)	
8.3 nome comum (padrão iso, ansi, bsi)	8.4 nome comum em português
8.5 entidade que aprovou o nome em português	8.6 nº código no <i>chemical abstract service registry (cas)</i>
8.7 grupo químico em português (usar letras minúsculas)	8.8 sinonímia
8.9 fórmula bruta e estrutural	

## 9. Produto

9.1 marca comercial	
9.2 código ou nome atribuído durante fase experimental	9.3 forma de apresentação (tipo de formulação)

## 10. Embalagem

10.1 tipo de embalagem	10.2 material	10.3 capacid. de acondicionamento
------------------------	---------------	-----------------------------------

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2 \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura(s) do(s) Representante(s) Legal(ais)

Documentos a serem anexados ao Requerimento

## 11. Anexos

1. Relatório Técnico;
<ul style="list-style-type: none"> <li>Comprovante de que a empresa requerente está devidamente registrada nessa modalidade em órgão competente do Estado, do Distrito Federal ou do Município;</li> <li>Idem, relativamente ao(s) fabricante(s) estabelecido(s) no País;</li> <li>Idem, relativamente ao(s) formulador(es) estabelecido(s) no País;</li> <li>Documento comprobatório da condição de representante legal da empresa requerente;</li> <li><del>Certificado de análise física do produto;</del></li> <li>Certificado de análise física do produto; (<a href="#">Redação dada pelo Decreto nº 10.833, de 2021</a>).</li> <li><del>Quando existentes, informações sobre a situação do produto, registro, usos autorizados, restrições e seus motivos, relativamente ao País de origem;</del></li> <li>Quando existentes, informações e documentos sobre a situação do produto, o registro, os usos autorizados, as restrições e os seus motivos, relativamente ao País de origem; (<a href="#">Redação dada pelo Decreto nº 10.833, de 2021</a>).</li> <li><del>Informações sobre a existência de restrições ou proibições a produtos à base do mesmo ingrediente ativo e seus motivos, em outros países;</del></li> <li>Informações sobre a existência de restrições ou proibições a produtos à base do mesmo ingrediente ativo e seus motivos, em outros países; (<a href="#">Redação dada pelo Decreto nº 10.833, de 2021</a>).</li> </ul>
Descrição detalhada do(s) método(s) de desativação do produto, acompanhada de laudo técnico que indique o poder de redução dos componentes, com a identificação dos resíduos remanescentes e a entidade instalada no País apta a realização do processo.

OBS.: Os documentos devem ser apresentados no original, em cópia autenticada ou acompanhada do original para autenticação pelo órgão público que a receber.

Se o registro for de produto(s) técnico(s):

42 - Anexos - PRODUTOS TÉCNICOS

12.1 Declaração do registrante sobre a composição qualitativa e quantitativa do produto, indicando os limites máximo e mínimo da variação de cada componente, suas impurezas em concentrações iguais ou superiores a 0,1%, relativo a cada fabricante, acompanhada de laudo laboratorial de cada fabricante, com base na análise de cinco bateladas;
12.2 Declaração do registrante, sobre a identificação e quantificação de subprodutos ou impurezas presentes no produto técnico em concentrações inferiores a 0,1%, quando significativas do ponto de vista toxicológico ou ambiental, acompanhada de laudo laboratorial de cada fabricante, com base na análise de cinco bateladas;
12.3 Identificação de isômeros e suas proporções;
12.4 Descrição da metodologia analítica para determinação qualitativa e quantitativa do ingrediente ativo, dos seus principais produtos de degradação e, quando pertinente, para determinação das impurezas toxicológicas ou ambientalmente significativas presentes;
12.5 Descrição do processo de produção do produto técnico, contemplando suas etapas de síntese, seus subprodutos e impurezas, fornecida pelo(s) fabricante(s);

12 - Anexos - PRODUTOS TÉCNICOS (Redação dada pelo Decreto nº 5.981, de 2006)

12.1. Declaração única do registrante sobre a composição qualitativa e quantitativa do produto, elaborada com base no(s) laudo(s) laboratorial(is) das análises de cinco bateladas de cada fabricante, o(s) qual(is) deverá(ão) acompanhar a declaração, indicando:
12.1.1. O limite máximo do teor de cada impureza com concentração igual ou superior a 0,1%;
12.1.2. O limite mínimo do teor do ingrediente ativo;
12.1.3. O limite máximo de subprodutos ou impurezas presentes em concentrações inferiores a 0,1%, quando relevantes do ponto de vista toxicológico ou ambiental; e
12.1.4. Identificação de isômeros e suas proporções;
12.2. Descrição dos efeitos observados relacionados às impurezas relevantes (por exemplo, efeitos toxicológicos ou efeitos sobre a estabilidade do ingrediente ativo);
12.3 Descrição da metodologia analítica para determinação qualitativa e quantitativa do ingrediente ativo, das impurezas em concentrações superiores ou iguais a 0,1% e das impurezas toxicológica ou ambientalmente relevantes em concentrações inferiores a 0,1%
12.4. Descrição da metodologia analítica dos principais produtos de degradação do ingrediente ativo, para fins de monitoramento e fiscalização.
12.5. Descrição do processo de produção do produto técnico, contemplando suas etapas de síntese, seus subprodutos e impurezas, fornecida pelo fabricante, contendo:
12.5.1. fluxograma das reações químicas e rendimento de cada etapa do processo;
12.5.2. identidade dos reagentes, solventes e catalisadores, com seus respectivos graus de pureza;
12.5.3. descrição geral das condições que são controladas durante o processo (por exemplo: temperatura, pressão, pH, umidade);
12.5.4. descrição das etapas de purificação (incluindo as usadas para recuperar ou reciclar materiais de partida, intermediários ou substâncias geradas); e
12.5.5. discussão sobre a formação teórica de todas as possíveis impurezas geradas no processo de produção.
12.6. Relatório de estudos de propriedades físico-químicas.

Se o registro for de produto(s) formulado(s) ou pré-mistura(s) de natureza química ou biológica:

13 - Anexos - PRODUTOS FORMULADOS E PRÉ-MISTURAS DE NATUREZA QUÍMICA OU BIOQUÍMICA

13. Anexos - PRODUTOS FORMULADOS E PRÉ-MISTURAS DE NATUREZA QUÍMICA OU BIOQUÍMICA  
(Redação dada pelo Decreto nº 10.833, de 2021)

1. Declaração do registrante, sobre a composição qualitativa e quantitativa do produto, indicando os limites máximo e mínimo da variação de cada componente e sua função específica, acompanhada de laudo laboratorial de cada formulador;
1. Declaração do registrante sobre a composição qualitativa e quantitativa do produto, com a indicação dos limites máximo e mínimo da variação de cada componente e da sua função específica, acompanhada de laudo laboratorial ou de declaração de cada formulador. (Redação dada pelo Decreto nº 10.833, de 2021)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unidades impressas do rótulo e da bula do produto, quando existentes no País de origem;</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indicação de uso (culturas e alvos biológicos), informações detalhadas sobre o modo de ação do produto, modalidade de emprego (pré-emergência, pós-emergência etc.), dose recomendada, concentração e modo de preparo de calda, modo e equipamentos de aplicação, época, número e intervalo de aplicações;</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Restrições de uso e recomendações especiais;</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intervalo de segurança;</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intervalo de reentrada;</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Especificação dos equipamentos de proteção individual apropriados para a aplicação do produto, bem como medidas de proteção coletiva;</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimentos para descontaminação de embalagens e equipamentos de aplicação;</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sistema de recolhimento e destinação final de embalagens e restos de produtos;</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modelo de rótulo e bula;</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Comprovante ou protocolo de registro no Brasil de seus componentes, inclusive do produto técnico.</li> </ul>

Se o registro for de produto(s) à base de agentes biológicos de controle de praga:

14 - Anexos - PRODUTOS À BASE DE AGENTES BIOLÓGICOS DE CONTROLE DE PRAGA

14.1 Nome e endereço completo do fornecedor do agente biológico;
14.2 Classificação taxonômica completa do agente biológico e nome comum;
14.3 Indicação completa do local e referência da cultura depositada em coleção;
14.4 Declaração do registrante da composição qualitativa e quantitativa do produto, indicando a concentração mínima do ingrediente ativo biológico e os limites máximos e mínimos dos demais componentes e suas funções específicas, acompanhada de laudo laboratorial de cada formulador;
14.5 Informações sobre a possível presença de toxinas microbianas e outros metabólitos, estirpes mutantes, substância alergênica etc.;

14.6	Indicações de uso (culturas e alvos biológicos), modalidade de emprego (pré-emergência, pós-emergência, etc.), dose recomendada, concentração e modo de preparo da calda, modo e equipamentos de aplicação, estratégia de uso (inoculativa, inundativa, etc.), época, número e intervalo de aplicação;
14.7	Informações sobre o modo de ação do produto sobre os organismos alvo;
14.8	Unidade impressa de rótulo e bula do produto, quando existente no País de origem;
14.9	Modelo de rótulo e bula, em se tratando de produto formulado;
14.10	Descrição de testes ou procedimentos para identificação do agente biológico (morfologia, bioquímica, sorologia, molecular);
14.11	Informações sobre a ocorrência, distribuição geográfica, local de isolamento, ciclo de vida do organismo e demais dados que caracterizem o agente biológico;
14.12	Informações sobre a relação filogenética do agente biológico com patógenos de organismos não-alvo (humanos, plantas e animais);
14.13	Informações sobre a estabilidade genética do agente biológico;
14.14	Descrição do processo de produção do produto, fornecida pelo(s) formulador(es);
14.15	Intervalo de segurança e de reentrada quando pertinente.
14.16	Especificação dos equipamentos de proteção individual apropriados para a aplicação do produto, bem como medidas de proteção coletiva;
14.17	Procedimentos para descontaminação de embalagens e equipamentos de aplicação;
14.18	Sistema de recolhimento e destinação final de embalagens e restos de produtos;

Se o registro for de produto(s) equivalente(s):

15 - Anexos – PRODUTO EQUIVALENTE

15.1	Produto de referência, indicando o número do registro.
------	--

~~16 - Anexos – PRODUTO EQUIVALENTE (se produto técnico)~~

16.1	<del>Declaração do registrante sobre a composição qualitativa e quantitativa, indicando os limites máximo e mínimo da variação de cada componente, incluindo suas impurezas com concentrações iguais ou superiores a 0,1%, relativo a cada fabricante, acompanhada de laudo laboratorial de cada fabricante, com base na análise de cinco bateladas;</del>
16.2	<del>Declaração de identificação e quantificação de subprodutos ou impurezas presentes no produto técnico em concentrações inferiores a 0,1 %, quando significativas do ponto de vista toxicológico ou ambiental, acompanhada de laudo laboratorial de cada fabricante, com base na análise de cinco bateladas;</del>
16.3	<del>Identificação de isômeros e suas proporções;</del>
16.4	<del>Descrição da metodologia analítica para determinação qualitativa e quantitativa do ingrediente ativo, dos seus principais produtos de degradação e, quando pertinente, para determinação das impurezas toxicológica ou ambientalmente significativas presentes;</del>
16.5	<del>Descrição do processo de produção do produto técnico, contemplando suas etapas de síntese, seus subprodutos e impurezas, fornecida pelo fabricante.</del>

16 - Anexos - PRODUTO TÉCNICO EQUIVALENTE [Redação dada pelo Decreto nº 5.981, de 2006](#)

FASE I	
16.1.	Declaração única do registrante sobre a composição qualitativa e quantitativa do produto, elaborada com base no(s) laudo(s) laboratorial(is) das análises de cinco bateladas de cada fabricante, o(s) qual(is) deverá(ão) acompanhar a declaração, indicando:
16.1.1.	O limite máximo do teor de cada impureza com concentração igual ou superior a 0,1%;
16.1.2.	O limite mínimo do teor do ingrediente ativo;
16.1.3.	O limite máximo de subprodutos ou impurezas presentes em concentrações inferiores a 0,1%, quando relevantes do ponto de vista toxicológico ou ambiental; e
16.1.4.	Identificação de isômeros e suas proporções;
16.2.	Descrição dos efeitos observados relacionados às impurezas relevantes (por exemplo, efeitos toxicológicos ou efeitos sobre a estabilidade do ingrediente ativo);
16.3.	Descrição da metodologia analítica para determinação qualitativa e quantitativa do ingrediente ativo, das impurezas em concentrações superiores ou iguais a 0,1% e das impurezas toxicológica ou ambientalmente relevantes em concentrações inferiores a 0,1%
16.4.	Descrição da metodologia analítica dos principais produtos de degradação do ingrediente ativo, para fins de monitoramento e fiscalização.
16.5.	Descrição do processo de produção do produto técnico, contemplando suas etapas de síntese, seus subprodutos e impurezas, fornecida pelo fabricante, contendo:
16.5.1.	fluxograma das reações químicas de cada etapa do processo;
16.5.2.	identidade dos reagentes, solventes e catalisadores;
16.5.3.	descrição geral das condições que são controladas durante o processo (por exemplo: temperatura, pressão, pH, umidade);
16.5.4.	descrição das etapas de purificação (incluindo as usadas para recuperar ou reciclar materiais de partida, intermediários ou substâncias geradas); e
16.5.5.	discussão sobre a formação teórica de todas as possíveis impurezas geradas no processo de produção.
16.6.	Relatório de estudos de propriedades físico-químicas:
16.6.1.	pressão de vapor;
16.6.2.	ponto de fusão ou ebulição;
16.6.3.	solubilidade em água; e
16.6.4.	coeficiente de partição N-octanol/água.

Quando não for possível determinar a equivalência na Fase I, os seguintes estudos poderão ser exigidos:

FASE II	
16.7.	Testes de toxicidade para animais superiores
16.7.1.	Toxicidade oral aguda;
16.7.2.	Toxicidade inalatória aguda;
16.7.3.	Toxicidade cutânea aguda;
16.7.4.	Irritação cutânea primária;
16.7.5.	Irritação ocular;

16.7.6. Sensibilização dérmica; e
16.7.7. Mutagenicidade gênica e cromossômica

Quando não for possível determinar a equivalência na Fase II, os seguintes estudos poderão ser exigidos:

FASE III
16.8. Testes toxicológicos com doses repetidas (desde subagudos até crônicos) e estudos toxicológicos para avaliar, teratogenicidade, carcinogenicidade, neurotoxicidade e efeitos hormonais;
16.9. Testes ecotoxicológicos de toxicidade a organismos aquáticos e terrestres (peixes, Daphnia, algas, aves, abelhas, microrganismos, organismos de solo), de acordo com o uso pretendido do produto.

47 – Anexos – PRODUTO EQUIVALENTE (se produto formulado) – [\(Revogado pelo Decreto nº 5.981, de 2006\)](#)

47.1 Declaração do registrante sobre a composição qualitativa e quantitativa, indicando os limites máximo e mínimo da variação, bem como a função específica de cada componente, acompanhada de laudo laboratorial de cada fabricante;
47.2 Descrição da metodologia analítica para determinação qualitativa e quantitativa do(s) ingrediente(s) ativo(s), dos seus principais produtos de degradação e, quando pertinente, para determinação das impurezas toxicológicas ou ambientalmente significativas presentes;
47.3 Descrição do processo de produção, a partir do produto técnico e demais componentes, bem como quando se tratar de obtenção do produto diretamente a partir de matérias primas, fornecida pelo formulador.

#### RELATÓRIOS TÉCNICOS

(apresentar em uma via)

Ao Órgão Registrante (critérios e exigências serão especificados em normas complementares)

18 - Anexos - Órgão Registrante, para avaliação da eficiência de agrotóxicos e afins

18.1 Testes e informações sobre a eficiência e a praticabilidade do produto na(s) finalidade(s) de uso proposta(s);
18.2 Testes e informações referentes a sua compatibilidade com outros produtos;
18.3 Informações sobre o desenvolvimento de resistência ao produto;
18.4 Relatório de estudos de resíduos, intervalo de Segurança e, quando for o caso, limite dos resíduos estranhos; <a href="#">(Revogado pelo Decreto nº 10.833, de 2021)</a>
18.5 Método analítico e sua sensibilidade para determinação de resíduos do agrotóxico;
18.6 Resultado das análises quantitativas efetuadas indicando a persistência dos resíduos em vegetais, animais, na água, no solo e no ar.
18.7 Informações relativas à bioacumulação, persistência e mobilidade;
18.8 Outros dados, informações ou documentos exigidos em normas complementares.

Ao Ministério da Saúde (critérios e exigências serão especificados em normas complementares)

19 - Anexos - Ministério da Saúde

49.1 Características físico-químicas;
19.1 Relatório de estudos de propriedades físico-químicas; <a href="#">(Redação dada pelo Decreto nº 5.981, de 2006)</a>
19.2 Relatório de estudos de resíduos, intervalo de Segurança e, quando for o caso, limite dos resíduos estranhos;
19.3 Método analítico e sua sensibilidade para determinação de resíduos de agrotóxico;
19.4 Resultado das análises quantitativas efetuadas indicando a persistência dos resíduos em vegetais, animais, na água, no solo e no ar;
19.5 Intervalo de reentrada de pessoas nas áreas tratadas;
19.6 Estudos biológicos envolvendo aspectos bioquímicos e toxicológicos agudos e crônicos;
19.7 Antídoto ou tratamento disponível no País, para os casos de intoxicação humana;
19.8 Outros dados, informações ou documentos exigidos em normas complementares.
19.9 Testes e informações referentes a sua compatibilidade com outros produtos;
19.10 Informações relativas à bioacumulação, persistência e mobilidade;

Ao Ministério do Meio Ambiente (critérios e exigências serão especificados em normas complementares)

20 - Anexos - Ministério do Meio Ambiente

20.1 Relatório de estudos de dados físico-químicos;
20.1 Relatório de estudos de propriedades físico-químicas; <a href="#">(Redação dada pelo Decreto nº 5.981, de 2006)</a>
20.2 Relatório de estudos de dados relativos à toxicidade para microorganismos, microcrustáceos, peixes, algas, organismos de solo, aves, plantas e insetos não-alvo;
20.3 Relatório de estudos de dados relativos à bioacumulação, persistência e mobilidade;
20.4 Relatório de estudos de dados relativos à toxicidade para animais superiores;
20.5 Relatório de estudos de dados relativos ao potencial mutagênico, embriofetotóxico e carcinogênico em animais;



20.6 Método analítico e sua sensibilidade para determinação de resíduos de agrotóxico;
20.7 Resultado das análises quantitativas efetuadas indicando a persistência dos resíduos em vegetais, animais, na água, no solo e no ar;
20.8 Outros dados, informações ou documentos exigidos em normas complementares
20.9 Testes e informações referentes a sua compatibilidade com outros produtos;

21 - Anexos - PRODUTO FORMULADO COM BASE EM PRODUTO TÉCNICO EQUIVALENTE – Ao Órgão Registrante  
(Incluído pelo Decreto nº 5.981, de 2006)

21.1. Estudos e informações sobre a eficiência e a praticabilidade do produto na(s) finalidade(s) de uso proposta(s), devendo ser conduzidos conforme suas características e de acordo com as normas complementares do órgão responsável;
21.2. Informações referentes à sua compatibilidade com outros produtos;
21.3. Informações sobre o desenvolvimento de resistência ao produto;
21.4. Relatório de estudo de resíduos, intervalo de segurança e, quando for o caso, limite dos resíduos estranhos;
21.5. Método analítico e sua sensibilidade para determinação de resíduos do agrotóxico, para fins de monitoramento e fiscalização.

22 - Anexos - PRODUTO FORMULADO COM BASE EM PRODUTO TÉCNICO EQUIVALENTE – Ao Ministério da Saúde (Incluído pelo Decreto nº 5.981, de 2006)

1. Relatório de estudos de propriedades físico-químicas;
2. Relatório de estudo de resíduos, intervalo de segurança e, quando for o caso, limite dos resíduos estranhos;
22.3. Método analítico e sua sensibilidade para determinação de resíduos de agrotóxico, para fins de monitoramento e fiscalização;
22.4. Intervalo de reentrada de pessoas nas áreas tratadas;
22.5. Estudos toxicológicos agudos e de mutagenicidade;
22.6. Antídoto ou tratamento disponível no País, para os casos de intoxicação humana;
22.7. Informações referentes à sua compatibilidade com outros produtos;

23 – Anexos – PRODUTO FORMULADO COM BASE EM PRODUTO TÉCNICO EQUIVALENTE – Ao Ministério do Meio Ambiente (Incluído pelo Decreto nº 5.981, de 2006)

23.1. Relatório de estudos de propriedades físico-químicas;
23.2. Relatório de estudos de dados relativos à toxicidade para microorganismos, microcrustáceos, peixes, algas, organismos de solo, aves, plantas e insetos não-alvo;
23.3. Relatório de estudos de dados relativos à toxicidade para animais superiores;
23.4. Relatório de estudos de dados relativos ao potencial mutagênico;
23.5. Método analítico e sua sensibilidade para determinação de resíduos de agrotóxico, para fins de monitoramento e fiscalização;
23.6. Informações referentes à sua compatibilidade com outros produtos.

24 - Anexos - PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS COM USO APROVADO PARA A AGRICULTURA ORGÂNICA  
(Incluído pelo Decreto nº 6.913, de 2009).

· Identificação do produto em relação à especificação de referência;
· Descrição do processo de produção do produto;
· Declaração do registrante, sobre a composição qualitativa e quantitativa do produto, indicando os limites máximo e mínimo da variação de cada componente e sua função específica, acompanhada de laudo laboratorial de cada formulador;
· Indicação de uso (culturas e alvos biológicos), modo de ação do produto, modalidade de emprego, dose recomendada, concentração e modo de preparo de calda, modo e equipamentos de aplicação, época, número e intervalo de aplicações;
· Restrições de uso e recomendações especiais;
· Intervalo de segurança;
· Intervalo de reentrada;
· Informações referentes a sua compatibilidade com outros produtos;
· Especificação dos equipamentos de proteção individual apropriados para a aplicação do produto, bem como medidas de proteção coletiva;
· Procedimentos para descontaminação de embalagens e equipamentos de aplicação;
· Sistema de recolhimento e destinação final de embalagens e restos de produtos;
· Modelo de rótulo e bula.

### ANEXO III

#### Modelo I - Requerimento de Registro Especial Temporário - RET

O requerente a seguir identificado requer aos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, da Saúde (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e do Meio Ambiente (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), com base no Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, a avaliação do produto abaixo especificado, para fins de registro especial temporário, para o que presta as informações a seguir e junta documentos:

#### 1. Requerente

1.1 nome		1.2 endereço eletrônico		
1.3 endereço				1.4 bairro
1.5 cidade		1.6 uf		1.7 cep
1.8 ddd	1.9 fone	1.10 fax	1.11 celular	1.12 cnpj/cpf

#### 2. Representante legal (anexar documento comprobatório)

2.1 nome		2.2 endereço eletrônico		
2.3 endereço				2.4 bairro
2.5 cidade		2.6 uf		2.7 cep
2.8 ddd	2.9 fone	2.10 fax	2.11 celular	2.12 cnpj/cpf

#### 3. Da pesquisa (se agente biológico de ocorrência natural)

3.1 classificação taxonômica ou caracterização morfológica ou bioquímica
3.2 informações de ocorrência no país
3.3 procedência e informações de ocorrência e, quando importado, medidas quarentenárias aplicáveis

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2 \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura(s) do(s) Representante(s) Legal(ais)

Documentos a serem anexados ao Requerimento

## 4. Anexos

4.1 Tipo de pesquisa (laboratórios, estufa, casa de vegetação, estação experimental, campo);
4.2 Projeto experimental;
4.3 Dados físico-químicos;
4.4 Dados necessários à avaliação toxicológica preliminar;
4.5 Dados necessários à avaliação ambiental preliminar.

Modelo II - Registro de produto para pesquisa eexperimentação, já registrado para outra(s) indicação(ões) de uso

## 1. Requerente

1.1 nome		1.2 endereço eletrônico		
1.3 endereço		1.4 bairro		1.6 uf
1.5 cidade		1.7 cep		1.11 celular
1.8 ddd	1.9 fone	1.10 fax	1.12 cnpj/cpf	

## 2. Representante legal (anexar documento comprobatório)

2.1 nome		2.2 endereço eletrônico		
2.3 endereço		2.4 bairro		2.6 uf
2.5 cidade		2.7 cep		2.11 celular
2.8 ddd	2.9 fone	2.10 fax	2.12 cnpj/cpf	

## 3. Da pesquisa

3.1 objetivo da pesquisa e experimentação
---

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2 \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura(s) do(s) Representante(s) Legal(ais)

Documentos a serem anexados ao Requerimento

## 4. Anexos

4.1 Projeto experimental.
---------------------------

**ANEXO IV**Registro de Componentes - Excetuados osingredientes ativos, produtos técnicos e pré-mistura

## 1. Requerente (repetir o quadro com os dados dos demais requerentes, se houver)

1.1 nome		1.2 endereço eletrônico		
1.3 endereço		1.4 bairro		1.6 uf
1.5 cidade		1.7 cep		1.11 celular
1.8 ddd	1.9 fone	1.10 fax	1.12 cnpj/cpf	

## 2. Representante legal (anexar documento comprobatório)

2.1 nome		2.2 endereço eletrônico		
2.3 endereço		2.4 bairro		2.6 uf
2.5 cidade		2.7 cep		2.11 celular
2.8 ddd	2.9 fone	2.10 fax	2.12 cnpj/cpf	

## 3. Fabricante (repetir o quadro com os dados dos demais fabricantes, se houver)

3.1 nome		3.2 endereço eletrônico		
3.3 endereço		3.4 bairro		3.6 uf
3.5 cidade		3.7 cep		3.11 celular
3.8 ddd	3.9 fone	3.10 fax	3.12 cnpj/cpf	

## 4. Produto

4.1 nome comercial		4.3 nº código da substância no <i>chemical abstract service registry (CAS)</i>		
4.2 usos pretendidos				
4.4 nome químico da substância				
4.5 nome comum da substância		4.6 grupo químico	4.7 sinonímia	