

BEATRIZ RIBEIRO GOMES

**ESTABELECIMENTO DE METODOLOGIA BASEADA EM DISCOS FOLIARES NA
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE VIDEIRA À FERRUGEM**

(Phakopsora euvitis)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciência Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. PhD Amauri Bogo
Coorientador: Pro. Dr Leocir José Welter

LAGES-SC

2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática
da Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Gomes, Beatriz Ribeiro

Estabelecimento de metodologia baseada em discos foliares na avaliação da resistência de genótipos de videira à ferrugem (*Phakopsora euvitidis*) / Beatriz Ribeiro Gomes. -- 2019.

114 p.

Orientador: Amauri Bogo

Coorientador: Leocir José Welter

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação , Lages, 2019.

1. Vitis spp.. 2. doenças da videira. 3. Banco Ativo de Germoplasma. 4. BAG-Uva. 5. resistência a doenças. I. Bogo, Amauri. II. José Welter, Leocir. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação . IV. Título.

BEATRIZ RIBEIRO GOMES

**DISCOS FOLIARES NO PROCESSO DE AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE
GENÓTIPOS DE VIDEIRA À FERRUGEM (*Phakopsora euvtis*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do centro de ciência Agroveterinária da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Banca Examinadora

Orientador (a):



Prof. PhD. Amauri Bogo
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro Interno:



Prof. Dr. Fábio Nascimento da Silva
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro Externo:

Prof. Dr. Lirio Luiz Dal Vesco
Universidade Federal de Santa Catarina

Lages, 22 de fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, discernimento e saúde. Obrigada por ter colocado pessoas boas no meu caminho, tornando-o mais fácil e iluminado.

Aos meu pais por tudo, vocês foram à força nos momentos os quais mais precisei, o consolo nos momentos difíceis e amor em todo o caminho.

Ao professor Dr. Leocir, por tudo, orientação, ensinamento e jeito de ser.

Ao professor PhD. Amauri, por permitir a concretização deste momento, orientação e ensinamentos.

Ao professor Dr. Fabio, pela orientação na docência e ensinamentos.

Ao meu namorado Jean, por estar ao meu lado sempre, por toda ajuda e por ser consolo, amor, carinho e paciência.

As minhas amigas Caroline, Camila e Claudia Piva, que foram força, palavra amiga, incentivo e apoio.

Aos colegas do Neuvim – Núcleo de estudos da Uva e do Vinho Cristian e Claudemar por toda parceria. Em especial a Andriele, Diogo Stefens e Camila por auxiliarem na implantação dos experimentos, conversas e por simplesmente estarem por perto. E ao professor Lirio por todo carinho e incentivo.

Aos técnicos de laboratório de Biologia da UFSC/Curitibanos, Renata, Aline, Flávia e Gabriel pela amizade, pela ajuda e auxílio na condução dos experimentos.

A minha família por estarem presentes nos momentos mais importantes, gratidão por serem luz, carinho e amor.

A minha psicologia Sabrina, pelas suas palavras de carinho e incentivo.

A UDESC, em especial ao programa de pós-graduação em Produção vegetal pelo ensino gratuito e de qualidade. E aos mestres, os quais foram fundamentais na construção do meu conhecimento, todos de excelência e admiráveis.

A Capes e Fapesc pela concessão da bolsa de pesquisa.

A Embrapa pelo recurso financeiro, em especial a Dra. Patrícia, pelo projeto, e fornecimento das folhas dos acessos do BAG-Uva.

Muito obrigada!

GOMES, Beatriz Ribeiro. **Estabelecimento de metodologia baseada em discos foliares na avaliação da resistência de genótipos de videira à ferrugem (*Phakopsora euvitidis*)**. 144 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal – Área Fruticultura e Horticultura) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Lages, 2019.

RESUMO

A ferrugem da videira (*Phakopsora euvitidis* Ono), foi identificada pela primeira vez no Brasil no estado do Paraná em 2001. Atualmente é considerada uma doença endêmica, com potencial de se tornar uma epidemia, na presença de condições ambientais favoráveis, associada a ausência de medidas de controle efetivas. A busca por fontes de resistência à *P. euvitidis* em acessos do Banco Ativo de Germoplasma da uva (BAG-Uva) para o controle genético à doença é desejável. Para o sucesso na busca de materiais resistentes, corretas metodologias devem ser desenvolvidas para uma alta eficiência. A técnica de discos foliares, consiste em um bioensaio rotineiramente utilizado na determinação fenotípica de níveis de resistência a várias doenças. O objetivo deste trabalho foi adaptar e avaliar a técnica de discos foliares para a fenotipagem e seleção de acessos com e sem tricomas do BAG-Uva resistentes à ferrugem da videira. Foram realizados experimentos para: (1) determinação da concentração mais eficiente (0,0, 0,05, 0,1, 0,2 e 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) do solubilizador tensoativo hidrofílico Tween 20, adicionado a suspensão de 100.000 urediniósporos/mL no estabelecimento do patógeno em discos foliares com tricomas e sem tricomas; (2) Determinação da concentração de urediniósporos (0, 10.000, 30.000, 50.000 e 100.000 urediniósporos/mL) que melhor expresse a ocorrência da doença sobre discos foliares; (3) E validação do bioensaio utilizando discos foliares de três acessos já conhecidos como suscetível, intermediário e resistente à ferrugem, sobre cada um deles foi depositada uma gota de 30 μL de suspensão na concentração 30.000 urediniósporo/mL sem Tween 20. Posteriormente o bioensaio foi aplicado para classificação e seleção de 25 acessos do BAG-Uva. Os parâmetros de resistência avaliados foram o período latente; número de pústulas/disco e cm^2 ; tamanho médio de pústulas; intensidade de esporulação; severidade e AACPSD. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), teste de comparação de médias de Tukey, análise de regressão e análise multivariada dos componentes principais e de similaridade entre os genótipos. A concentração 30.000 urediniósporos/mL na ausência de Tween 20 foi a mais eficiente para a classificação dos genótipos como suscetíveis, intermediário e resistentes, sendo que as variáveis epidemiológicas período latente, severidade e AACPSD foram as que melhor permitiram a classificação dos acessos quanto a resistência à doença. Os acessos IAC 766 (acesso 2033) e Seibel 405 (acesso 708), resistentes a ferrugem da videira apresentaram em média PL maior (9 dias), e menores valores de severidade (0,75%) e AACPSD (1,00). Os acesso *V. longii*, *V. Jacquemontii* (acesso 2701), *V. thunbergii* (acesso 2462), dentre outros, muito suscetíveis a ferrugem, apresentaram em média PL menor (5 dias), severidade (61%) e AACPSD (128,67) superiores. O bioensaio de discos foliares permitiu classificar os 25 acessos do BAG-Uva em cinco classes de resistência. Os acessos IAC 766 (acesso 2033) e Seibel 405 (acesso 708), *Vitis del rioi* Sd1 (acesso 3092), *Vitis slavini* (acesso 2559) e Seibel 128 (acesso 999) podem ser selecionados como possíveis parentais a serem utilizados em futuros programas

de melhoramento genético à *P. euvitis*. A técnica de discos foliares mostra-se rápida e consistente para a fenotipagem da resistência *P. euvitis*.

Palavras-Chave: *Vitis* spp., doenças da videira; Banco Ativo de Germoplasma, BAG-Uva, resistência a doenças.

GOMES, Beatriz Ribeiro. **Establishment of methodology based on leaf discs in the evaluation of resistance of grapevine genotypes to rust (*Phakopsora euvitidis*)**. 144 f. Dissertation (Master in Plant Production - Fruit and Horticulture Area) - State University of Santa Catarina. Postgraduate Program in Plant Production, Lages, 2019.

ABSTRACT

The grape rust (*Phakopsora euvitidis* Ono), was first identified in Brazil in the state of Paraná in 2001. It is currently considered an endemic disease, with the potential to become an epidemic, in the presence of favorable environmental conditions, associated with the absence of effective control measures. The search for sources of resistance to *P. euvitidis* in accesses of the Active Grape Germplasm Bank (BAG-Grape) for the genetic control of the disease is desirable. For success in finding sturdy materials, correct methodologies should be developed for high efficiency. The foliar disc technique consists of a bioassay routinely used in the phenotypic determination of levels of resistance to various diseases. The objective of this work was to adapt and evaluate the leaf disc technique for the phenotyping and selection of accesses with and without BAG-grape trichomes resistant to grapevine rust. Experiments were carried out to: (1) determine the most efficient concentration (0.0, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5 $\mu\text{L} / \text{mL}$) of the hydrophilic surfactant solubilizer Tween 20, added to the suspension of 100,000 uredinospores / mL at the establishment of the pathogen in leaf discs with trichomes and without trichomes; (2) Determination of the concentration of uredinospores (0, 10,000, 30,000, 50,000 and 100,000 uredinospores / mL) that best expresses the occurrence of the disease on leaf discs; (3) and validation of the bioassay using leaf disks of three accesses already known as susceptible, intermediate and resistant to rust, on each of them was deposited one drop of 30 μL of suspension in the concentration 30,000 uredinospores / mL without Tween 20. Subsequently the bioassay was applied for classification and selection of 25 accesses of the BAG-Grape. The resistance parameters evaluated were the latent period; number of pustules / disk and cm^2 ; mean size of pustules; sporulation intensity; severity and AACPSD. Data were submitted to analysis of variance (ANOVA), Tukey averages comparison test, regression analysis and multivariate analysis of the main components and similarity between genotypes. The concentration of 30,000 uredinospores / mL in the absence of Tween 20 was the most efficient for the classification of the genotypes as susceptible, intermediate and resistant, and the epidemiological variables latent period, severity and AACPSD were the ones that best allowed the classification of accesses as resistance the disease. The IAC 766 (access 2033) and Seibel 405 (access 708), resistant to grapevine rust showed a higher average PL (9 days), lower values of severity (0.75%) and AACPSD (1.00). *V. longii*, *V. Jacquemontii* (access 2701), *V. thunbergii* (access 2462), among others, very susceptible to rust, had a mean LV (5 days), severity (61%) and AACPSD 67). The leaf disc bioassay allowed to classify the 25 accessions of BAG-Grape in five resistance classes. Accesses IAC 766 (access 2033) and Seibel 405 (access 708), *Vitis del rioi* Sd1 (access 3092), *Vitis slavini* (access 2559) and Seibel 128 (access 999) can be selected as possible parental to be used in future programs of genetic improvement to *P. euvitidis*. The foliar disks technique is shown to be fast and consistent for phenotyping of *P. euvitidis* resistance.

Key words: *Vitis* spp., Diseases of the vine; Active Germplasm Bank, BAG-Grape, resistance to diseases

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Folha de videira apresentando os sinais típicos da ferrugem, com a formação de pústulas de coloração amarela na superfície adaxial.27
- Figura 2** - Ciclo de vida do patógeno *Phakopsora euvitidis*, agente causal da ferrugem da videira.28
- Figura 3** - Efeito da concentração de Tween 20 no número médio de pústulas em discos com tricomas: na ausência de Tween 20; na concentração 0,05 ul/mL; 0,1 ul/mL; 0,2 ul/mL; 0,5 ul/mL; Em discos sem tricomas: na ausência de Tween 20; na concentração 0,05 ul/mL; 0,1.....52
- Figura 4** - Representação gráfica do efeito da concentração de Tween 20 em relação ao principais componentes de resistência. (A) Período latente (dias); (B) Número de pústulas/disco; (C) Número de pústulas/cm²; (D) Número de uredinióporos por disco e (E) Uredinióporos por pústula. 10 dias após a inoculação.....54
- Figura 5** - Efeito da concentração de urediniósporos por mL em discos com tricomas, na concentração 0; 10.000; 30.000 50.000 e 00.000 urediniósporos/mL. Em discos sem tricomas, nas concentrações 0; 10.000; 30.000; 50.000 e 100.000 urediniósporos/mL.57
- Figura 6** - Representação gráfica do efeito da concentração urediniósporos/mL no (A) número de uredinióporos por disco e (B) Uredinióporos por pústula analisada 10 dias após a inoculação.59
- Figura 7** - Análise multivariada Biplot bidimensional dos componentes principais das variáveis referentes aos componentes de resistência à *Phakopsora euvitidis*, inoculado *in vitro* sobre discos foliares de seis genótipos de *Vitis* spp. com diferentes níveis de resistência.61
- Figura 8** - Interação planta-patógeno, intensidade de *Phakopsora euvitidis* em diferentes genótipos de videira, 10 dias após a inoculação.....64
- Figura 9** - Intensidade de esporulação de acessos do gênero *Vitis* spp. na presença de *Phakopsora euvitidis*.84

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Teste de comparação de médias de Tukey, do diâmetro médio de pústulas (mm), no experimento avaliação do efeito da concentração do solubilizador tensoativo hidrofílico Tween 20 adicionado à suspensão de urediniósporos sobre a infecção de *Phakopsora euvitidis*.55
- Tabela 2** - Teste de comparação de médias de Tukey, do período latente (dias) no experimento avaliação do efeito da concentração de urediniósporos na infecção de *Phakopsora euvitidis*.56
- Tabela 3** - Número de pústulas por disco foliar com e sem tricomas em diferentes concentrações de inóculo de *Phakopsora euvitidis*.57
- Tabela 4** - Número de pústulas por cm² foliar com e sem tricomas em diferentes concentrações de inóculo de *Phakopsora euvitidis*.57
- Tabela 5** - Teste de comparação de médias de Tukey no diâmetro médio de pústulas (mm) no experimento avaliação do efeito da concentração de urediniósporos na infecção de *Phakopsora euvitidis*.58
- Tabela 6** - Coeficiente de correlação de r (Pearson) dos componentes de resistência.62
- Tabela 7** - Matriz de similaridade (ANOSIN) de espécies e híbridos pertencentes ao gênero *Vitis* spp. de acordo com os componentes de resistência à *Phakopsora euvitidis*.62
- Tabela 8** - Teste de comparação de médias de Tukey dos componentes de resistência nos diferentes genótipos.64
- Tabela 9** - Acessos de videira (*Vitis* spp.) do Banco Ativo de Germoplasma da Uva, mantidos pela Embrapa Uva e Vinho utilizados nos ensaios de resistência à *Phakopsora euvitidis*.79
- Tabela 10** - Escala de classificação da resistência à *Phakopsora euvitidis* em acessos de videira de acordo com a severidade da doença em uma área de 40 mm².81
- Tabela 11** - Análise dos componentes de resistência à *Phakopsora euvitidis* de 25 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Uva, mantido pela Embrapa Uva e vinho.82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	VITICULTURA	21
2.1.1	Viticultura brasileira	22
2.2	Ferrugem da videira	24
2.2.1	Taxonomia e nomenclatura	24
2.2.2	Distribuição geográfica	25
2.2.3	Epidemiologia e Sintomatologia	26
2.2.4	Influência das mudanças climáticas sob à Ferrugem da videira no Brasil	29
2.2.5	Controle da ferrugem	30
2.3	MELHORAMENTO GENÉTICO COM ÊNFASE NA RESISTÊNCIA A DOENÇAS.....	30
2.3.1	Identificação de fontes de resistência	34
2.3.2	Interação planta-patógeno	35
2.3.3	Análise fenotípica: Técnica de discos foliares	38
3	CAPÍTULO 1. BIOENSAIO <i>IN VITRO</i> COM DISCOS FOLIARES PARA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS À FERRUGEM DA VIDEIRA	43
3.1	RESUMO.....	43
3.2	INTRODUÇÃO	45
3.3	Material e Métodos	47
3.3.1	Local de execução dos experimentos	47
3.3.2	Obtenção e multiplicação do patógeno	47
3.3.3	Teste de viabilidade	47
3.3.4	Experimento 1: Avaliação do efeito da concentração do solubilizador tensoativo hidrofílico Tween 20 adicionada à suspensão de urediniosporos sobre a infecção de <i>P. euvtis</i>	48
3.3.5	Experimento 2: Avaliação do efeito da concentração de urediniosporos sobre a infecção de <i>P. euvtis</i>	49
3.3.6	Experimento 3: Validação do bioensaio	49
3.3.7	Avaliação dos componentes de resistência	50
3.3.8	Análise estatística	51

3.4	RESULTADOS.....	51
3.4.1	Experimento 1: Avaliação do efeito da concentração do solubilizador tensoativo hidrofílico Tween 20 adicionado à suspensão de urediniósporos sobre a infecção de <i>P. euvitis</i>	51
3.4.2	Experimento 2: Concentração de urediniósporos na inoculação de <i>P. euvitis</i>	55
3.4.3	Experimento 3: Validação do Bioensaio	59
3.5	DISCUSSÃO.....	65
3.6	CONCLUSÕES.....	70
4	CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ACESSOS DO BAGUVA DE VIDEIRA À FERRUGEM (<i>Phakopsora euvitis</i>) ATRAVÉS DE BIOENSAIO.....	73
4.1	RESUMO	73
4.2	Introdução	75
4.3	Material e Métodos	77
4.3.1	Local de execução dos experimentos	77
4.3.2	Obtenção e multiplicação de <i>P. euvitis</i>	78
4.3.3	Material vegetal	78
4.3.4	Avaliação de componentes de resistência à <i>P. euvitis</i>	80
4.3.5	Análise estatística.....	81
4.4	RESULTADOS.....	81
4.5	DISCUSSÃO.....	86
4.6	CONCLUSÕES.....	91
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
	REFERÊNCIAS.....	95
	GLOSSÁRIO.....	113

1 INTRODUÇÃO

Dados históricos demonstram que a videira foi uma das primeiras espécies agrícolas a ser domesticada. Tem sido amplamente cultivada em todo mundo, fazendo desta, uma atividade agrícola milenar de importância econômica e social (MYLES *et al.*, 2011; ALAGUMAN; ANJUGAM, 2018). Segundo dados da FAO de 2017, o Brasil é o 11º maior produtor mundial de uva. A cultura da uva está difundida do Sul ao Norte, desvendando novos *terroirs*, com diversidade ambiental considerável entre as zonas de produção, incluindo regiões de clima, subtropical e tropical (CAMARGO; TONNETTO; HOFFMANN, 2011; WURZ *et al.*, 2017).

A diversidade de cultivo presente nas diferentes regiões, além de permitir a adaptação da cultura, favorece a ocorrência de diversas doenças, devido a presença de condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento de patógenos, o que conseqüentemente pode aumentar a susceptibilidade das cultivares a doenças (CALONNEC *et al.*, 2012; BOIS; ZITO; CALONNEC, 2017).

Dentre os patógenos que afetam a videira no Brasil e que tem alertado os pesquisadores sobre possível epidemia, está o fungo *Phakopsora euvitis* Ono, agente causal da ferrugem da videira (ONO, 2000; TESSMANN *et al.*, 2004). Foi relatada pela primeira vez em 2001, no município de Jandaia do Sul, estado do Paraná. Nos anos seguintes, se disseminou para os demais estados produtores de uva do país (TESSMANN *et al.*, 2004). Atualmente, é considerada endêmica no Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (TESSMANN; VIDA, 2005; NOGUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2017). Possivelmente, a ocorrência e dispersão da doença se intensificará em virtude de diversos fatores, tais como, mudanças nas condições climáticas, crescimento ascendente do deslocamento humano e do comércio internacional, capacidade de adaptação dos patógenos, expansão da viticultura nas regiões tropicais e a ausência de cultivares resistentes no mercado (HODSON, 2011; PRIMIANO *et al.*, 2017; TESSMANN *et al.*, 2004; ANGELOTTI *et al.*, 2008; NOGUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2017).

Durante o processo de colonização da ferrugem da videira, assim como as demais ferrugens, o fungo biotrófico utiliza o haustório e enzimas líticas para infecção (STAPLES, 2000; MENDGEN; HAHN, 2002; NOGUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2017). Ao colonizar o tecido, induz o aparecimento de pústulas amareladas na face abaxial das folhas, opostas as pústulas, na superfície adaxial, ocorre a necrose do tecido. Ataques severos causam a queda precoce das folhas. Com a redução da área

fotossinteticamente ativa, há o comprometimento do desenvolvimento normal da planta, acarretando na redução da produção e da qualidade dos frutos na safra atual e nos anos seguintes (TESSMANN *et al.*, 2004; HODSON, 2011).

Considerando o possível cenário e o impacto econômico negativo ocasionado por *P. euvitis*, o desenvolvimento de métodos alternativos de controle para um manejo integrado da ferrugem da videira são altamente desejáveis (GÓMEZ-ZELEDÓN; KAISER, 2016). O conhecimento sobre variabilidade genética de genótipos e os mecanismos de defesa, contra este fitopatógeno é muito limitado (ANGELOTTI *et al.*, 2008; ANDERSEN *et al.*, 2018). Contudo, as variáveis econômicas e sustentáveis a longo prazo do setor vitícola, dependerão da exploração (MYLES *et al.*, 2011) da variabilidade genética para desenvolver novos cultivares ou promover melhorias nas cultivares tradicionais, que além de apresentarem características agrônômicas viáveis e qualidade enológica, sejam tolerantes ou resistentes ao espectro de doenças principais e potenciais (OLIVEIRA *et al.*, 2005; TÖPFER *et al.*, 2011).

A primeira etapa de um programa de melhoramento genético com ênfase na resistência a qualquer doença, consiste na identificação seguida da seleção de fontes de resistência (ANGELOTTI *et al.*, 2008), oriundas de acessos protegidos em bancos ativos de germoplasma (BAGs) (TÖPFER *et al.*, 2011).

Considerando as características fisiológicas e o ciclo de vida da cultura da videira, os programas de melhoramento genético são extremamente demorados, aproximadamente 25 anos (TÖPFER *et al.*, 2011). Atualmente, com a diversidade e avanço tecnológico, há necessidade de procedimentos rápidos e confiáveis para a avaliação da interação patógeno-hospedeiro de uma grande população de plantas (DEGLÈNE-BENBRAHIM *et al.*, 2010). Neste aspecto, sistemas que acelerem o processo de seleção são imprescindíveis (CALONNEC *et al.*, 2012).

A metodologia de inoculação *in vitro* (Bioensaio) usando discos foliares é uma técnica de triagem, replicável e de fácil execução que possibilita a seleção de fontes de resistência e a eliminação precoce de genótipos suscetíveis de forma rápida e com nível satisfatório de confiabilidade (SCHWANDER *et al.*, 2012; TYSON; AFULLERTON, 2015; GÓMEZ-ZELEDÓN; KAISER, 2016). Atualmente, essa tecnologia é utilizada rotineiramente na determinação fenotípica de níveis de resistência de diferentes genótipos em várias culturas, sendo na videira mais difundida para o míldio (*Plasmopara viticola*) (SCHWANDER *et al.*, 2012; CALONNEC *et al.*, 2012; SAIFER, 2018). De acordo com Scapin-Buffara *et al.*, (2018) há discrepância

com relação as informações sobre a resistência de genótipos de *Vitis* spp. à *P. euvitidis*, resultante da ausência de metodologias padronizadas.

A utilização do solubilizador tensoativo hidrofílico Tween 20 em suspensão de esporos diminui a tensão superficial da água quando em contato com o tecido vegetal, especialmente em plantas com folhas com tricomas, favorecendo a infecção do patógeno. Copatti (2011), utilizando discos foliares classificou a cultivar Niágara Rosada como resistente ao patógeno, porém é sabido que, à campo, a cv. é suscetível a ferrugem. A concentração da suspensão de esporos pode interferir no processo de infecção da doença, requerendo a sua determinação para melhor representar os resultados obtidos. Assim, a otimização da metodologia em discos foliares de plantas com presença e ausência de tricomas permitirá caracterizar acessos de videira quanto a resistência à ferrugem (*P. euvitidis*).

Portanto, este trabalho teve como objetivo geral adaptar e avaliar a técnica de discos foliares para a fenotipagem e seleção de acessos com e sem tricomas do banco ativo de germoplasma de uva (BAG-uva) resistentes à ferrugem da videira (*P. euvitidis*). E como objetivos específicos (1) avaliar o efeito da concentração de Tween 20 adicionada à suspensão de urediniósporos sobre a infecção de *P. euvitidis*; (2) Avaliar o efeito da concentração de urediniósporos na infecção de *P. euvitidis*; (3) Validar a metodologia, *in vitro*, baseada em discos foliares, consistente para a identificação de fontes de resistência à ferrugem da videira (*P. euvitidis*), tanto para plantas com quanto para plantas sem tricomas; (4) E caracterizar acessos de videira quanto a resistência à *P. euvitidis*, através de bioensaio com discos foliares.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 VITICULTURA

A videira (*Vitis* spp.) é uma planta perene, lenhosa, sarmentosa e caducifolia, pertencente à classe Magnoliopsidae, subclasse Rosidae, ordem Rhamnales, família Vitaceae, (BARBIERI; STEEMPT, 2008), composta por aproximadamente 1.000 espécies, agrupadas em 17 gêneros. Na família Vitaceae, o gênero *Vitis*, é constituído por dois subgêneros o *Muscadinia* ($2n = 38$) e o *Euvitis* ($2n = 40$) (MANDELI, 2002; THIS; LACOMBE; THOMAS, 2006; TERRAL *et al.*, 2009; CAMARGO, 2012; GALET, 1979).

Dados históricos relatam que a evolução da viticultura, coincide com o desenvolvimento da humanidade. Na era cenozoica, no início do período terciário, haviam plantas selvagens de videira nos bosques sobre as árvores. No período quaternário, o homem começou a se alimentar dos frutos que encontrava. Acredita-se que o estabelecimento do cultivo tenha ocorrido paralelamente ao início da agricultura (SOUSA, 1996; THIS; LACOMBE; THOMAS, 2006; TÖPFER, 2011). A domesticação de diversas plantas permitiu ao homem selecionar e, posteriormente, cultivar diversas espécies alimentares destinadas ao consumo (SERENO; WIETHÖLTER; TERRA, 2008). Desde a domesticação, a cultura tem sido largamente cultivada devido ao consumo *in natura* do vinho, do suco e de geleia (MYLES *et al.*, 2011).

Registros arqueológicos e fósseis relatam a elaboração de vinhos no Egito durante o período Neolítico, que datam cerca de 5.000 à 6.000 anos (REISCH; PRATT, 1996). Nas tumbas dos faraós foram encontrados vários vasos de cerâmica contendo vinho, óleos e perfumes para fins religiosos (ANFACER, 2011). A criação dos vasos de cerâmica foi um fato marcante, por permitirem o armazenamento dos mesmos. Há 8.000 anos sementes de videiras foram encontradas na Geórgia, Turquia (MCGOVERN, 2003).

Geograficamente a videira foi distribuída para diversas regiões do mundo. Da Armênia propagou-se por toda Ásia menor, chegou a Trácia e Península Balcânica. Posteriormente a Síria, Egito e Grécia e transportadas por navegadores fenícios chegou a Roma. Na Grécia, o cultivo teve importante atuação sobre a história, cultura, crenças e costumes ligados ao fruto (SOUSA, 1996). Da Grécia a viticultura também

foi levada e difundida para Itália e Sicília (OLMO, 1995). Com a queda do Império Romano e a restrição ao uso de bebidas alcoólicas pela igreja a produção tanto da uva quanto do vinho reduziram. Desde então, a dispersão e distribuição da cultura foi realizada por meio da fé cristã. Os mosteiros católicos da Europa foram importantes guardiões de vinhos durante a idade média. A vitivinicultura volta a ter importância entre os séculos IX e XI por meio da presença da igreja durante o regime feudal na Europa. A Alemanha, Brodeaux e na França foram os principais centros de produção de uva e de vinho nos séculos VII e VIII (SOUSA, 1996). Foi por meio das navegações portuguesas e espanholas que a espécie *Vitis vinifera* foi introduzida no Novo Mundo, primeiramente no Caribe em 1493. Posteriormente, para a América Central e em seguida para toda a América (MIELE; MIOLO, 2003).

A viticultura mundial possui importância econômica e social amplamente reconhecida (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011). Além do consumo *in natura*, a uva é matéria prima para a elaboração de vinhos, sucos, destilados, vinagre, geleias, uvas secas, dentre outros produtos (VERDI *et al.*, 2005; HOFFMANN, 2008). Está diretamente relacionada a religiosidade, tradição e costumes culturais (VLAHOVIĆ *et al.*, 2012). Além disso, nos últimos cinquenta anos, o turismo vitícola apresentou crescimento significativo (SREDOJEVIĆ *et al.*, 2015). Estes são fatores que fazem desta, uma atividade com ampla oportunidade de mercado para a geração de emprego, renda e ocupação das propriedades rurais (HOFFMANN, 2008).

De acordo com os dados da FAO (2017), a produção mundial de uva foi de 1.912.034 milhões de toneladas. Sendo, 56% destinada a elaboração de vinho, suco e bebidas destiladas e 44% para consumo de uvas *in natura* ou uvas secas (OIV, 2016). A China é a maior produtora mundial, seguida da Itália, Estados Unidos, França e Espanha. A Europa é responsável por 40% do total de uva produzida, a Ásia por 31%, e a América por 20% (OIV, 2016).

2.1.1 Viticultura brasileira

No Brasil, em 1535, Martim Afonso de Souza e outros agricultores chegaram a Capitania de São Vicente (São Paulo) com as primeiras estacas de videira. Brá Cuba, em 1551, no Planalto de Piratininga (São Paulo) produziu o primeiro vinho (SOUSA, 1996).

Durante o século XVIII e XIX a viticultura em São Paulo foi drasticamente reduzida, e foi substituída pela mineração, e por lavouras de cana e café. E ganhou importância econômica entre 1830-1840 com o cultivo da cv. Isabel (*Vitis labrusca*), e em 1894 da cv. Niágara Branca, oriundas dos Estados Unidos, que posteriormente foi distribuída para as demais regiões produtoras de uva (SOUSA, 1996).

A viticultura brasileira, é considerada uma atividade econômica recente, quando comparada com os países produtores de uva tradicionais, com avanços significativos nos últimos 50 anos (MELLO, 2014; CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011). Atualmente, a área de produção vitícola no Brasil soma 79,1 mil hectares (OIV, 2018). Segundo dados da FAO de (2017) o Brasil é o 11º produtor mundial, com produção de aproximadamente 1.912.034 toneladas.

O cultivo que antes era restrito ao estado do Rio Grande do Sul, ultrapassou fronteiras, com grande potencial de alternativa frutícola ocupou diferentes regiões brasileiras (IBRAVIN, 2018; RADMANN; BIANCHI, 2008). A diversidade climática permite a elaboração de produtos diferenciados e de qualidade, que contribuem para a evolução do vinho brasileiro (MALINOVSKI *et al.*, 2012; WURZ *et al.*, 2017).

Com relação a produção de uva de mesa, o maior produtor é o estado de Pernambuco (158.210 t), seguido de São Paulo (57.412 t), Bahia, Rio Grande do Sul, Paraná, Espírito Santo, Minas Gerais, Santa Catarina, Paraíba e Goiás (IBGE, 2017). Na produção de vinho, o país se consolidou como o quinto maior produtor do Hemisfério Sul e certamente é um dos mercados em crescimento (OIV, 2018; IBRAVIM, 2018). Com as produções mais representativas, o estado do Rio Grande do Sul (769.347 t) é o principal produtor, seguida de Santa Catarina (42.800 t), Pernambuco (21.001) e Paraná (6.191) (IBGE, 2017).

As doenças de plantas cultivadas consistem no principal fator causador de danos e perdas qualitativos e quantitativos dos produtos agrícolas (ALMANÇA; LERIN; CAVALCANTI, 2015). As condições climáticas predominantes nas regiões brasileiras produtoras de uva favorecem o desenvolvimento de doenças como o míldio (*Plasmopara viticola* (Berk & Curt.) Berl. & de Toni), antracnose (*Elsinoe ampelina* (de Bary) Scheer), podridão de cacho (*Glomerella cingulata* (Stonemam) Spauld & Schrenk;), podridão cinzenta da uva (*Botrytis cinerea* Pers.), oídio (*Uncinula necator* (Schw.) Burr.), ferrugem (*Phakopsora euvitidis* Ono), dentre outros (AMORIM; KUNIYUKI 1997; SÔNEGO; GARRIDO, 2003; ALMANÇA; LERIN; CAVALCANTI, 2015). A importância em acarretar prejuízos econômicos de cada qual, varia de acordo

com a localização geográfica da produção, nível de resistência do material vegetal e práticas de manejo (ALMANÇA; LERIN; CAVALCANTI, 2015).

Dentre os patógenos que afetam a videira no Brasil com potencial de causar epidemia na presença de condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento e ausência de medidas eficiente de controle (SÔNEGO; GARRIDO; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2005; TESSMANN; VIDA, 2005; NOGUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2017), destaca-se o fungo *P. euvitidis*, agente causal da ferrugem da videira (ONO, 2000; TESSMANN *et al.*, 2004).

2.2 FERRUGEM DA VIDEIRA

2.2.1 Taxonomia e nomenclatura

Na América do Norte, dois fungos causadores da ferrugem foram identificados em *Vitis vinifera*, *Uredo vitis* Thum, em Aiken, Carolina do Sul, Estados Unidos, em 1968 (THÜMEN, 1878) e *Uredo vialae* Lagerh, observado próximo a Kingston, Jamaica, África (LAGERHEIM, 1890). Posteriormente, por se tratarem da mesma espécie, estes foram nomeados de *Phakopsora ampelopsidis* Diet. & Syd (HIRATSUKA, 1935; HIRATSUKA, 1900). No século XIX, a ocorrência de ferrugem foi relatada na Ásia, em Tóquio, no Japão em plantas de *Angiopsora ampelopsidis*. Diet. & Syd (Vitaceae), causada por *P. ampelopsidis*, acreditava-se ser o mesmo patógeno agente causal da ferrugem da videira (DIETEL, 1898). Sydow (1899), caracterizou que o fungo fitopatogênico causador da ferrugem da folha da Hera de Boston (*Parthenocissus tricuspidata* Thuem) e o denominou de *Phakopsora vitis* Thuem. Ono (2000) realizou uma nova classificação das ferrugens de acordo com a morfologia e a especificidade de hospedeiro. Então *P. ampelopsidis*, é o agente causal da doença apenas em *Ampelopsis* spp., *P. vitis* em *Parthenocussus* spp. e *P. euvitidis* em *Vitis* spp., hospedeiros pertencentes à família Vitaceae. O estudo feito por Ono (2000) foi confirmado em estudos moleculares posteriores, realizado por de Chatasiri e Ono (2008), o qual separou as três espécies em clados filogenéticos distintos dentro do gênero *Phakopsora* (MENDES; FREITAS, 2005). A espécie *Phakopsora uva* Buriticá; Hennen também foi relatada por Buriticá (1994) como agente causal da ferrugem em videiras na Colômbia e no México. No entanto, a ocorrência e distribuição geográfica deste agente causal, ainda não foram elucidadas (ONO, 2000). Portanto, o agente

causal da ferrugem da videira (*Vitis* spp.) é o fungo *P. euvitis* Ono, (ONO, 2000), pertencente ao filo Basidiomycota, classe Uredinomycetes, ordem Uredinales, família Phakopsoraceae e gênero *Phakopsora* (PATIL *et al.*, 1998; OKANE; ONO, 2018).

2.2.2 Distribuição geográfica

A ocorrência do fungo fitopatogênico *P. euvitis*, já foi relatada na Ásia (HIRATSUKA de 1935), Américas, (ONO, 2000; TESSMANN; VIDA; LOPES, 2003) e na Oceania (WEINERT *et al.*, 2003) e considerado ausente na Europa. Na Austrália, o fungo está na lista de patógenos erradicados. Na América do Sul, além do Brasil o fungo foi diagnosticado no Paraguai (PRIMIANO *et al.*, 2017). No Brasil, o primeiro registro da doença ocorreu em 2001, em parreirais comerciais da cultivar Itália, no município de Jandaia do Sul, no estado do Paraná (TESSMANN; VIDA; LOPES, 2003; TESSMANN *et al.*, 2004). Posteriormente, foi relatada nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Bahia (TESSMANN *et al.*, 2004), Mato Grosso (SOUZA, 2004), Rio Grande do Sul (GAVA; SÔNEGO; GARRIDO, 2003; BAYER; COSTA, 2006), Santa Catarina (SONEGO; GARIDO; GAVA, 2005), Espírito Santo (COSTA; VENTURA, 2009) Roraima (HALFELD-VIEIRA; NECHET; BARBOSA, 2009), Minas Gerais (XAVIER *et al.*, 2012), Goiás (GOMES *et al.*, 2016), Pernambuco, Paraíba e Rio de Janeiro (PRIMIANO *et al.*, 2017).

A introdução do patógeno no Brasil, ainda não foi esclarecida. Especula-se que o ingresso da doença ocorreu por meio do transporte de uredinósporos na atmosfera ou através da importação de material vegetal contaminado do Japão para o norte do Paraná. Devido à falta de cultivares resistentes, o patógeno espalhou-se com sucesso para a maioria das regiões brasileiras produtoras de uva (PRIMIANO *et al.*, 2017; TESSMANN; VIDA, 2005). Atualmente, é considerada uma doença endêmica, com potencial de causar epidemia, caso haja condições ambientais propícias aos seu desenvolvimento e medidas de controle efetivas não sejam realizadas (SÔNEGO; GARRIDO; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2005; TESSMANN; VIDA, 2005; NOGUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2017).

2.2.3 Epidemiologia e Sintomatologia

No ciclo das relações patógeno-hospedeiro, os urediniósporos de *P. euvitis* ao atingirem a superfície foliar de uma planta suscetível, passam a desenvolver os mecanismos de pré-penetração (BEDENDO, 2011). A germinação dos urediniósporos são observadas em uma faixa de temperatura que varia de 8 à 30°C, sendo a temperatura ótima de 24 à 25°C, na presença ou ausência de luz, com período de molhamento foliar superior a 12 horas. Acredita-se que o fungo biotrófico infecta folhas jovens e principalmente, folhas maduras, as quais apresentam estômatos desenvolvidos (NARUZAWA *et al.*, 2006; ANGELOTTI *et al.*, 2011; EDWARDS, 2015; PRIMIANO *et al.*, 2017). A penetração ocorre via estômato (LEU 1988; PRIMIANO *et al.*, 2017). Durante a colonização, assim como nas demais ferrugens, pressupõe-se que micélio do patógeno cresça intercelularmente através do mesofilo, produzindo haustórios e enzimas líticas para a infecção (STAPLES, 2000; MENDGEN; HAHN, 2002; NOGUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2017). Ao colonizar o tecido, induz o aparecimento de estruturas de frutificação, denominadas urédias, que são pústulas, inicialmente pequenas, circulares de coloração amarela a alaranjada sob a face abaxial das folhas (Figura 1). As pústulas são formadas cinco a sete dias após a inoculação, e aumentam de tamanho, tornando-se irregular e necróticas, formada por inúmeras uredias e urediniósporos. Oposto as pústulas, na superfície adaxial, ocorre a necrose do tecido, formando lesões de coloração castanha a avermelhada de tamanho variáveis e formato angular (LEU; WU, 1983; TESSMANN *et al.*, 2004; SONEGO; GARIDO; GAVA, 2005; ANGELOTTI, 2006; EDWARDS, 2015). Em estádios posteriores ao aparecimento da necrose, ocorre a formação da télia, com coloração castanha escura no entorno da urédia (MENDES; FREITAS, 2005). A germinação dos teliósporos ocorrem em uma ampla gama de temperaturas de 10 à 30°C, com temperaturas ótimas de 15 à 25°C (EDWARDS, 2015).

Figura 1 – Folha de videira apresentando os sinais típicos da ferrugem, com a formação de pústulas de coloração amarela na superfície adaxial.

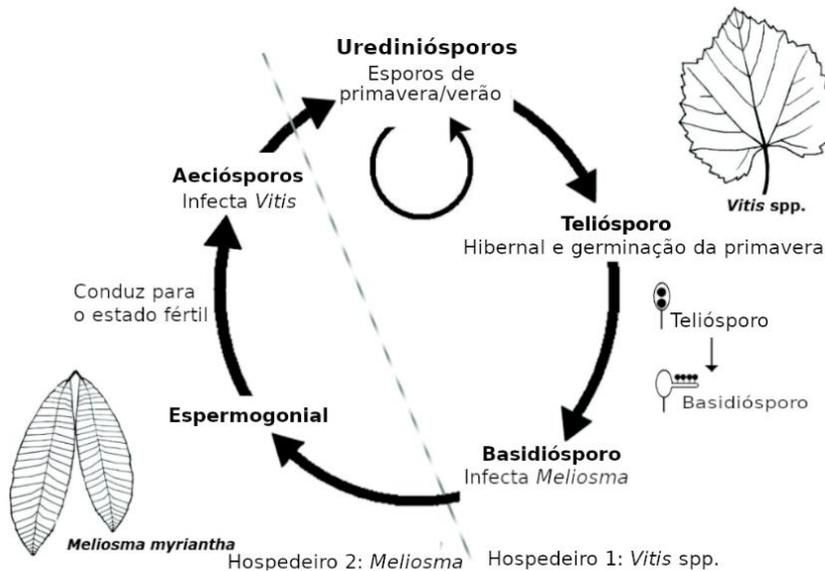


Fonte: Elaborado pelo autor.

O ciclo de vida completo do patógeno é do tipo macrocíclica (possui todos estádios espóricos), constituído por cinco fase, fase 0 - espermogonial que produz espermácias (n) e hifas receptivas (n); fase I - aecial que produz os aeciósporos (n + n); a fase II uredinial que produz os urediniósporos (n + n); a fase III - telial que produz teliósporos (2n); e a fase IV - basidial que produz os basidiósporos (n). A doença ainda é classificada como heteróica, pois, as fases 0 e I ocorrem em *Meliosma myriantha* de ocorrência apenas na Ásia, (JACKSON, 1931; LEU, 1988; ONO, 2000). As fases II, III e IV correm na videira (*Vitis* spp.), como representado na Figura 2. No Brasil, observam-se apenas as fases uredinial e telial. Pressupõe-se que os urediniósporos constituem o inóculo primário e secundário da doença (TESSMANN; VIDA, 2005).

A disseminação a longas distâncias dos urediniósporos geralmente ocorre pela ação do vento. Outras formas de disseminação do patógeno são através de material vegetativo contaminado ou pelo transporte dos esporos realizado por humanos ou veículos (LEU, 1988; SONEGO; GARIDO; GAVA, 2005). A influência da chuva na liberação dos urediniósporos ainda precisa ser estudada (PRIMIANO *et al.*, 2017).

Figura 2 - Ciclo de vida do patógeno *Phakopsora euvtis*, agente causal da ferrugem da videira.



Fonte: Adaptado de SPHD, 2015 *apud* Hennessy, NT Government, DPIFM 2006.

Sob alta severidade da doença, as lesões necróticas são densamente distribuídas sobre o limbo foliar e a assimilação de CO₂ reduzida, comprometendo a taxa fotossintética das folhas. O patógeno sequestra carbono e desvia os metabolitos dos produtos fotossintéticos para seu próprio benefício. Os danos causados por *P. euvtis* são semelhantes aos causados por patógenos necrotróficos ou hemibiotróficos (TESSMANN *et al.*, 2004; HODSON, 2011; HELFER, 2013; NOGUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2017). Na maioria das vezes, os patógenos causadores de ferrugem reduzem a assimilação de CO₂ limitado à área lesionada invadida por micélios de fungos (SCHOLE; ROLFE, 1996). Já os patógenos necrotróficos reduzem a assimilação de CO₂ nas regiões assintomáticas de folhas doentes. Esse fenômeno é chamado de "lesão virtual", que representa a área foliar onde a fotossíntese é nula (NOGUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2017). Com a redução da área fotossinteticamente ativa, há o comprometimento do desenvolvimento normal da planta, acarretando na queda precoce das folhas. Desfolha precoce anterior a maturação dos frutos, reduzirá a qualidade do mesmo (TESSMANN *et al.*, 2004; HODSON, 2011). As plantas perenes utilizam a estratégia de acúmulo de reservas no final do ciclo produtivo, armazenando durante o período de repouso hibernar para utilizá-los no desenvolvimento vegetativo na próxima estação de cultivo. Bennett (2002), demonstrou que a redução

das reservas de carboidratos da videira está diretamente relacionada a redução de 50% nas inflorescências no ano seguinte, o que resultará em redução da produção nas próximas safras (SONEGO; GARIDO; GAVA, 2005; EDWARDS, 2015).

Nas regiões de clima tropical e subtropical, a ferrugem da videira pode ocorrer em todo o ciclo das plantas e ser mais severa, pois a sobrevivência do fungo pode ser favorecida pela presença das folhas e a possibilidade de produzir mais de uma safra por ano. Já nas regiões de clima temperado, a doença tem sido observada somente no final do ciclo da cultura (ONO 2000; SONEGO; GARIDO; GAVA, 2005; WEINERT *et al.*, 2003). Por este motivo, apresenta maior importância nos trópicos do que nas regiões temperadas, independente da ocorrência do hospedeiro alternativo (LEU, 1988; ONO, 2000). A ferrugem já é considerada uma das principais doenças em uvas de mesa no noroeste do estado de São Paulo (NAVES; GARRIDO; SÔNEGO, 2006).

2.2.4 Influência das mudanças climáticas sob à Ferrugem da videira no Brasil

Nas produções agrícolas, a ocorrência de indivíduos doentes é resultante de uma série de eventos simultâneos, ilustrados pelo tetraedro da doença, constituído por patógeno virulento, hospedeiro suscetível, condições ambientais favoráveis e a influência do homem no manejo (AMORIM; PASCHOLATI, 2011; AGRIOS 2005). As condições climáticas podem favorecer ou impedir o desenvolvimento do hospedeiro e do patógeno, conseqüentemente, a doença. Afetando o início, o desenvolvimento, a intensidade da doença e a disseminação do patógeno. Pequenas alterações neste componente, pode alterar a dinâmica do patossistema e favorecer a ocorrência de epidemias. Considerar a influência do ambiente sob cada componente biótico, incluindo as interações entre patógeno-hospedeiro, ambiente-patogeno e ambiente-hospedeiro, e como essas interações se modificam ao longo do tempo são imprescindíveis (DIXON, 2012; NOPSA; THOMAS-SHARMA; GARRETT, 2014).

Acredita-se que as perdas com doenças pré e pós-colheita são de aproximadamente 20 a 25% das culturas colhidas em todo o mundo. Projeções indicam que está porcentagem aumentará em virtude das mudanças climáticas (DIXON, 2012). Possivelmente, modificações na importância relativa das pragas e doenças das principais culturas podem ocorrer em um futuro próximo, em decorrência das mudanças nas condições climáticas (GHINI; HAMADA; BETTIOL, 2011; PRIMIANO *et al.*, 2017; PONTI *et al.*, 2018; HODSON, 2011). O Painel

Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) prevê alterações nas temperaturas médias, umidade relativa do ar e precipitações. Garrido & Angelotti (2011) realizam uma projeção para a década de 2080 que prevê o aumento significativo da severidade da ferrugem da videira nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, nos meses de fevereiro a abril. E no sudoeste do Paraná, de abril a junho, com intensidades similares às encontradas na atualidade. A epidemia é fortemente influenciada pelas condições climáticas (SCAPIN-BUFFARA *et al.*, 2018), exigindo a adoção de práticas de manejo eficientes no controle das mesmas sob a nova condição ambiental (NOPSA; THOMAS-SHARMA; GARRETT, 2014).

2.2.5 Controle da ferrugem

Os métodos que visam proteger plantas contra patógenos, empregados no MID, classificam-se em cultural, químico e genético (GHINI; BETTIOL, 2000). O controle genético consiste no método mais eficiente para o controle de doenças de plantas através do uso de cultivares resistentes ou parcialmente resistente, por meio da seleção de fontes de resistência e a transferência desta para cultivares comercialmente aceitas (MONTAIGNE; COELHO; KHEFIFI, 2016). Assim, contribui de forma significativa na redução do uso de produtos químicos no setor vitícola (ELLINGBOE, 1978). A escolha da cultivar, deve levar em consideração as características agronômicas, perspectiva de mercado (SIVCEV; SIVCEV; RANKOVIC-VASIC, 2010) e resistência a doenças. A escolha por cultivar resistentes deve ser sempre a primeira opção dentre as diversas medidas de controle (CANTERI; GIGLIOTI; SUMIDA, 2015).

2.3 MELHORAMENTO GENÉTICO COM ÊNFASE NA RESISTÊNCIA A DOENÇAS

O melhoramento genético vegetal é uma ciência, a qual realiza modificações genéticas nas plantas a fim de torná-las cada vez mais úteis (BORÉM; MIRANDA, 2009). A ação de agentes fitopatogênicos prejudiciais, podem ser significativamente reduzidas, por meio de estratégias eficientes de controle (OERKE, 2005). A resistência genética a doenças destaca-se como um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético, por apresentar menor agressividade ao meio ambiente se comparada com o uso de produtos químicos (BESPALHOK; GUERRA;

OLIVEIRA, 2014), proporcionando a estabilização da produtividade das safras além de reduzir os custos de produção (BORÉM; MIRANDA, 2009). A resistência de um hospedeiro a presença do patógeno é definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos (PASCHOLATI, 2011).

Os centros de origem, são locais onde há a presença de variabilidade genética da espécie (LEPPIK, 1970). O provável centro de origem paleontológico da videira é a atual Groelândia, local onde foram encontrados os mais antigos fósseis de seus ancestrais, acredita-se que devido à glaciação, extinguiu-se daquele local (BUSIN, 2002). Após a separação dos continentes norte-americano do euro-asiático, e por meio da seleção natural, o gênero *Vitis* está distribuído em três centros de origem, o Americano, Eurasiático e Asiático (SOUSA, 1996; MIELE; MIOLO, 2003; TÖPFER *et al.*, 2011).

Na América Central e do Norte, no centro de origem americano, são encontradas aproximadamente 30 espécies pertencentes ao gênero *Vitis*, como exemplo: *Vitis labrusca*, essa espécie é fontes de resistência às doenças. Acredita-se que as espécies americanas desenvolveram resistência as principais pragas e doenças, por terem co-evoluído com as mesmas. Na Europa e na Ásia Menor, centro Euroasiático há apenas uma espécie, *Vitis vinifera*, fonte de atributos de qualidade enológica, no entanto, sensível às doenças fúngicas e exigentes em tratos culturais (OLMO, 1986). Na Ásia, no centro de origem asiático, são encontradas aproximadamente 50 espécies, dentre elas, *V. amurensis* (TÖPFER *et al.*, 2011). Embora as espécies americanas e asiáticas sejam fontes de resistência aos principais patógenos da videira, são espécies selvagens de baixa qualidade enológica (MIELE; MIOLO, 2003; ADAM-BLONDON *et al.*, 2004).

A exploração da diversidade genética da videira foi limitada após a domesticação (MYLES *et al.*, 2011). Embora novas cultivares e híbridos interespecíficos tenham sido criados desde 1800 (TÖPFER *et al.*, 2011), as espécies *V. vinifera* e *V. labrusca* são as de maior importância econômica. Existem aproximadamente 8.000 a 12.000 cultivares de videira no mundo, usadas principalmente para a produção de vinho (56,8%), uvas de mesa (27,0%), duplo propósito - vinho e mesa (7,3%), e frutas secas (0,7%), as principais variedades comerciais são suscetíveis a vários fitopatógenos (MYLES *et al.*, 2011).

Historicamente, as primeiras evidências do melhoramento genético da videira, ocorram no século XVIII com a criação e cultivo de híbridos americanos, a exemplo da cultivar Isabel, híbrido interespecífico de *V. labrusca* x *V. vinifera*, em 1816. E Concord, híbrido interespecífico proveniente de Catawba x *V. labrusca*, em 1843 (TÖPFER *et al.*, 2011). Na Europa, com a introdução de *Uncinula necator*, agente causal do oídio, em 1845, da Filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) em 1863 e do míldio em 1878, foram observadas danos e perdas significativas a viticultura tradicional Europeia, eliminando muitos dos vinhedos (TÖPFER *et al.*, 2011; WINKLER, 1980). Na França, no final do século XIX, instituições públicas e viticultores, em seus programas de melhoramento, buscaram combinar resistência genética a doenças oriunda de *V. labrusca* a qualidade enológica de *V. vinifera*, sendo os produtos denominados híbridos interespecíficos franceses, Seibel 1077 e Courdec 2. Em 1929, a área ocupada pelos híbridos franceses era de aproximadamente 250.000 hectares (ha) chegando mais tarde, em 1958, à cerca de 500.000 ha. No entanto, não obtiveram sucesso no mercado devido à baixa qualidade do vinho, resultando na redução da área plantada, associada ao surgimento de fungicidas a base de enxofre e cobre no controle dos fitopatógenos, perpetuando-se até os dias atuais. Estes fatos contribuíram para o fim programas de melhoramento genético Frances e o aumento do cultivo de *V. vinifera* (TÖPFER *et al.*, 2011).

Diante de uma outra perspectiva, programas de melhoramento de países como Alemanha, Hungria, e outros, usaram os híbridos franceses na busca de cultivares resistentes as principais doenças fúngicas (TÖPFER *et al.*, 2011). No final do século XX, as primeiras cultivares de videira com resistência genética ao míldio denominadas "PIWI" (do alemão: *Pilzwidestandsfähige*, "resistente a doenças") (SIVCEV; SIVCEV; RANKOVIC-VASIC, 2010), foram registradas. Dentre elas, 'Regent', oriunda do cruzamento entre Diana x Chamboucin criada e registrada entre 1967-1995 por Alleweldt no instituto JKI Geilweilerhof. E 'Felicia' oriunda do cruzamento ente Sirius x Vidal Blanc, que iniciou em 1984 por Eibach e Töpfer no instituto JKI Geilweilerhof. (TÖPFER *et al.*, 2011). As novas cultivares, devido ao fato de serem oriundas de várias gerações de retrocruzamentos, apresentam composição genética de *V. vinifera* > 80%, não sendo consideradas "cultivares interespecíficas" e sim, registradas no Registro de variedades do catálogo de variedades internacionais de *Vitis* (<http://www.genres.de/idb/vitis/vitis.htm>) como *V. vinifera* (SIVCEV; SIVCEV; RANKOVIC-VASIC, 2010).

As cultivares Piwi, apresentam vasto mercado consumidor a ser explorado através da apresentação dos vinhos, afim de desmistificar a impressão de que híbridos interespecíficos produzem vinhos de baixa qualidade (FULLER; ALSTON; SAMBUCCI, 2014). Esforços estão sendo gerados na busca da valorização da matéria prima utilizada na elaboração destes vinhos, através da criação de uma marca "Au creux du nid", a inclusão do significado de PIWI na rotulagem, bem como, a concessão de medalhas (MONTAIGNE; COELHO; KHEFIFI, 2016).

Como as uvas viníferas foram introduzidas em regiões para além de seu habitat natural, eles eram frequentemente hibridizados com espécies nativas de *Vitis*, por exemplo na América do Norte, América Central e Japão. Isso resultou em híbridos melhor adaptados aos ambientes locais e habilitando a viticultura onde as videiras viníferas não poderiam sobreviver devido a sua suscetibilidade a doenças fúngicas ou inverno severo com geadas (ALLEWELDT; POSSINGHAM, 1988).

A criação de novas cultivares de videira é demorada, trabalhosa e de custo elevado. O potencial de produzir uvas com aumento do sabor, rendimento, valor nutricional e para a produção de vinhos com sabores distintos são boas razões para continuidade dos programas de melhoramento (ALLEWELDT G; POSSINGHAM, 1988; GÓMEZ-ZELEDÓN; KAISER, 2016).

Um novo momento marca a história do melhoramento genético visando à resistência a doenças da videira, através de estudos voltados a epidemiologia e busca de fontes de resistência à *P. euvitis*, no início do século XXI, após a detecção da ocorrência de ferrugem da videira em pomares comerciais do fruto.

O conhecimento sobre variabilidade genética de genótipos e os mecanismos de defesa, contra este fitopatógeno é muito limitado (ANGELOTTI *et al.*, 2008; ANDERSEN *et al.*, 2018). Contudo, as variantes econômicas e sustentáveis a longo prazo do setor vitícola, dependerão da exploração (MYLES *et al.*, 2011) da variabilidade genética para desenvolver novos cultivares ou promover melhorias nas cultivares tradicionais, que além de apresentarem características agrônômicas viáveis, e qualidade enológica, sejam tolerantes ou resistentes ao espectro de doenças primárias e potencias (OLIVEIRA *et al.*, 2005; TÖPFER *et al.*, 2011).

2.3.1 Identificação de fontes de resistência

Assim como as demais ferrugens, *P. euvitis* apresenta elevado potencial de causar danos significativos às plantas hospedeiras, o que faz deste patógeno uma ameaça importante à viticultura de modo geral (NOGUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2017). Para evitar danos severos assim como ocorreu com a cultura da soja, onde *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & P. Sydow), em 3 anos, tornou-se epidemia, causando perdas e danos significativos (BERGAMIN FILHO; AMORIM; REZENDE, 2011), a busca por fontes de resistência à *P. euvitis*, para a criação de novas cultivares para o controle genético é altamente desejável. A criação de novas cultivares de videira é um processo longo (MONTAIGNE; COELHO; KHEFIFI, 2016) e seguindo a lógica do melhoramento preventivo, é importante iniciar os estudos com a doença antes desta se tornar um problema mais sério e venha a causar dano.

Tanto as espécies vegetais quanto os patógenos, passam pelo processo de evolução, fato estes que impulsionaram uma série de programas de melhoramento para identificar acessos de germoplasmas resistentes a doenças, para introduzir características desejáveis presentes em espécies de menor importância econômica em espécies amplamente cultivadas em benefício da viticultura (LEPPIK, 1970). Pesquisa com a cultura da videira aumentaram significativamente nos últimos anos, através da exploração dos recursos de germoplasma de videira e análise da diversidade genética em uvas (THIS; LACOMBE; THOMAS, 2006). Os recursos genéticos vegetais incluem um conjunto de materiais hereditários, diferentes entre si, que apresentarem variabilidade genética, e que constituem todo patrimônio genético de uma espécie (germoplasma). Esse patrimônio genético é utilizado em pesquisa, especialmente nos programas de melhoramento genético (GUEDES; GOEDERT; BUSTAMANT, 1998; BORÉM; MIRANDA, 2009; VALOIS; SALOMÃO; ALLEM, 1996).

A primeira etapa de um programa de melhoramento genético com ênfase na resistência a qualquer doença, consiste na identificação seguida da seleção das fontes de genes de resistência, oriundas de espécies localizadas nos centros de origem, ou então, espécies, cultivares ou híbridos protegidos em bancos ativos de germoplasmas - BAGs (SIVIERO *et al.*, 2002; ANGELOTTI *et al.*, 2008; RAWAT, 2016; TÖPFER *et al.*, 2011).

O banco ativo de germoplasma consiste em uma estratégia de conservação do recurso genético vegetal *ex-situ*, definida como a preservação da diversidade biológica fora do seu hábitat natural (BORÉM; MIRANDA, 2009), que contém muitos acessos vegetais diferentes, coletados de várias regiões geográficas, constituídos por acessos resistentes a doenças (KELLER; FEUILLET; MESSMER, 2000). No Brasil, a rede de Bancos Ativos de Germoplasma, teve início no ano de 1976, atualmente denominada Plataforma Nacional de Recursos Genéticos. É constituída por 134 bancos ativos de germoplasma, 470 gêneros, 1130 espécies (nativas e exóticas) e mais de 150.000 acessos (AZEVEDO; BUSTAMANTE, 2014), sendo que, 90% de todas as espécies conservadas nas coleções de plantas da Embrapa são de espécies exóticas (BUSTAMANTE; FERREIRA, 2011). O BAG-uva armazena e protege a diversidade genética presente no gênero *Vitis*. Possui aproximadamente 1.249 acesso com mais de 40 espécies de *Vitis*. Como variedades de espécies cultivadas (*V. labrusca*, *V. vinifera*, *V. rotundifolia*, e *V. bourquina*), variedades híbridas interespecíficas e espécies silvestres dos três centros de origem da videira: Americano, Euroasiático e Asiático (BRASIL, 2014).

Os cruzamentos sexuais e as mutações naturais desempenharam um papel fundamental na evolução da videira cultivada (THIS *et al.*, 2006) para a produção de porta-enxertos e híbridos interespecíficos e novas cultivares (MANDELI, 2002; CAMARGO, 2012), com ênfase na seleção por imunidade ou ao menos para altos níveis de resistência e genes que conferem estas características são manipulados em gerações segregantes, (ELLINGBOE, 1978), introduzidos por introgressão (pequena quantidade de informações genética transferida de um acesso, espécie ou gênero para outro) entre plantas sexualmente compatíveis (BORÉM; MIRANDA, 2009; DANGL; HORVATH; STASKAWICZ, 2013), através da hibridação.

2.3.2 Interação planta-patógeno

Na natureza, grande parte das espécies vegetais apresentam resistência a doenças, embora algumas sejam suscetíveis a determinados patógenos (CAMARGO, 2011; AGRIOS, 2005). Isso porquê, a ocorrência ou não de uma determinada doença em um determinado hospedeiro, é resultante da interação entre planta e patógeno. As plantas possuem um complexo sistema de defesa para reconhecer o ataque de determinado patógeno e defender-se, divididos em pré-formados e pós-formados,

envolvendo estratégias estruturais e bioquímicas. As estratégias estruturais consistem em barreiras físicas, e as bioquímicas através da produção de substâncias tóxicas ao patógeno ou promovendo condições adversas ao estabelecimento deste na planta. Dentre os fatores estruturais pré-formados, presentes nas plantas antes mesmo do contato com os patógenos, destacam-se a cutícula, características dos estômatos, tricomas, espessura da parede celular. Uma vez que os patógenos superam as barreiras físicas à infecção, os receptores de plantas iniciam as vias de sinalização que impulsionam a expressão dos genes de resposta de defesa. O sistema imunológico de plantas depende de sua capacidade de reconhecer moléculas, realizar transdução de sinal e reagir defensivamente através de vias que envolvem muitos genes e seus produtos. Os mecanismos de defesa pós-formados, são divididos em estruturas de defesa celular, envolvendo agregação citoplasmática, halo, papila, camada de cortiça, lignificação da parede celular, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e também a síntese de compostos que funcionam como barreiras bioquímicas, como espécies reativas de oxigênio, proteínas R relacionadas à patogênese e fitoalexinas. A doença irá ocorrer devido a capacidade do patógeno em evitar o seu reconhecimento e/ou suprimir mecanismos de defesa do hospedeiro (STASKAWICZ, 2001; AGRIOS, 200; PASCHOLATI, 2011a; SALOMON; SESSA, 2012; ANDERSEN *et al.*, 2018).

Os mecanismos de defesa das plantas baseiam-se principalmente na evitação, resistência ou tolerância. Evitar opera antes do contato parasitário entre o hospedeiro e o parasita ser estabelecido e diminui a frequência de incidência. Após a infecção e estabelecimento, o hospedeiro pode resistir ao parasita diminuindo seu crescimento ou tolerando sua presença sofrendo relativamente poucos danos (VALE; PARLEVLLET; ZAMBOLIM, 2001). De acordo com a teoria da interação gene a gene de Flor (1955), o hospedeiro e o patógeno possuem sistemas gênicos complementares, genes de resistência das plantas são confrontados por genes de patogenicidade/avirulência do patógeno. Tanto fatores genéticos da planta quanto do patógeno são necessários para uma reação de defesa bem-sucedida da planta (KELLER; FEUILLET; MESSMER, 2000; CAMARGO, 2011). As fontes de resistência hereditária são denominadas genes de resistência (genes R) (ANDERSEN *et al.*, 2018). Plantas com um gene de resistência específico a determinada raça fisiológica do patógeno, impedirá a infecção, pois na presença de uma cultivar resistente, o patógeno por sua vez, é avirulento (BORÉM; MIRANDA, 2009). Genes de avirulência

(Avr) podem ser definidos como genes no patógeno que codificam um produto proteico que é condicionalmente reconhecido direta ou indiretamente apenas pelas plantas que contêm o gene R (STASKAWICZ, 2001). Para que haja resistência deve haver complementaridade entre pares de genes dominantes, um do hospedeiro e outro do respectivo patógeno. A ausência ou alteração do gene R da planta ou do Avr dominante do patógeno conduz a compatibilidade, ou seja, ao desenvolvimento da doença (LEPPIK, 1970). Se o patógeno não possui o gene Avr, este não será reconhecido pela planta, resultando na ocorrência da doença. Patógeno virulento, causa doença, mesmo na presença do gene R (BORÉM; MIRANDA, 2009). O reconhecimento específico do patógeno pela planta, resultando na indução da expressão gênica de defesa que desencadeiam reações fisiológicas de defesa resultando em morte celular hipersensível e acumulação de moléculas tóxicas ao patógeno e consequente na inibição do crescimento de patógenos. No entanto, se o hospedeiro da planta não contiver o gene R, o patógeno ainda é capaz de causar doença naquela planta, mesmo que ainda contenha o gene avr. Assim, a resistência na interação gene-por-gene é específica a raça (KELLER; FEUILLET; MESSMER, 2000; STASKAWICZ, 2001). E dificilmente o gene R fornece resistência de longa duração no campo, devido a sua implantação na monocultura o que pode induzir o surgimento de novas raças patogênicas (SONG *et al.*, 2003; DANGL; HORVATH; STASKAWICZ, 2013).

A resistência qualitativa, monogênica ou vertical, é definida como aquela contra uma ou algumas raças, mas não contra outras, pouco durável, envolvida nos eventos iniciais de percepção, os genes de reconhecimento, presença ou ausência de genes R. Plantas com este tipo de resistência ou são resistentes (sem sintomas) ou são suscetíveis (com sintomas). Os genes de resistência são agrupados em alguns loci no genoma ou existem como diferentes alelos conferindo resistência a raças de patógenos específicos. A resistência quantitativa, poligênica ou horizontal é resultante do efeito coletivo de vários genes de resistência agrupados em alguns loci no genoma ou presentes como diferentes alelos conferindo resistência as raças de patógenos específicos, pertencentes as vias metabólicas de defesa. Ocorre distribuição contínua de graus de resistência entre as plantas da progênie, variando de plantas altamente resistentes a altamente suscetíveis contra todas as raças do patógeno. A resistência genética a determinado patógeno é resultante de uma complexa interação com a planta hospedeira. Plantas contendo loci de resistências (genótipo) serão

responsáveis pela expressão de características estruturais ou bioquímicas relacionadas ao nível de resistência, resultando na expressão, intensidade ou ausência dos sinais e sintomas e de variáveis epidemiológicas (fenótipo), podendo resultar em maior período latente, redução do número de lesões, da taxa de desenvolvimento das pústulas, das lesões e da esporulação (KELLER; FEUILLET; MESSMER, 2000; BORÉM; MIRANDA, 2009; CAMARGO, 2011).

2.3.3. Análise fenotípica: Técnica de discos foliares

Os humanos selecionaram culturas resistentes a doenças ao longo da história da agricultura, inconscientemente (PIFFANELLI *et al.*, 2004). Considerando as características fisiológicas e o ciclo de vida da videira, os programas de melhoramento genético da cultura são extremamente longos e difusos, variando de 10 a 25 anos dependendo do nível de desenvolvimento do programa (TÖPFER *et al.*, 2011). Necessitando de procedimentos rápidos e confiáveis para a identificação de fontes de resistência e avaliação da interação patógeno-hospedeiro de uma grande população de plantas (DEGLÈNE-BENBRAHIM *et al.*, 2010). Neste aspecto, sistemas que acelerem o processo de seleção são importantes (CALONNEC *et al.*, 2012; CANTERI; GIGLIOTI; SUMIDA, 2015).

Programas de melhoramento genético da videira para a criação de cultivares com genes de resistência ao míldio estão fortemente estabelecidos, inúmeros estudos mostram que os genes de resistência ao míldio consistem em uma característica poligênica ou loci de características quantitativas (QTL) (TANKSLEY, 1993; MOREIRA *et al.*, 2010). Mediante estudos de mapeamento genético os QTLs que conferem resistência ao míldio são denominados de *Rpv* (*resistance to Plasmopara viticola*). Os QTLs já identificados são, *Rpv1*, *Rpv2*, *Rpv3*, *Rpv4*, *Rpv5*, *Rpv6*, *Rpv7*, *Rpv12* e *Rpv10* (MERDINOGLU *et al.*, 2003; WIEDEMANN-MERDINOGLU *et al.* 2006; WELTER *et al.*, 2007; BELLIN *et al.* 2009; MARGUERIT *et al.* 2009; SCHWANDER *et al.*, 2012; VENUTI *et al.*, 2013). Cada genótipo de uma população segregante deve ser testado em ensaios de campo replicados para determinar o fenótipo de resistência. Estas avaliações a campo podem ser auxiliadas por ensaios *in vitro* utilizando discos foliares (KELLER; FEUILLET; MESSMER, 2000).

Com o passar dos anos houve aumento na necessidade de métodos precisos para testes de suscetibilidade a doenças (PANUGANTI, 2015). A utilização de

bioensaios *in vitro* demonstraram respostas fisiológicas e fenotípicas na presença do patógeno (JANSEN *et al.*, 2018). O uso de discos foliares é uma técnica de triagem, replicável e de fácil execução que possibilita a seleção de fontes de resistência (SCHWANDER *et al.*, 2012; TYSON; AFULLERTON, 2015) e a eliminação precoce de genótipos, os quais carecem de resistência, de forma rápida e com nível satisfatório de confiabilidade (GÓMEZ-ZELEDÓN; KAISER, 2016). Este bioensaio, apresenta algumas vantagens, já relatada por Deglène-Benbrahim *et al.*, (2010); Calonnec *et al.*, (2012), como: experimento de tamanho compactado, disponibilidade de um alto número de repetições por genótipo, concentração de inóculo, condições ambientais controladas e curto espaço de tempo para execução e baixo custo quando comparado a conduções a campo e análises moleculares.

Segundo Cohen (1993) ao avaliar a resistência de amostras de melão (*Cucumis melo*) ao oídio - raça 1 de *Sphaerotheca fuliginea*, os resultados obtidos através da técnica de discos foliares correlacionam com precisão com os obtidos em plantas conduzidas à campo. Brown *et al.*, (1999) obteve os mesmos resultados com o míldio da videira, concluindo que o método é mais prático do que o método feito em plantas em estufa para triagem de grandes populações. Atualmente as análises com discos foliares são utilizadas rotineiramente na determinação fenotípica de níveis de resistência de diferentes genótipos ao míldio da videira (SCHWANDER *et al.*, 2012; CALONNEC *et al.*, 2012; SAIFER, 2018). A técnica também foi utilizada por Santos *et al.*, (2009) para comparar métodos de caracterização da resistência do cacaueteiro (*Theobroma cacao*) à podridão-parda (*Phytophthora palmivora*). Tyson; Afullerton, (2015) desenvolveram um bioensaio em disco foliar para identificação de genótipos de taro com tolerância a *Phytophthora colocasiae*, agente causal da ferrugem do taro (*Colocas esculenta*). Guyer *et al.*, (2015) fez uso da mesma para testar o potencial de bactérias no controle de *P. infestans*, com análise automatizada de imagens. Gómez-zeledón; Kaiser, (2016) descreveram um bioensaio prolongado e ligeiramente modificado para a avaliação da virulência por meio da intensidade da esporulação de *P. viticola*. Sánchez-mora *et al.*, (2017), avaliou o desempenho de 10 plantas contendo os alelos *Rpv1* e *Rpv3*, que conferem de resistência ao míldio, após a inoculação de *P. viticola* os genótipos mostraram maior nível de resistência. Trabalhos demonstram que a técnica do disco foliar, também mostra-se promissora, eficiente e prática para a avaliação da virulência e resistência de *P. viticola* a fungicidas (WONG; WILCOX,

2000; DEGLÈNE-BENBRAHIM *et al.*, 2010; CALONNEC *et al.*, 2012; GÓMEZ-ZELEDÓN; ZIPPER; SPRING, 2013).

As espécies de videira originadas das regiões tropicais, tais como, *V. simpsonii*, *V. tiliifolia* e *V. coriaceae*, mostraram-se resistentes à ferrugem. As cultivares originadas de *V. labrusca*, *V. vinifera*, *V. aestivalis* e de outras espécies nativas em regiões de clima temperado são mais susceptíveis à ferrugem. No Brasil, em condições de campo, as cultivares de *V. labrusca*, *V. vinifera* e *V. rotundifolia* também se mostram suscetíveis a doença (SÔNEGO; GARRIDO; GAVA, 2005). Na Austrália, Hennessy; Daly; Hearnden, 2007 avaliaram os níveis de resistência de porta-enxerto e seleções de 14 híbridos do gênero *Vitis*, principalmente *V. vinifera*, utilizando a técnica de discos foliares. A maioria dos genótipos avaliados apresentaram suscetibilidade e alta suscetibilidade ao patógeno. As seleções híbridas interespecíficas '41B' e 'Seibel 128' (ambos porta-enxerto) e 'Aurore' apresentaram maior nível de resistência ao patógeno. Angeliotti (2008) identificou que os genótipos mais resistentes foram as cultivares porta-enxertos IAC313, IAC572 e IAC766, onde a eficiência da infecção foi baixa, o tamanho de pústulas e produção de urediniosporos foram menores. O grau de infecção aumenta com o aumento na concentração do nódulo. A ferrugem coloniza, folhas jovens e folhas maduras de videira. *In vitro* Copatti (2011) observou que os genótipos *V. candidans*, *V. longii*, *V. caribea*, *V. amurensis*, Gropel, IAC-572 apresentaram grau moderado de resistência à doença. Os genótipos Baco 10, *V. thumbergii* e *V. vulpina* apresentam maior suscetibilidade à doença. O mesmo autor relatou que o método utilizado se mostrou eficaz, resultando no aparecimento dos sintomas típicos da ferrugem, assim como no campo. No entanto, problemas com a metodologia utilizada também foram diagnosticados nas plantas que apresentavam pilosidade em suas folhas. Mostrando que a pilosidade, nesse caso, atuou como barreira física (resistência estrutural), impedindo a penetração do patógeno, mas, naturalmente o patógeno é capaz de romper esta barreira. Gomes (2016), destaca a importância da realização de estudo mais detalhados e efetivação do bioensaio usando a técnica de discos foliares para avaliação dos níveis de resistência a *P. euvitis*.

Compreender a resistência à ferrugem da videira e a resistência não hospedeira da planta beneficiarão a viticultura em um possível cenário de importância econômica da doença. Estudos de interações moleculares de diversidade genética do hospedeiro e do patógeno, identificação da origem da resistência e caracterização dos

genes de resistências através do mapeamento genético podem contribuir significativamente para a redução dos possíveis impactos de *P. euvitis* e combinar, produção de frutas de alta qualidade com resistência efetiva a doenças, neste caso, a ferrugem da videira (OLMO, 1986; SÁNCHEZ-MORA *et al.*, 2017).

O projeto que deu origem a esta dissertação consiste em uma parceria entre a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA Uva e Vinho, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC - campus Curitibanos e Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC – Centro de Ciências Agrárias, Lages, o qual avalia a metodologia de discos foliares para o processo de análise dos níveis de resistência dos acessos do BAG-uva à ferrugem da videira. A importância é recomendar acessos com resistência genética à *P. euvitis* além de hibridações para a utilização em programas de melhoramento da videira, e fortalecer estudos de interação planta patógeno, e conseqüentemente reduzir perdas e danos do patógeno em parreiras comerciais de uva no Brasil e no mundo.

3 CAPÍTULO 1. BIOENSAIO *IN VITRO* COM DISCOS FOLIARES PARA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS À FERRUGEM DA VIDEIRA

3.1 RESUMO

O fungo biotrófico *Phakopsora euvtis* Ono é o agente causal da ferrugem da videira. A doença, originária da Ásia, é ausente na Europa e considerada endêmica no Brasil. Com a expansão da viticultura, a eminência das mudanças climáticas e a ausência de estratégias eficientes de controle, há o risco potencial do patógeno aumentar as perdas e danos à cultura no Brasil e no mundo. O objetivo deste trabalho foi adaptar e avaliar a técnica de discos foliares para a fenotipagem e seleção de acessos com e sem tricomas do BAG-Uva resistentes à ferrugem da videira. Foram realizados três experimentos para otimizar a metodologia: (1) determinação da concentração mais eficaz do solubilizador tensoativo hidrofílico Tween 20, adicionado a suspensão de urediniósporos/mL no estabelecimento do patógeno em discos foliares com e sem tricomas; (2) Determinação da concentração de urediniósporos que melhor expresse a ocorrência da doença sobre discos foliares com e sem tricomas; (3) Para a validação do bioensaio foram utilizados discos foliares dos acessos Niágara Rosada, *Vitis shuttleworthii* e *Vitis candicans*, com tricomas, e 420A, Seibel 128 e IAC 766, sem tricomas, descritas em outros estudos como suscetível, intermediário e resistente à ferrugem, respectivamente. Sobre cada disco foi depositada uma gota de 30 μ L de suspensão na concentração 30.000 urediniósporo/mL sem Tween 20. Os parâmetros de resistência avaliados foram o período latente; o número de pústulas/disco e por cm^2 ; tamanho médio de pústulas; intensidade de esporulação; severidade e AACPSD. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando significativo ao teste de comparação de médias de Tukey, análise de regressão e análise multivariada dos componentes principais e de similaridade entre os genótipos. Na ausência de Tween 20 foi observado período latente de 6 dias, maior número de pústulas por disco e por cm^2 , maior diâmetro de pústulas, e maior quantidade de urediniósporos por disco e por pústula quando comparado aos tratamentos com Tween 20 em discos com e sem tricomas. Utilizando 30.000 urediniósporos/mL o período latente foi de 6 dias, as variáveis avaliadas apresentam valores intermediários comparado as demais concentrações. O período latente, a severidade (%) e a AACPSD permitiram discriminar os acessos quanto ao nível de resistência à doença. Acessos com pilosidade apresentaram menor número de pústulas, porém de maior diâmetro, em comparação aos acessos sem pilosidade. O porta-enxerto 420A (acesso 1781) apresentou período latente de 5 dias, maior severidade (55,36%) e AACPSD de 147,55, sendo classificado como muito suscetível. Niágara Rosada (acesso 2798) apresentou período latente de 6 dias, severidade de 16,32% e AACPSD de 35,29 e *V. shuttleworthii* (acesso 2378) apresentou período latente 6,5 dias, severidade de 11,51% e AACPSD de 27,12, ambas foram classificadas como modernamente suscetíveis. *V. candicans* (acesso 2206) e Seibel 128 (acesso 999) apresentaram período latente de 8 dias, severidade de 4,18 e 3,66% e AACPSD de 7,71 e 6,63, respectivamente, sendo enquadrados como parcialmente resistentes. O acesso IAC 766 (acesso 2033) apresentou período de latência de 10 dias, severidade de 0,03 e AACPSD de 0,01, sendo enquadrado como resistente ao isolado do patógeno utilizado. O uso da técnica de discos foliares mostra-se rápida e consistente para a

fenotipagem da resistência *P. euvitis*, podendo ser empregada na seleção de progenitores resistentes, na triagem populações segregantes, em estudos de fisiologia do parasitismo e possíveis testes de patogenicidade de *P. euvitis*.

Palavras-chave: Melhoramento genético, resistência à doenças, viticultura, interação planta-patógeno.

3.2 INTRODUÇÃO

O fungo biotrófico *Phakopsora euvitis* Ono é o agente causal da ferrugem da videira (ONO, 2000). No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez em 2001 no estado do Paraná, posteriormente nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Bahia (TESSMANN *et al.*, 2004), Mato Grosso (SOUZA, 2004), Rio Grande do Sul (GAVA *et al.*, 2003), Santa Catarina (SONEGO; GARIDO; GAVA, 2005), Espírito Santo (COSTA; VENTURA, 2009), Roraima (HALFELD-VIEIRA; NECHET; BARBOSA, 2009), Minas Gerais (XAVIER *et al.*, 2012) e Goiás (GOMES *et al.*, 2016). Atualmente, é considerada uma doença endêmica no Brasil (TESSMANN; VIDA, 2005; PRIMIANO *et al.*, 2017). No entanto, a doença tem se tornado de ocorrência frequente nos últimos anos na região Sul, devido as possíveis adaptações as alterações climáticas associada ao manejo integrado das ações antropogênicas (GHINI; HAMADA; BETTIOL, 2011; PRIMIANO *et al.*, 2017; PONTI *et al.*, 2018). Estas previsões indicam condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento de *P. euvitis* nas principais regiões produtoras da cultura no Brasil (GARRIDO; ANGELIOTTI, 2011), visto que, a epidemia é fortemente influenciada pelas condições climáticas (SCAPIN-BUFFARA *et al.*, 2018). A doença é severa no final da estação de crescimento, provoca a queda prematura das folhas anterior à colheita em regiões temperadas, e mais severa ao longo do ano em regiões tropicais e subtropicais. A doença diminui a produção de fotoassimilados e, conseqüentemente, reduz o rendimento e qualidade de frutos (ONO 2000; TESSMANN *et al.*, 2004; AMORIM 2018; PRIMIANO; AMORIM, 2018). Neste cenário, e com a expansão da viticultura brasileira, a ausência de estratégias eficientes de manejo a doença pode resultar em maior potencial de incremento de perda e dano (ANGELOTTI, *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2016). O desenvolvimento de cultivares resistentes é uma das estratégias mais sustentáveis e um dos principais objetivos do melhoramento genético da videira desde os primórdios do século XX. Avanços significativos foram alcançados para o míldio (*Plasmopara viticola*) e oídio (*Uncinula necator*), para as quais diversos loci de resistência foram mapeados e estratégias de melhoramento assistido por marcadores moleculares vêm sendo aplicados mundialmente na piramidação de loci de resistências às duas doenças (TOEPFER *et al.*, 2011), incluindo o Brasil (SANCHEZ-MORA *et al.*, 2017; SAIFERT *et al.*, 2018).

No entanto, outras doenças vêm acometendo a videira, dentre elas a ferrugem, requerendo que o espectro de doenças estudadas seja ampliado. O primeiro passo no desenvolvimento de variedades resistentes a ferrugem é a caracterização de bancos de germoplasmas para a identificação de fontes de resistência à doença (ANGELOTTI *et al.*, 2008). Nos ensaios de resistência também é de fundamental importância desenvolver métodos de baixo custo, rápidos e confiáveis (DEGLÈNE-BENBRAHIM *et al.*, 2010).

Neste aspecto, o bioensaio com discos foliares apresenta algumas vantagens já relatadas por Deglène-Benbrahim *et al.*, (2010); Calon nec *et al.*, (2012), como experimento de tamanho compactado, disponibilidade de um alto número de repetições por genótipo, concentração de inóculo e condições ambientais controladas e curto espaço de tempo para execução. O bioensaio através de discos foliares está implementado para os ensaios de resistência ao míldio da videira, sendo utilizado rotineiramente em estudos de caracterização de germoplasma e mapeamento genético (STAUDT; KASSEMeyer, 1995; BROWN *et al.*, 1999; JÜRGES *et al.*, 2009; SCHWANDER *et al.*, 2012; CALONEC *et al.*, 2012; BOSO *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015; SANCHEZ-MORA, *et al.* 2017; SAIFERT *et al.*, 2018 GÓMEZ-ZELEDÓN; KAISER, 2016), podendo ser ampliada com sucesso a outros patossistemas.

Considerando que a videira é uma espécie perene, cujo cultivo é um processo complexo e de longo prazo, que se estende por várias décadas, são desejáveis sistemas que acelerem o processo de seleção e caracterização de genótipos (CALONNEC *et al.*, 2012). Hennessy *et al.* (2007), relataram a variação de respostas entre genótipos quanto a resistência à ferrugem da videira, devido à ausência de metodologia de avaliação estabelecida.

Portanto, este trabalho teve como objetivo geral adaptar e avaliar a técnica de discos foliares para a fenotipagem e seleção de acessos com e sem tricomas do banco ativo de germoplasma de uva (BAG-uva) resistentes à ferrugem da videira (*P. eu vitis*). E como objetivos específicos (1) avaliar o efeito da concentração de Tween 20 adicionada à suspensão de urediniosporos sobre a infecção de *P. eu vitis*; (2) Avaliar o efeito da concentração de urediniosporos na infecção de *P. eu vitis*; (3) Validar a metodologia, *in vitro*, baseada em discos foliares, consistente para a identificação de fontes de resistência à ferrugem da videira (*P. eu vitis*), tanto para plantas com quanto para plantas sem tricomas; (4) E caracterizar acessos de videira quanto a resistência à *P. eu vitis*, através de bioensaio com discos foliares.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Local de execução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Santa Catarina/Campus de Curitibanos, Santa Catarina.

3.3.2 Obtenção e multiplicação do patógeno

Folhas de videira com sintomas de ferrugem foram coletadas de plantas do porta-enxerto '420A' infectadas naturalmente à campo no município de Canoinhas, estado de Santa Catarina, Brasil. As folhas com sintomas foram levadas ao laboratório, onde realizou-se a identificação da doença através de comparações com a literatura (ONO, 2000; TESSMANN *et al.*, 2004; ANGELOTTI *et al.*, 2008; SPHD, 2015).

O inóculo foi coletado a partir de uma monopústula. O mesmo foi depositado sobre folhas destacadas do porta-enxerto 420A sem pilosidade que foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (1,5% de cloro ativo), seguida da tríplex lavagem com água estéril e secas com papel toalha. As folhas foram depositadas em placas de Petri (90 mm), com a parte abaxial voltada para cima sobre ágar-água (1,5%) (PÉROS *et al.*, 2006). A inoculação dos urediniósporos foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Zambolim e Chaves (1974), sendo que, água esteril aspergida sobre a face abaxial das folhas, a monopústula foi depositadas com agulha histológica e espalhadas com um pincel sobre o limbo foliar. As placas de Petri foram mantidas em câmara DBO (demanda bioquímica de oxigênio), com fotoperíodo de 12 horas de luz e temperatura de 25°C ± 2 (COPATTI, 2011).

Foram realizadas multiplicações sucessivas a partir monopústula até se ter inóculo suficiente para a implantação dos experimentos.

3.3.3 Teste de viabilidade

Simultaneamente a implantação dos experimentos a avaliação da germinação dos urediniósporos, seguiu a metodologia de Beledelli *et al.*, (2012). Em placas de Petri contendo 25 mL do meio de cultura agar-água (2%) foi espalhado com auxílio de

uma alça de Drigalski uma alíquota contendo de 1 mL de suspensão de urediniósporos na concentração de 100.000 e 30.000 urediniósporos/mL, de acordo com o respectivo experimento. As placas foram incubadas à $24^{\circ}\text{C} \pm 2$, ficando as primeira 24 h na ausência de luz, seguida de fotoperíodo de 12 horas. Após 48 horas foi determinada a porcentagem de germinação dos urediniósporos em microscópio óptico (x 40), com base em 50 urediniósporos por placa em 4 repetições. Foram considerados como germinados, os urediniósporos que apresentaram tubo germinativo igual ou maior do que o diâmetro do esporo.

3.3.4 Experimento 1: Avaliação do efeito da concentração do solubilizador tensoativo hidrofílico Tween 20 adicionada à suspensão de urediniósporos sobre a infecção de *P. euvitis*

Genótipos de videira, podem ou não apresentar tricomas na face abaxial. Como os tricomas podem atuar como uma barreira estrutural pré-formada para a penetração do patógeno, foi testada a utilização de Tween 20 para reduzir a tensão superficial na região inoculada em genótipos com e sem tricomas. Folhas da cv. 'Niágara Rosada' (*Vitis labrusca* x *V. vinífera*), com tricomas e do porta-enxerto '420A' (*Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*), sem tricomas foram desinfestadas e recortadas em discos foliares de 12 mm de diâmetro. Os discos foram depositados em placas de Petri (90 mm), com a parte abaxial voltada para cima sobre ágar-água (1,5%) (PÉROS *et al.*, 2006). Sobre os discos foliares foram depositadas gotas de 30 μL da suspensão de urediniósporos (100.000 urediniósporos/mL) contendo as concentrações de 0,0 $\mu\text{l/mL}$, 0,05 $\mu\text{l/mL}$, 0,1 $\mu\text{l/mL}$, 0,2 $\mu\text{l/mL}$ e 0,5 $\mu\text{l/mL}$ de Tween 20. A suspensão foi calibrada em Câmara de Neubauer e homogeneizada em agitador magnético. A gota foi removida 24 horas após a inoculação, para evitar ambiente propício ao desenvolvimento de infecções por fungos ou bactérias (ZELEDÓN, 2015). As placas de Petri foram mantidas em câmara DBO com temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ (NARUZAWA *et al.*, 2006), ficando as primeiras 24 horas na ausência de luz, posteriormente, com fotoperíodo de 12 horas (COPATTI, 2011).

O delineamento experimental utilizado foi blocos inteiramente casualizados em esquema bifatorial 2x5, sendo, duas cultivares e cinco concentrações de Tween 20, com quatro blocos, sendo cada unidade experimental constituída por três discos foliares.

3.3.5 Experimento 2: Avaliação do efeito da concentração de urediniósporos sobre a infecção de *P. euvitis*

Folhas da cv. 'Niágara Rosada' (*Vitis labrusca* x *V. vinífera*), com tricomas e do porta-enxerto '420A', (*Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*), sem tricomas, foram desinfestadas (item 3.3.2) e cortadas em discos foliares de 12mm que foram depositadas sobre meio ágar-água (1,5%) em placas de Petri (90 mm). Sobre os discos foliares foram depositadas gotas de 30 µL contendo as concentrações 0, 10.000, 30.000, 50.000 e 100.000 urediniósporos/mL. A suspensão de urediniósporos foi calibrada com auxílio de Câmera de Neubauer, e homogeneizada em agitador magnético. As gotas foram removidas após 24 horas após a inoculação. As placas de Petri contendo os discos foliares foram mantidas em câmara DBO com temperatura de 25°C ± 2 (NARUZAWA *et al.*, 2006), ficando as primeiras 24 horas na ausência de luz, e seguida de fotoperíodo de 12 horas de luz (COPATTI, 2011).

O delineamento experimental utilizado foi blocos inteiramente casualizados em esquema bifatorial 2x5, sendo, duas cultivares e cinco concentrações de urediniósporos, com quatro blocos, sendo cada unidade experimental constituída por três discos foliares.

3.3.6 Experimento 3: Validação do bioensaio

Foram utilizados discos foliares (12 mm) da quarta folha do ápice para base de seis genótipos suscetíveis, intermediárias e resistentes à ferrugem, com e sem tricomas. Os genótipos sem tricomas foram IAC 766 (acesso 2033, resistente), Seibel 128 (acesso 999, intermediário) e 420A (acesso 1781, suscetível). Os genótipos com tricomas foram *V. candidans* (acesso 2206, resistente), *V. shuttleworthii* (acesso 2378, intermediário) e Niágara Rosada (acesso 2798, suscetível) (PATIL *et al.*, 1998; HENNESSY; DALY; HEARNDEN, 2007; ANGELOTTI *et al.*, 2008; SCAPIN-BUFFARA *et al.*, 2018).

As folhas foram coletadas em março de 2018 (final do ciclo vegetativo) de plantas mantidas em vasos no Banco Ativo de Germoplasma de Uva (BAG-Uva), da Embrapa Uva e Vinho, no município de Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul. As folhas

foram transferidas em caixa de isopor com gelo para o município de Curitiba, Santa Catarina, onde foram implantados os experimentos.

Discos foliares foram submetidos a tríplice lavagem (item 3.3.2) e depositadas em placas de Petri contendo meio ágar-água (15g/L). Uma gota de 30 µL da suspensão de esporos na concentração 30.000 urediniósporos/mL foi depositada sobre os diferentes discos. A suspensão de urediniósporos foi calibrada com auxílio de de Câmera de Neubaer e homogeneizada em agitador magnético. Após a inoculação, as placas de Petri foram acondicionadas na câmara de crescimento DBO, com temperatura de 25°C ± 2, ficando as primeiras 24 horas na ausência de luz, posteriormente com fotoperíodo de 12 horas (COPATTI, 2011).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos inteiramente casualizados, com quatro repetições, sendo cada unidade experimental constituída por três discos foliares.

3.3.7 Avaliação dos componentes de resistência

Em todos os ensaios avaliou-se o período latente em dias, que compreende o período de tempo entre a infecção (inoculação) e aparecimento das estruturas reprodutivas do patógeno (pústulas contendo urediniósporos).

Dez dias após a inoculação (dpi) os discos de folhas com sintomas de ferrugem foram fotografados com o auxílio do software Tropviewn versão 3.7 com estereomicroscópio (x 20). Nos experimentos de avaliação da concentração de Tween 20 e de concentração de urediniósporos. Com o programa ImageJ versão 1.51j8 foi realizada a contagem total do número de pústulas por disco, e determinado o número de pústulas por cm² (através da determinação do número pústulas em 0,4 cm², com projeção em 1 cm²) e o diâmetro médio das pústulas (COPATTI, 2011; ANGELOTTI, 2008). No experimento de validação do bioensaio, foi realizada a captura diária de imagens dos discos de folhas a partir do aparecimento das primeiras pústulas até 10 dpi. Com o programa ImageJ versão 1.51j8 foi possível determinar a severidade (% de área foliar infectada em 40 mm², multiplicada por 4) diária. Posteriormente, foi utilizada a severidade no décimo dia e determinada a área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD), através da fórmula descrita por Shaner & Finney (1977): $AACPSD = \sum ((Y_i + Y_{i+1})/2)(t_{i+1} - t_i)$, onde “Y” representa a intensidade da doença, “t” o tempo e “i” o número de avaliações no tempo.

Para avaliar a intensidade de esporulação, os discos foliares foram depositados dentro de microtubos do tipo Eppendorf contendo solução de 1 mL de água destilada e 1µL de Tween 20. Os microtubos foram centrifugados a 5.000 x g durante 5 min. Os esporos foram quantificados em câmara de Neubauer® (ANGELOTTI, 2008). Em seguida foi determinado o número de uredinióporos por disco e por pústula (número de uredinióporos dividido por número de pústulas).

3.3.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) no programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 1998). Quando houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre os tratamentos realizou-se o teste de comparação de médias de Tukey. Foi realizada a análise de regressão no programa estatístico RStudio versão 1.1.456 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008). Os componentes de resistência da validação do bioensaio foram submetidos a análise multivariada, através da análise de componentes principais (ACP), executada no programa Canoco 4.5, análise do coeficiente de correlação de Pearson, realizada no programa Past 3 e análise de similaridade, feita no programa PRIMER 5.

3.4 RESULTADOS

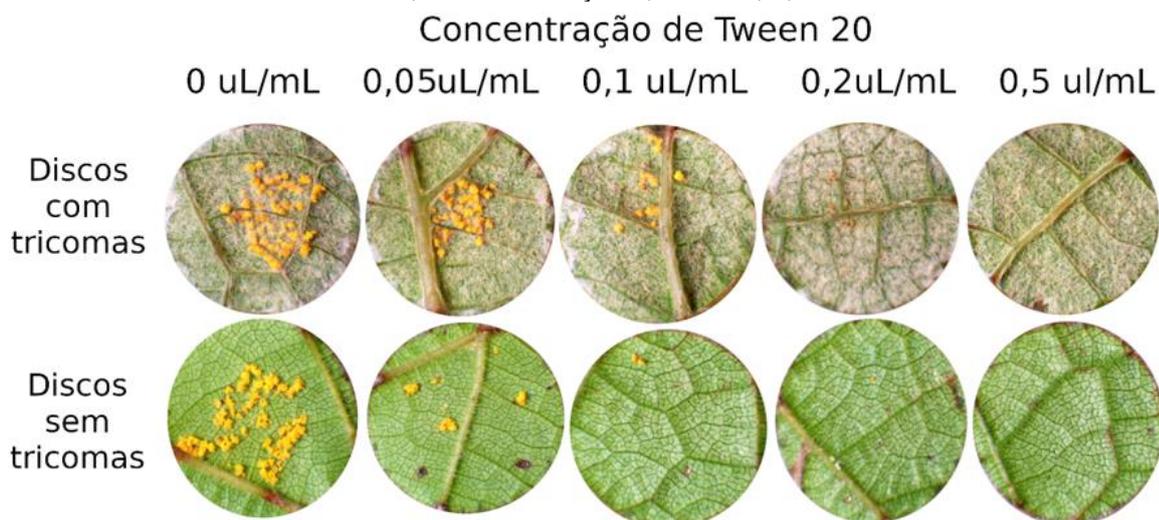
3.4.1 Experimento 1: Avaliação do efeito da concentração do solubilizador tensoativo hidrofílico Tween 20 adicionado à suspensão de uredinióporos sobre a infecção de *P. euvitis*

A germinação dos uredinióporos observada neste experimento foi de 59,1%, confirmando a viabilidade do inóculo utilizado.

A concentração de Tween 20 na suspensão de uredinióporos influenciou no processo de infecção e manifestação dos sintomas da doença sobre a superfície foliar em discos com e sem tricomas (Figuras 3 e 4). Houve interação significativa para as variáveis período latente, número de pústulas por disco, número de pústulas por cm², número de uredinióporos por disco e por pústulas nos diferentes genótipos com e sem tricomas.

O período de latência de *P. euvitis* em discos foliares dos genótipos Niágara Rosada e 420A foram de seis dias nas concentrações de 0 e 0,05 $\mu\text{L/mL}$, reduzindo com o aumento da concentração de Tween 20 (Figura 4A). Com relação ao número de pústulas por disco houve diferença entre plantas com e sem tricomas. Houve redução significativa ($p < 0,05$) do número com o aumento das concentrações de Tween 20. O maior número de pústula foi observado na ausência de Tween 20, com média de 45 pústulas em discos com tricomas e 76 pústulas em discos sem tricomas. Contudo, com o aumento da concentração do agente surfactante houve maior número de pústulas em discos com pilosidade quando comparado aos sem pilosidade (Figuras 3 e 4B).

Figura 3 - Efeito da concentração de Tween 20 no número médio de pústulas em discos com tricomas: na ausência de Tween 20; na concentração 0,05 $\mu\text{L/mL}$; 0,1 $\mu\text{L/mL}$; 0,2 $\mu\text{L/mL}$; 0,5 $\mu\text{L/mL}$; Em discos sem tricomas: na ausência de Tween 20; na concentração 0,05 $\mu\text{L/mL}$; 0,1.



Fonte: Elaborada pelo autor.

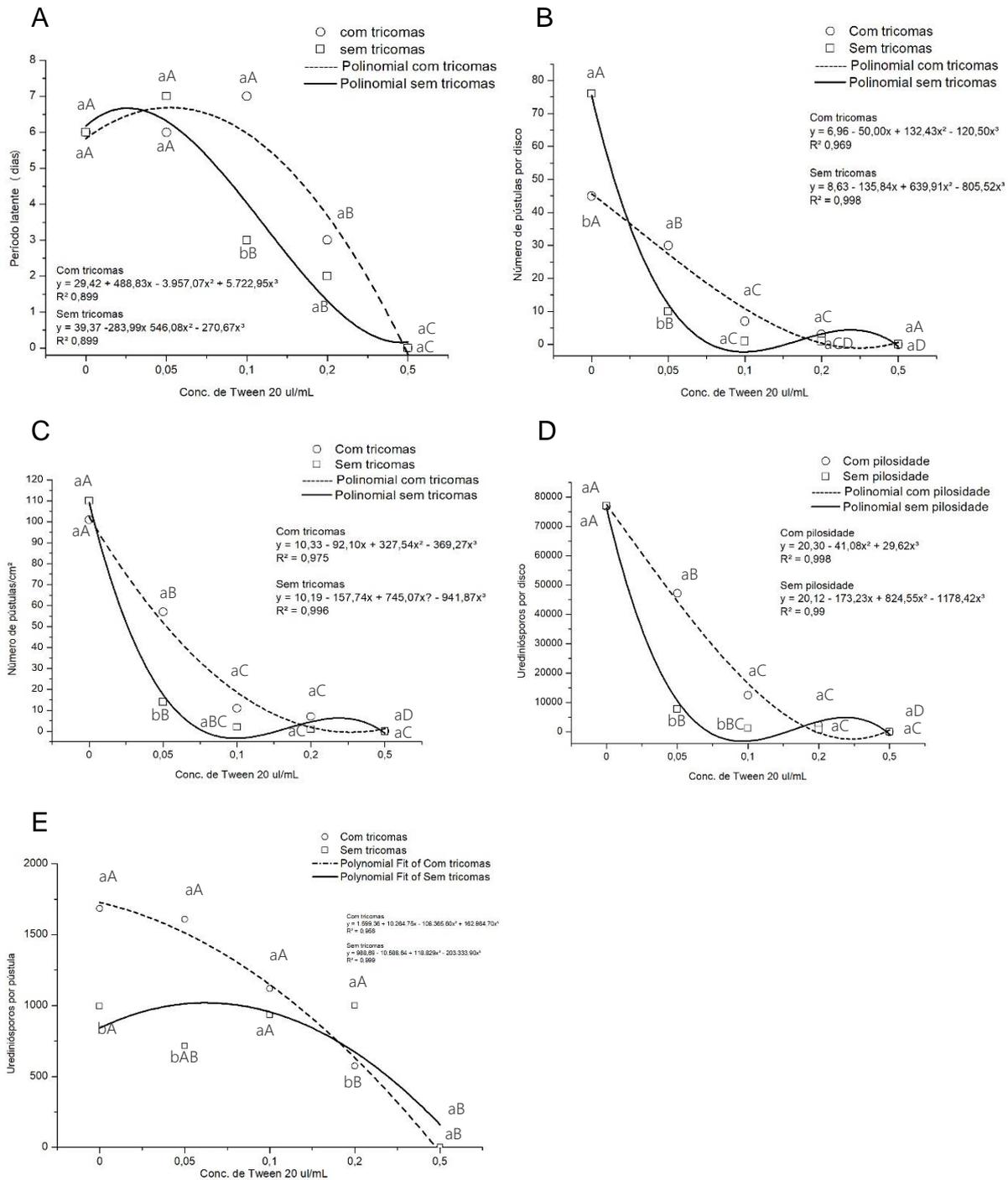
O número de pústulas por cm^2 nos discos foliares com tricomas (Niágara Rosada) variou entre 101, 57, 11, 7 e 0 e em discos sem tricomas (420A) de 110, 14, 2, 1, e 0, apresentando redução significativa ($p < 0,05$) conforme o aumento das concentrações de Tween 20 (0, 0,05, 0,1, 0,2 e 0,5 $\mu\text{L/mL}$, respectivamente). Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os genótipos (fator tricomas) apenas na concentração 0,05 $\mu\text{L/mL}$ de Tween 20 (Figura 4C).

Da mesma forma, o número de urediniosporos por disco, nos genótipos com tricomas (76.750, 12.500, 12.500, 2.333 e 0) e sem tricomas (77.000, 7.750, 1.167, 667 e 0) reduziu significativamente ($p < 0,05$), conforme o aumento da concentração de

Tween 20 (0,05, 0,1, 0,2 e 0,5 $\mu\text{l}/\text{mL}$). Apenas na concentração 0,05 $\mu\text{l}/\text{mL}$ de Tween 20 houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre discos com e sem tricomas (Figura 4D)

O número de uredinióporos por pústula também reduziu significativamente ($p < 0,05$) tanto em discos com tricomas (1.685, 1.608, 1.920, 573 e 0), quanto em discos sem tricomas (995, 714, 933, 1000 e 0) conforme o aumento da concentração de Tween 20 (0,05, 0,1, 0,2 e 0,5 $\mu\text{l}/\text{mL}$). Além disso, o número de uredinióporos por pústula foi significativamente superior nos discos com tricomas, exeto nas concentrações 0,2 e 0,5 μL (Figura 4E).

Figura 4 - Representação gráfica do efeito da concentração de Tween 20 em relação aos principais componentes de resistência. (A) Período latente (dias); (B) Número de pústulas/disco; (C) Número de pústulas/cm²; (D) Número de uredinióporos por disco e (E) Uredinióporos por pústula. 10 dias após a inoculação.



Letra maiúscula: concentrações; Letra minúscula: com e sem tricomas. PL - Período latente com C.V = 29,46%, dados transformados por Box-Cox. Número de pústulas/disco, 10 dpi, C.V = 14,65%, dados transformados através da fórmula $\sqrt{(x + 0,5)}$. Número de pústulas/cm², 10 dpi, C.V = 29,14%, dados transformados através da fórmula $\sqrt{(x + 0,5)}$. Número de uredinióporos por disco, 10 dpi, C.V = 11,40%, Dados transformados por Box-Cox. Número de uredinióporos por pústula, 10 dpi, C.V = 11,40%, Dados transformados por Box-Cox. Fonte: Elaborado pelo autor.

A variável diâmetro médio de pústulas não apresentou interação entre os fatores, no entanto ambos apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$). O tamanho médio das pústulas foi maior nos discos com tricomas (0,15 mm) em comparação aos discos sem tricomas (0,08 mm). No fator concentração, com o aumento da concentração de Tween 20 houve a redução do diâmetro médio de pústulas (Tabela 1).

Tabela 1 - Teste de comparação de médias de Tukey, do diâmetro médio de pústulas (mm), no experimento avaliação do efeito da concentração do solubilizador tensoativo hidrofílico Tween 20 adicionado à suspensão de urediniósporos sobre a infecção de *P. euvitis*.

		Diâmetro de pústula mm					
Tricomas	Concentração de Tween 20 $\mu\text{L/mL}$					Média	
	0	0,05	0,1	0,2	0,5		
Com	0,23	0,26	0,21	0,09	0	0,15 a	
Sem	0,22	0,10	0,09	0,02	0	0,08 b	
Média	0,22 A	0,18 A	0,15 A	0,05 B	0 B		

C.V = C.V 4,17. Os dados de diâmetro médio de pústulas foi transformado através da fórmula $\sqrt{(x + 0,5)}$. Letras minúsculas referem-se a coluna; Letras maiúsculas referem-se a linha.

Considerando as variáveis analisadas, tanto para discos com presença quanto para discos com ausência de tricomas, os resultados mais robustos foram observados quando não foi utilizado Tween 20 na suspensão de urediniósporos. Neste tratamento foi observado menor período latente, maior número de pústulas por disco e por cm^2 , maior diâmetro de pústulas e maior quantidade de urediniósporos por disco e por pústula, indicando que as inoculações dos genótipos suscetíveis foram eficazes e que o Tween 20 não teve efeito positivo no processo de infecção.

3.4.2 Experimento 2: Concentração de urediniósporos na inoculação de *P. euvitis*

A partir dos resultados obtidos no experimento 1, foi testado no experimento 2 o efeito da concentração de esporos na ausência de Tween 20 na inoculação de *P. euvitis*.

Nesse experimento a germinação do urediniósporos foi de 69,24%, demonstrando a viabilidade da suspensão de esporos.

Dentre os componentes epidemiológicos de resistência avaliados, apenas as variáveis urediniósporos/disco e urediniósporos/pústula apresentaram interação significativa entre os fatores.

O período de latência não diferiu entre plantas com e sem tricomas, no fator concentração de urediniósporos, foi de cinco dias na maior (100.000 urediniósporos/mL) e de seis dias na menor concentração (10.000 urediniósporos/mL) (Tabela 2).

Tabela 2 - Teste de comparação de médias de Tukey, do período latente (dias) no experimento avaliação do efeito da concentração de urediniósporos na infecção de *P. euvitis*.

Tricomas	Período latente (dias)					
	Concentração de urediniósporos/mL					
	Testemunha	10.000	30.000	50.000	100.000	Média
Com	0	6	6	6	5	5,8 a
Sem	0	6	6	6	6	6 a
Média	0	6A	6A	6A	5A	

C.V = 4,89. Os dados da testemunha (concentração 0), não foram considerados na análise estatística. Letras minúsculas referem-se a coluna; Letras maiúsculas referem-se a linha.

Para as variáveis número de pústulas por discos, número de pústulas por cm² e diâmetro de pústula, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre presença ou ausência de tricomas e entre as concentrações de urediniósporos/mL.

Os discos foliares de Niágara Rosada apresentaram menor número de pústulas por disco (42) e por cm² (102), quando comparado aos discos do porta-enxerto 420A (52 e 127, respectivamente). O número médio de pústulas por discos (19, 25, 43 e 99), (Figura 5 e Tabela 3) e por cm² (47, 62, 106 e 243) (Tabela 4), aumentaram com a concentração de urediniósporos na suspensão (10.000, 30.000, 50.000 e 100.000 urediniósporos/mL), respectivamente.

Figura 5 - Efeito da concentração de urediniósporos por mL em discos com tricomas, na concentração 0; 10.000; 30.000 50.000 e 00.000 urediniósporos/mL. Em discos sem tricomas, nas concentrações 0; 10.000; 30.000; 50.000 e 100.000 urediniósporos/mL.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 - Número de pústulas por disco foliar com e sem tricomas em diferentes concentrações de inóculo de *P. euvitis*.

Tricomas	Número de pústulas/disco					
	Concentração de urediniósporos/mL					
	Testemunha	10.000	30.000	50.000	100.000	Média
Com	0	15	21	38	93	42 b
Sem	0	23	29	49	106	52 a
Média	0	19 C	25 C	43 B	99 A	

C.V = 16,27. Dados transformador pela fórmula $\sqrt{(x + 0,5)}$. Os dados da testemunha (concentração 0), não foram considerados na análise estatística. Letras minúsculas referem-se a coluna; Letras maiúsculas referem-se a linha.

Tabela 4 - Número de pústulas por cm² foliar com e sem tricomas em diferentes concentrações de inóculo de *P. euvitis*.

Tricomas	Número de pústulas/cm ²					
	Concentração de urediniósporos/mL					
	Testemunha	10.000	30.000	50.000	100.000	Média
Com	0	37	53	92	227	102 b
Sem	0	57	71	120	259	127 a
Média	0	47 C	62 C	106 B	243 A	

C.V = 16,36. Dados transformador pela fórmula $\sqrt{(x + 0,5)}$. Os dados da testemunha (concentração 0), não foram considerados na análise estatística. Letras minúsculas referem-se a coluna; Letras maiúsculas referem-se a linha.

O diâmetro médio das pústulas foi maior em discos com tricomas (0,21 mm) e menor em discos sem tricomas (0,16 mm). Os valores médios encontrados (0,22, 0,19, 0,19 e 0,15 mm) reduziram significativamente ($p < 0,05$) com o aumento da concentração de urediniósporos/mL. Quanto maior o número de pústulas menor o seu diâmetro (Tabela 5).

Tabela 5 - Teste de comparação de médias de Tukey, no diâmetro médio de pústulas (mm) no experimento avaliação do efeito da concentração de urediniósporos na infecção de *P. euvitis*.

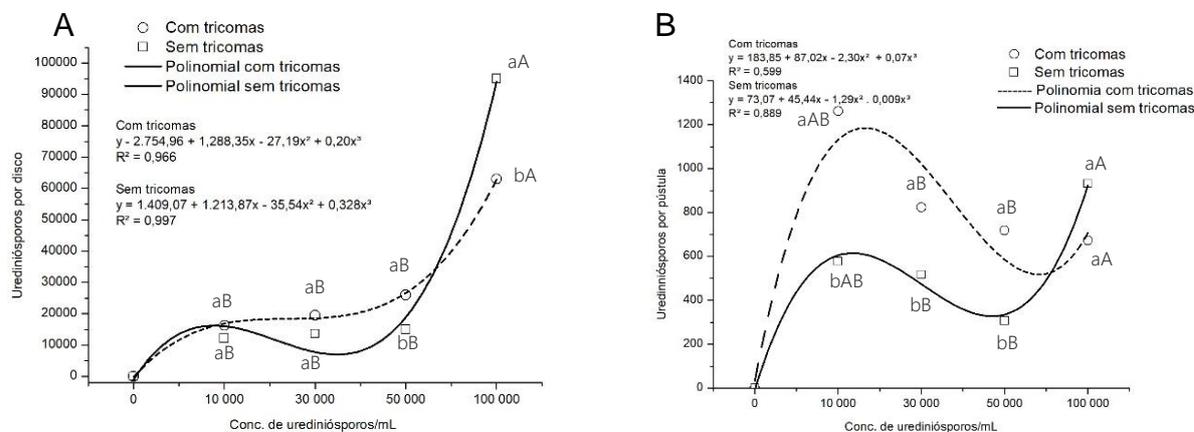
Diâmetro médio de pústula (mm)						
Tricomas	Concentração de urediniósporos/mL					Média
	Testemunha	10.000	30.000	50.000	100.000	
Com	0	0,24	0,22	0,22	0,18	0,21 a
Sem	0	0,20	0,16	0,16	0,13	0,16 b
Média	0	0,22A	0,19AB	0,19AB	0,15B	

C.V = 16,36. Dados transformador pela fórmula $\sqrt{(x + 0,5)}$. Os dados da testemunha (concentração 0), não foram considerados na análise estatística. Letras minúsculas referem-se a coluna; Letras maiúsculas referem-se a linha.

Na variável urediniósporos por disco, há diferença significativa ($p < 0,05$) entre discos com (63.000) e sem tricomas (95.000), na concentração de 100.000 urediniósporo/mL. O número de urediniósporos por disco foi maior em Niágara Rosada do que no porta-enxerto 420A, exceto na concentração de 100.000 urediniósporo/mL. Tanto em plantas com quanto sem tricomas, houve o aumento do número de urediniósporos com o aumento da concentração da suspensão, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) (Figura 6A).

O número de urediniósporos por pústulas, no fator tricomas, difere significativamente ($p < 0,05$) entre os genótipos com e sem tricomas em todas as concentrações da suspensão. O número de urediniósporos por pústulas diminuiu com o aumento da concentração de urediniósporos na suspensão. Niágara Rosada apresenta maior número urediniósporos por pústulas, exceto na concentração de 100.000 urediniósporos/mL (Figura 6B).

Figura 6 - Representação gráfica do efeito da concentração urediniósporos/mL no (A) número de urediniósporos por disco e (B) Urediniósporos por pústula analisada 10 dias após a inoculação.



Número de urediniósporos por disco, 10 dpi, C.V = 17,50%, dados transformados através da fórmula $\sqrt{(x + 0,5)}$. Número de urediniósporos por pústula, 10 dpi, C.V = 11,40%, dados transformados por Box-Cox. Fonte: Elaborada pelo autor.

De modo geral, a concentração de 30.000 urediniósporos/mL é a que melhor expressa os resultados, visto que a quantidade intermediária de pústulas presentes no disco é a que melhor permite fazer as mensurações, pois há menor sobreposição de pústulas. Abaixo desta concentração a quantidade de pústula é baixa, podendo influenciar nos resultados finais. Nesta concentração, o período de latência foi igual nos discos de Niágara Rosada e do porta-enxerto 420A (aproximadamente 6 dias). O número de pústulas por disco e o número de pústulas por cm² foram maiores em discos sem tricomas. O diâmetro médio de pústulas e número de urediniósporos por pústula foram maiores em discos com tricomas. O número de urediniósporos por disco foi igual em ambos os genótipos. Na concentração de 100.000 urediniósporos/mL, houve o aumento da quantidade urediniósporos por disco e por pústula em discos sem tricomas, as demais variáveis permanecem na mesma representação de quando utilizado 30.000 urediniósporos/mL.

3.4.3 Experimento 3: Validação do Bioensaio

A germinação dos urediniósporos neste experimento foi de 58,13%, demonstrando a viabilidade dos urediniósporos utilizados na suspensão.

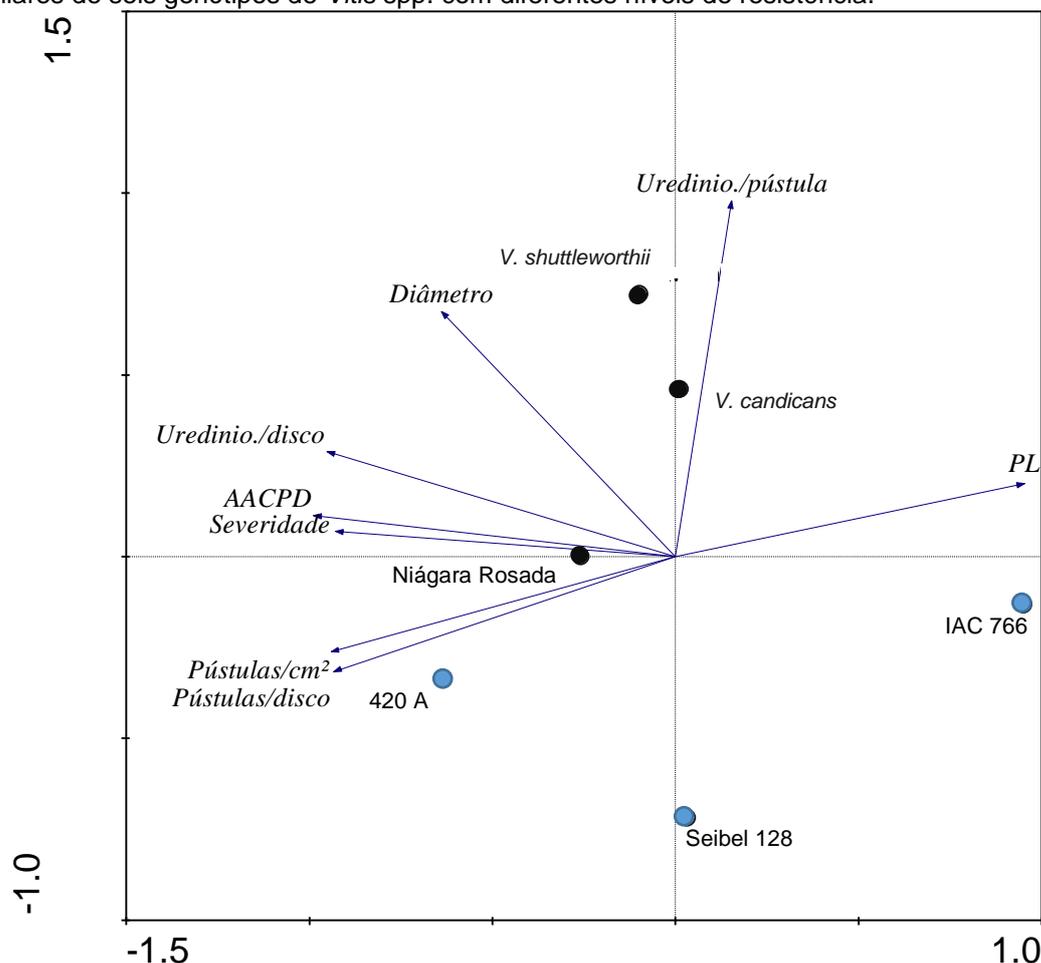
Para validação do bioensaio foi realizada a análise multivariada dos componentes principais - *Principal Component Analysis* (PCA) que permitiu observar

as relações existentes entre as variáveis e definir as que melhor agrupam e diferenciam os acessos.

O primeiro componente principal o eixo X, envolve as variáveis período latente, número de pústulas por disco e por cm², número de urediniósporos por disco, severidade e AACPSD. O segundo componente principal o eixo Y, engloba as variáveis número de urediniósporos por disco e diâmetro médio de pústulas. O eixo X explica 73,1% e o eixo Y 21,5% da variabilidade e diferenciação dos acessos de acordo com as variáveis epidemiológicos de resistência, indicando que as variáveis do eixo X permitem melhor diferenciação dos acessos que foram distribuídos de forma distinta no gráfico (Figura 7). As setas apontam em direção ao aumento do valor da variável. O porta-enxerto 420A, a cultivar Niágara Rosada e a espécie *V. shuttleworthii* apresentam maior severidade e AACPSD, e menor período latente, sendo classificados como suscetíveis à ferrugem. Os dados do porta-enxerto 420A, confirmam as informações obtidas no experimento 2 (item 3.4.2). De modo oposto, Seibel 128, *V. candidans* e IAC 766, apresentaram menor severidade e AACPSD e maior período latente, podendo ser consideradas resistente à ferrugem. Assim, os acessos mais resistentes encontram-se ao lado direito do gráfico e os mais suscetíveis

O diâmetro médio de pústulas está localizado entre o eixo X e eixo Y, e o número de urediniósporos por pústulas, é representado pelo eixo Y. Ambas as variáveis apontam em direção a parte superior do gráfico, onde estão distribuídos os discos dos acessos com tricomas (*V. shuttleworthii* e *V. candidans*), montando que estas variáveis diferem entre com e sem tricomas, ao lado esquerdo, não sendo indicadas para a classificação dos níveis de resistência de acessos à ferrugem da videira.

Figura 7 - Análise multivariada Biplot bidimensional dos componentes principais das variáveis referentes aos componentes de resistência à *Phakopsorora euvitis*, inoculado *in vitro* sobre discos foliares de seis genótipos de *Vitis* spp. com diferentes níveis de resistência.



PL: Período latente; Urediniósporod/disco – Urediniósporos/disco; Análise multivariada dos componentes principais PCA. Os dados foram transformados através da fórmula $Y' = (A*Y+B)$. ● Representa acesso com tricomas; ● Representa acesso sem tricomas. Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise do coeficiente de correlação auxiliou na interpretação da análise multivariada PCA (Tabela 6). O período latente possui correlação negativa elevada com o número de pústulas por disco, número de pústulas por cm^2 , severidade e AACPSD. A severidade e AACPSD correlacionam-se positivamente entre si e apresentam correlação positiva com número de pústulas por disco e número de pústulas por cm^2 . A AACPSD também apresenta correlação positiva com o número de urediniósporos por disco. A variável pústula por disco se correlaciona positivamente com as variáveis número de pústula por cm^2 , diâmetro e número de urediniósporos por pústula. Todas as variáveis apresentam baixa correlação com o diâmetro de pústulas e com urediniósporos por pústulas, que se correlacionam moderadamente entre si (Tabela 6).

Tabela 6 - Coeficiente de correlação de r (Pearson) dos componentes de resistência.

	PL	Nº púst./ disco	Nº púst./ cm ²	Diâmetro (mm)	Nº uredinio./ Disco	Nº uredinio./ Púst.	Severidade %
Nº púst./Disco	-0,76*						
Nº púst./cm ²	-0,77*	1,00*					
Diâmetro (mm)	-0,48*	-0,08*	-0,08*				
Nº Uredinio. /Disco	-0,77 ^{ns}	0,82*	0,81*	0,34 ^{ns}			
Nº Uredinio. /Púst.	0,19*	-0,52 ^{ns}	-0,53 ^{ns}	0,66*	0,01 ^{ns}		
Severidade %	-0,77*	0,92*	0,91*	0,13*	0,97 ^{ns}	-0,24 ^{ns}	
AACPSD	-0,80*	0,93*	0,92*	0,05*	0,94 ^{ns}	-0,25*	0,99*

^{ns} Não significativo. *Significativo pelo teste t a 5% de probabilidade. Nº pústulas por disco; Número pústulas por cm². Nº de urediniosporos por disco; Nº de ureiniosporos por pústulas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise similaridade foi realizada com o intuito de agrupar os acessos de acordo com as semelhanças existentes entre as variáveis respostas. O acesso 420A não se assemelha a nenhum dos outros genótipos, por apresentarem menor período latente, maior número de pústulas e severidade enquadra-se como suscetíveis. Niágara Rosada e *V. shuttleworthii* são semelhantes (87,82%) e também são sugeridas como suscetíveis. *V. candidans* assemelham-se em 79,55% com Seibel 128 e 58,22% com *V. shuttleworthii*, indicando que a resistência neste acesso é menor do que em Seibel 128, devido apresentarem variáveis respostas com valores intermediários. O acesso IAC 766, por possuir menos de 40% de similaridade com os demais genótipos, foi classificado como resistente, ambos apresentaram maior período latente e menor número de pústulas e de severidade (Tabela 7).

Tabela 7 - Matriz de similaridade (ANOSIN) de espécies e híbridos pertencentes ao gênero *Vitis* spp. de acordo com os componentes de resistência à *Pakopsora euvisis*.

	Niágara Rosada	420A	<i>V. shuttleworthii</i>	Seibel 128	IAC 766
420A	39,89%				
<i>V. shuttleworthii</i>	87,82%	32,75%			
Seibel 128	35,27%	9,88%	43,91%		
IAC 766	9,61%	2,15%	13,75%	39,08%	
<i>V. candidans</i>	48,17%	14,57%	58,22%	79,55%	32,55%

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise multivariada dos componentes principais e de similaridade podem ser confirmadas através dos resultados obtidos na ANOVA e teste de comparação de médias para as variáveis epidemiológicas, (Tabela 8), com destaque para período latente, severidade e AACPSD.

As variáveis severidade e AACPSD foram as que apresentaram maior correlação com todas as demais variáveis analisadas. Considerando que a correlação entre as duas variáveis foi de 0,99, foi optado por utilizar a severidade, por ser de mais fácil mensuração, para classificar os genótipos quanto a resistência/suscetibilidade a *P. euvitis*.

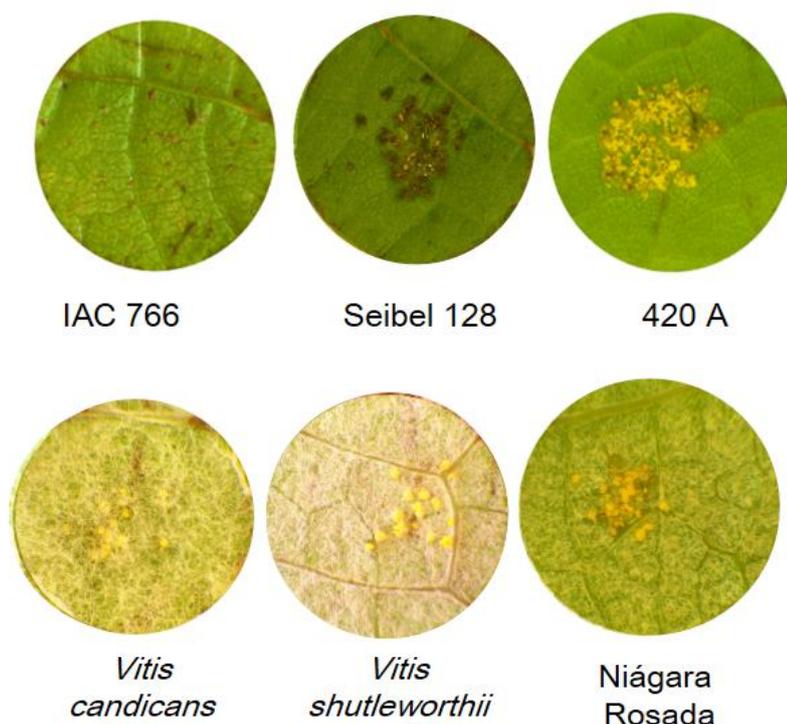
O acesso 420A diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos demais acessos, apresentando menor período latente (cinco dias), maior severidade (55,36%) e AACPSD (147,55), se destacando como o mais suscetível dentre os acessos testados. Niágara Rosada e *V. shuttleworthii* não diferiram entre si para as três variáveis, apresentando período latente de 6 e 6,5 dias, severidade de 16,32% e 11,51% e AACPSD de 35,29 e 27,12, respectivamente, sendo classificadas como suscetíveis. *V. candidans* e Seibel 128 são iguais entre si e diferem dos demais acessos, apresentando período latente de 8 dias, severidade de 4,18 e 3,66% e AACPSD de 7,71 e 6,63, respectivamente, sendo enquadrados como parcialmente resistentes. No entanto, a presença de pilosidade em *V. candidans*, indica a presença de uma barreira estrutural de resistência pré-formada que auxiliou na redução da severidade. O genótipo IAC 766 apresentou o maior período latente (10 dias) e menor severidade (0,03) e AACPSD (0,01), sendo enquadrado como resistente ao isolado do patógeno utilizado.

Tabela 8 - Teste de comparação de médias de Tukey dos componentes de resistência nos diferentes genótipos.

Genótipos	PL	Nº pústulas Disco	Nº pústulas cm²	Diâmetro mm	Nº urediniósporos disco	Nº urediniósporos pústula	Severidade %	AACPSD
IAC 766	10 A	0,08 A	0,21 A	0,006 A	833 A	500 C	0,03 A	0,01 A
Seibel 128	8 B	80 D	201 D	0,076 B	5833 A	73 A	3,66 B	6,63 B
<i>V. candidans</i>	8 B	21 B	53 B	0,181 DE	20833 B	1053 D	4,18 B	7,71 B
<i>V. shuttleworthii</i>	6,5 C	15 AB	38 AB	0,215 E	27417 B	1859 D	11,51 C	27,12 C
Niágara Rosada	6 C	55 C	137 C	0,159 CD	20333 B	369 B	16,32 C	35,29 C
420 A	5 D	235 E	538 E	0,110 BC	63167 C	204 B	55,36 D	147,55 D

PL - Período latente. C.V = 5,80 %; Pústulas por disco C.V = 11,53; Pústulas por cm² C.V = 11,55; Diâmetro C.V = 18,91; Urediniósporos por disco C.V = 16,92, dados transformados, através da fórmula $\sqrt{(x + 0,5)}$; Urediniósporos por pústula C.V = 18,19%, dados transformados, através da fórmula $\sqrt{(x + 0,5)}$; Severidade C.V 13,80%, dados transformados, através da fórmula $\sqrt{(x + 0,5)}$; AACPSD - Área abaixo da curva do progresso da doença, dados transformados através da fórmula $\sqrt{(x + 0,5)}$, com C.V de 17,07%.

As intensidades da doença dos acessos estão representadas na Figura 8, corroborando com dos dados apresentados anteriormente, demonstrando diferença visual entre os acessos avaliados. O acesso de Seibel 128 apresentou resposta de hipersensibilidade.

Figura 8 - Interação planta-patógeno, intensidade de *Phakopsora euvitis* em diferentes genótipos de videira, 10 dias após a inoculação.

3.5 DISCUSSÃO

Os monoacilatos de polietileno glicol sorbitano – Tween's são detergentes não-iônicos que possuem grupamentos sem carga e hidrofílicos. São considerados, surfactantes suaves, pois quebram as associações lipídio-lipídio e a maioria deles não desnatura as proteínas (JOHNSON, 2013). São amplamente utilizados em experimentos de biologia vegetal e proteção de plantas, por atuarem como solubilizador tensoativo hidrofílico (agente surfactante) na superfície de plantas lipofílicas (HUNZICKER, 2009).

Os tricomas podem atuar como uma barreira pré-formada de resistência através da formação de uma superfície hidrofóbica que bloqueia a germinação dos esporos (KORTEKAMP; ZYPRIAN, 1999). Portanto, no caso de *P. euvitis*, para definir o nível de resistência do hospedeiro é preciso analisar as variáveis epidemiológicas com muita cautela. Com a finalidade de reduzir a tensão superficial na região inoculada, em genótipos com e sem tricomas foi utilizado o Tween 20, devido a sua utilização por outros investigadores em inoculações artificiais (JIA; VALENT; LEE, 2003; JEUN; LEE, 2005; ANGELLOTI, *et al.*, 2008; BOEDO *et al.*, 2010; REIS; ZANATTA; DANELLI, 2014).

No presente trabalho o uso do Tween 20 na suspensão de urediniósporos influenciou negativamente no processo de infecção e na manifestação dos sintomas da doença sobre a superfície foliar em discos com e sem tricomas de genótipos suscetíveis. Com o aumento da concentração de Tween 20, de modo geral, houve a redução progressiva do número e tamanho das pústulas e da produção de urediniósporos. Possivelmente, o Tween 20 possui algum composto inibidor da geminação e/ou desenvolvimento do *P. euvitis* sobre o tecido foliar (MWAMBURI; LAING; MILLER, 2015). Kono *et al.*, (2015) observaram a inibição quase completa da infecção de *Plasmopora viticola*, agente causal do míldio da videira, quando utilizado a concentração de 0,01% de Tween 20. Segundo Hunzicker, (2009), o Tween 20 pode atuar como um transportador de ácidos graxos saturados que, por sua vez, são elicitores de uma resposta imune inata típica associado à patogênese (PAMPs/resposta imune do tipo eliciador), causando alterações na fisiologia das plantas mesmo quando utilizado em baixas concentrações. Boitel-conti *et al.*, (1996) afirma que o Tween 20 atua como permeabilizador e também como indutor de resistência. Oliveira (2014); Oliveira (2015) observaram em seus estudos que,

semelhante ao jasmonato de metila, o tratamento com Tween 20 induz a produção de compostos da via fenilpropanóides, desta forma, ambos foram considerados como compostos indutores de resistência à ferrugem asiática da soja (*P. pachyrhizi*). Gomez-Lopez et al. (2005), também observou a influência do Tween 20 no teste de suscetibilidade de genótipos à *Aspergillus* spp.

Diante do exposto, não se recomenda a utilização de Tween 20 na suspensão de urediniósporos, em experimentos de avaliação dos níveis de resistência de genótipos à *P. euvitis*. Resultados mais robustos e reproduzíveis foram observados quando as inoculações ocorreram na ausência de Tween 20 na suspensão de urediniósporos, tanto na presença, quanto na ausência de tricomas, a fim de evitar qualquer influência abiótica na resposta final da interação planta-patógeno. Embora, o uso de outro agente surfactante, a exemplo do Tween 80 pode ser estudado.

Com exceção do controle negativo, todas as concentrações de urediniósporos testadas resultaram na manifestação de sintomas nos discos foliares inoculados. A concentração do inóculo influenciou significativamente nos componentes epidemiológicos de resistência. De modo geral, a medida que aumentou a concentração do inóculo, aumenta o número de pústulas e a produção de urediniósporos e há uma tendência de diminuição do tamanho das pústulas.

Hennessy; Daly; Hearnden (2007) utilizaram em experimentos com discos foliares de 8 cm, a concentração de 30.000 a 40.000 urediniósporos/mL de *P. euvitis* e 2 gotas/L de Tween 80. Angelotti (2008) usou a concentração de 100.000 urediniósporos/mL e 0,01% de Tween 20, para avaliar a resistência de genótipos de videira à ferrugem. GOMES *et al.*, (2010) utilizou a concentração de 2.700 esporos/mL na inoculação de *P. euvitis* em mudas de videira. Como é possível observar não há padronização na concentração de inóculo utilizada nos experimentos.

Assim como observado por Angelotti *et al.*, (2008) há aumento no grau de infecção conforme aumenta a concentração de inóculo na suspensão, mostrando que a densidade do inóculo possui influência sobre a severidade das ferrugens. Compreender a relação entre inóculo e a intensidade da doença se faz necessário para avaliar os níveis de resistência de genótipos/acessos à ferrugem da videira.

Spring, Rozynek e Zipper (1997) e Gómez-Zeledón; Zipper; Spring, (2013) utilizaram 100.000 esporângios/mL e justificam que, menores concentrações não foram eficientes para infecções de *P. viticola*. Por outro lado, Gómez-Zeledón e Kaiser

em (2016) utilizaram 10.000 esporângios/mL ao invés de 100.000 esporângios/mL na inoculação de discos foliares, e obtiveram eficiência da infecção do mesmo patógeno.

A concentração de inóculo, viabilidade de esporos e condições ambientais podem apresentar importante influência sobre a resposta da interação planta-patógeno (GÓMEZ-ZELEDÓN; KAISER, 2016). Alta densidade de inóculo em experimentos onde a superfície de contato entre patógeno e hospedeiro é relativamente pequena, por exemplo área ocupada por uma gota de 30 μ L, pode submeter os discos à elevada pressão de inóculo e influenciar nos resultados finais. Deste modo, não pode ser feito uso da mesma concentração utilizada em plantas ou folhas inteiras em discos foliares. Os urediniósporos de *P. euvitis* são estimulados a germinar quando ocorrem em altas densidades (ANGELLOTTI *et al.*, 2008).

A melhor concentração a ser escolhida é aquela que permite distinguir os genótipos de acordo com o seu nível de resistência. Quanto maior for a concentração de urediniósporos utilizada maior será a intensidade da doença sobre o disco foliar. A concentração de 30.000 urediósporos/mL permitiu a manifestação da doença, em quantidade intermediária de pústulas, quando comparada com as maiores concentrações. Este fato facilitou as mensurações dos componentes epidemiológicos de resistência, em plantas com e sem tricomas, devido a menor densidade de pústulas nos disco, favorecendo análises de imagens precisas, devido a menor sobreposição de pústulas. Nesta concentração, Niágara Rosada e o porta-enxerto 420A mostraram-se suscetíveis à *P. euvitis*, o que condiz com resultados encontrados à campo (SCAPIN-BUFFARA *et al.*, 2018).

No presente estudo foram determinados vários componentes epidemiológicos de resistência à *P. euvitis*, tais como, período latente, número e diâmetro de pústulas e intensidade de esporulação. Levando em consideração o tratamento selecionado, suspensão de urediniósporos sem Tween 20 na concentração de 30.000 urediniósporos/mL, foram observadas diferenças significativas entre os genótipos com e sem tricomas. O período latente não diferiu entre os genótipos com e sem tricomas. Nos discos de Niágara Rosada, com tricomas, foi observado menor número de pústulas, no entanto pústulas maiores e com maior intensidade de esporulação.

A menor eficiência de infecção do patógeno biotrófico em discos com tricomas, resulta em menor densidade de pústulas, no entanto, há redução da competição entre as pústulas pelos recursos do hospedeiro e tecidos disponíveis, e assim são observadas pústulas de maior diâmetro (PARIAUD *et al.*, 2009). Já em discos sem

tricomas foi observado maior número de pústulas, entretanto, pústulas menores, com menor intensidade de esporulação. Neste caso, a superfície de contato entre a gota de suspensão de esporos e a superfície da folha é maior resultando na eficiência de infecção, e a presença de competição entre as pústulas o que permite crescerem espaçadas umas das outras.

A avaliação dos componentes de resistência até 10 dpi é suficiente para a classificação dos genótipos quanto a sua resistência ao patógeno (HENNESSY; DALY; HEARNDEN, 2007; ANGELOTTI *et al.*, 2008) e reduzir ocorrência de infecções secundárias indesejadas por outros microrganismos (GÓMEZ-ZELEDÓN; KAISER, 2016).

Buscando avaliar a efetividade do bioensaio *in vitro* foi utilizado um pequeno painel de genótipos com e sem tricomas com diferentes níveis de resistência/suscetibilidade à *P. euvitis*.

Dentre os componentes epidemiológicos de resistência avaliados, o período latente, a severidade aos 10 dpi e AACPSD foram os que permitiram a melhor classificação dos acessos de *Vitis* spp. quanto aos níveis de resistência/suscetibilidade a ferrugem em discos com e sem tricomas. O período latente é um importante parâmetro para avaliação da resistência do hospedeiro (AMORIM; PASCHELATI, 2011). Quanto maior o período latente, mais resistente será o genótipo, ou seja, o patógeno requer maior período de tempo para se estabelecer e manifestar os sintomas, pois necessita superar o (s) mecanismo (s) de defesa do hospedeiro. Isto resulta em menor número de ciclos do patógeno e, conseqüentemente, menor quantidade de doença. Além do aumento do período de latência, os mecanismos de defesa do hospedeiro resultam na redução da intensidade da doença, manifestada através da menor severidade e AACPSD, devido a menor taxa de infecção (PARLEVLIET, 1985).

A análise de diagnóstico de imagens está sendo cada vez mais utilizada na quantificação de doenças, a fim de obter precisão nas análises fenotípicas dos genótipos na presença de patógenos (LI; ZHANG; HUANG, 2014; MUTKA; BART, 2015; MATSUNAGA *et al.*, 2017). Assim, neste patossistema, as avaliações em discos foliares pode ser automatizada e auxiliar na coleta de dados de amostras grandes, resultando em maior poder estatístico (BELLIN *et al.*, 2009; MUTKA; BART, 2015).

No bioensaio em discos foliares, sob condições ambientais ideais ao desenvolvimento do patógeno, o porta-enxerto 420A foi classificado como suscetível

à *P. euvitis*. Angelotti *et al.*, (2008), em inoculações artificiais realizadas em casa de vegetação, classificou o porta-enxerto como classe II (parcialmente resistente). No entanto, a suscetibilidade deste acesso à ferrugem foi observada à campo, sob condições naturais de infecção, no município de Canoinhas-SC, na safra 2016/2017 (Dados não publicados). A divergência destes dados pode indicar a variação da virulência do isolado de acordo com a variabilidade genética do patógeno e do hospedeiro na presença de condições ambientais distintas (LONGDON *et al.*, 2015).

No presente estudo o acesso do porta-enxeto 420A difere dos resultados encontrados por, Angelotti *et al.*, (2008). Os acessos da cultivar Niágara Rosada e da espécie *V. shuttleworthii*, ambos providos de tricomas sobre a superfície abaxial das folhas, foram classificados como suscetíveis a doença, assim como observado por Hennessy; Daly; Hearnden (2007), Angelotti *et al.*, (2008) e Scapin-buffara *et al.*, (2018). Na literatura, os acessos IAC 766 (ANGELOTTI *et al.*, 2008) e Seibel 128 (HENNESSY, DALY; HEARNDEN, 2007) são classificados como resistentes à ferrugem. Neste trabalho, foram classificados como resistente e parcialmente resistente, respectivamente. O acesso Seibel 128 manifestou necrose nos pontos de infecção da doença, indicando a presença de genes de resistência de maior efeito, que reconhecem o patógeno e ativam a resposta de hipersensibilidade, como ocorre por exemplo para o míldio da videira (*P. viticola*) (KORTEKAMP; ZYPRIAN, 2003; BELLIN *et al.*, 2009; CASAGRANDE *et al.*, 2011). Após a tentativa de ataque do patógenos, ocorre a geração de espécies reativas de oxigênio que pode desencadear a morte celular (GOVRIN; LEVINE, 2000). A resposta de hipersensibilidade (HR) consiste em lesões necróticas resultantes da morte localizada de células do hospedeiro no local da infecção. A resposta ocorre em virtude do reconhecimento da presença do patógeno, através moléculas, que são diretas ou indiretamente liberadas pelo patógeno invasor, denominadas elicitores, seguida da ativação de genes, que resultarão na síntese de metabólitos de resistência e proteínas, que atuam nas interações incompatíveis entre planta e patógeno (KELLER, 1999; BAGIROVA, 2007; KUSHALAPPA; YOGENDRA; KARRE, 2016). Embora o patógeno tenha obtido êxito em seu estabelecimento, a intensidade da doença foi menor comparado aos demais acessos avaliados.

Neste estudo, o acesso *V. candidans* foi classificado no grupo dos acessos parcialmente resistentes, e por Patil *et al.*, (1998) como resistente. Observamos que

a resistência destes acessos está atribuída a atuação dos tricomas como barreira física pré-formada de resistência e dificilmente está associada a genes de resistência. Vale destacar que nos demais trabalhos ao avaliaram os níveis de resistência de genótipos à *P. euvtis*, não é considerada a presença de tricomas sobre a superfície foliar (PATIL *et al.*, 1998; HENNESSY, DALY; HEARNDEN, 2007; ANGELOTTI *et al.*, 2008).

Apenas o porta-enxerto IAC 766 foi classificado como resistente à *P. euvtis*. O acesso foi originado através do cruzamento entre '106-8 Mgt' [*V. riparia* x (*V. rupestris* x *V. cordifolia*)] x *V. tilifolia* desenvolvido no Brasil, pelo Instituto Agrônomo de Campinas – IAC (ANGELOTTI *et al.*, 2008).

O bioensaio *in vitro*, mostra-se eficiente na seleção de possíveis parentais (NYASSÉ; DESPRÉAUX; CILAS, 2002), na triagem de genótipos resistentes em diversos patossistemas e na análises de patogenicidade, com níveis satisfatório de confiabilidade, representando a interação existente à campo (STAUDT; KASSEMAYER, 1995; BROWN *et al.*, 1999; JÜRGES *et al.*, 2009; SCHWANDER *et al.*, 2012; CALO; NEC *et al.*, 2012; BOSO *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015; SANCHEZ-MORA, *et al.* 2017; SAIFERT *et al.*, 2018 GÓMEZ-ZELEDÓN; KAISER, 2016).

A consistência dos resultados obtidos no presente estudo, com os da literatura, comprova que a metodologia dos discos foliares pode ser aplicada para a caracterização do nível de resistência/suscetibilidade a *P. euvtis* em germoplasma de videira.

Desta forma, a padronização do bioensaio utilizando disco foliares na concentração 30.000 urediniósporos/mL, permitiu a diferenciação de genótipos com diferentes níveis de resistência à ferrugem da videira. E o seu uso foi validado, pois identificou fontes importantes de resistência, assim como já relatado em outros trabalhos (PATIL *et al.*, 1998; HENNESSY *et al.*, 2007; ANGELOTTI *et al.*, 2008).

3.6 CONCLUSÕES

A técnica de discos foliares demonstrou ser rápida e consistente para ensaios de resistência à *P. euvtis*, podendo ser empregada na caracterização de germoplasma, seleção de parentais, na fenotipagem de grandes populações segregantes, em estudos de fisiologia do parasitismo e em testes de patogenicidade.

O uso de Tween 20 na suspensão de urediniósporos reduziu a eficiência da infecção do patógeno, resultando em menor porcentagem de discos com pústulas.

A suspensão de esporos na concentração de 30.000 urediniósporos/mL, sem o agente surfactante - Tween 20 foi a mais adequada para a caracterização do nível de resistência à *P. euvitis*, tanto em genótipos com quanto sem tricomas.

O período latente, a severidade e a AACPSD foram as variáveis mais efetivas dentre os componentes epidemiológicos de resistência analisados, para diferenciar o nível de resistência à ferrugem da videira.

4 CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ACESSOS DO BAG-UVA DE VIDEIRA À FERRUGEM (*Phakopsora euvitis*) ATRAVÉS DE BIOENSAIO

4.1 RESUMO

As doenças são consideradas as principais causadoras de perdas e danos nas culturas agrícolas. No Brasil, a ferrugem da videira causada pelo fungo *Phakopsora euvitis* é considerada uma doença endêmica, que reduz a área fotossinteticamente ativa da planta, comprometendo a maturação dos frutos e o acúmulo de reservas, afetando a safra atual e as futuras. O controle genético contribui de forma significativa na redução do uso de produtos químicos no manejo de doenças no setor vitícola. A primeira etapa de um programa de melhoramento genético com ênfase na resistência a qualquer doença, consiste na identificação de fontes de resistência a doença, através da caracterização de bancos de germoplasma. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo geral caracterizar acessos de videira quanto a resistência à *P. euvitis*, através de bioensaio com discos foliares. Foram coletadas folhas de 25 acessos do BAG-Uva, mantido pela Embrapa Uva e Vinho. Os acessos foram selecionados de modo a representar diferentes espécies de *Vitis*. Discos foliares desinfestados de 12 mm foram acomodados em placas de Petri contendo ágar-água. Sobre a face abaxial de cada disco foi depositada uma gota de 30 µL de suspensão na concentração 30.000 urediníporos/mL. As placas foram armazenadas em DBO em condições ambientais controladas. Determinou-se o período latente, número de pústulas/disco e por cm², diâmetro médio de pústulas (mm), a severidade e posteriormente a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPSD). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), teste de comparação de médias de Scott-Knott e análise multivariada dos componentes principais. O nível de resistência/suscetibilidade foi determinado de acordo com uma escala de resistência estabelecida a partir da severidade. Houve diferença estatística significativa entre os acessos avaliados quanto aos componentes de resistência ($p < 0,05$). A maioria dos acessos foram classificados como suscetíveis ou muito suscetíveis a doença (72%). Os acessos IAC 766 e Seibel 405, resistentes a ferrugem da videira, apresentaram em média PL maior (9 dias) e menores valores de severidade (0,75%) e AACPSD (1,00). Os acessos Seibel 128, *V. del rioi* Sd1 e *V. slavinii* apresentam resistência parcial a doença. Baco 1, porta-enxerto 420A, *V. vulpina* e *V. cordifolia* foram os acessos mais suscetíveis. O bioensaio de discos foliares permitiu classificar os 25 acessos do BAG-Uva em quatro classes de resistência ao patógeno. Os acessos resistentes e parcialmente resistentes podem ser utilizados em futuros programas de melhoramento genético da videira para resistência à *P. euvitis*.

Palavras-chave: *Vitis* spp., melhoramento genético, caracterização de germoplasma, resistência à doenças, interação planta-patógeno.

4.2 INTRODUÇÃO

A viticultura no Brasil é considerada uma atividade econômica recente, quando comparada aos tradicionais países produtores de uva e está difundida do Sul ao Norte, em regiões de clima subtropical e tropical (MYLES *et al.*, 2011; CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011). As condições climáticas predominantes nestas regiões podem favorecer o aparecimento de diversas doenças, dentre elas o míldio (*Plasmopora vitícola* (Berk. & Curt) Berl. & de Toni), oídio (*Erysiphe necator* (Schweinf.) Burrill), antracnose (*Elsinoe ampelina* (de Bary) Scheer) (SÔNEGO; GARRIDO, 2003), e potencialmente à ferrugem (*Phakopsora euvitis* Ono), na presença de condições ambientais propícias ao seu desenvolvimento e na ausência de medidas efetivas para o seu controle (SÔNEGO; GARRIDO; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2005; TESSMANN; VIDA, 2005; NOGUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2017).

A ferrugem da videira foi relatada pela primeira vez na Ásia (HIRATSUKA de 1935), já foi encontrada nas Américas, (ONO, 2000; TESSMANN; VIDA; LOPES, 2003) e na Oceania (WEINERT *et al.*, 2003), no entanto, é ausente na Europa (PRIMIANO *et al.*, 2017). No Brasil, foi descrita pela primeira vez no município Jandaina do Sul, no estado do Paraná (TESSMANN; VIDA; LOPES, 2003), em seguida nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Bahia (TESSMANN *et al.*, 2004), Mato Grosso (SOUZA, 2004), Rio Grande do Sul (GAVA *et al.*, 2003), Santa Catarina (SONEGO; GARIDO; GAVA, 2005), Espírito Santo (COSTA; VENTURA, 2009), Roraima (HALFELD-VIEIRA; NECHET; BARBOSA, 2009), Minas Gerais (XAVIER *et al.*, 2012) e Goiás (GOMES *et al.*, 2016).

Ao colonizar o tecido, o patógeno induz o aparecimento de estruturas de frutificação, denominadas urédias, pústulas, circulares de coloração amarela a alaranjada sob a face abaxial das folhas. Na superfície adaxial, ocorre a necrose do tecido, formando lesões de coloração castanha a avermelhada de tamanho variável e formato angular (LEU; WU, 1983; TESSMANN *et al.*, 2004; SONEGO; GARIDO; GAVA, 2005; ANGELOTTI, 2006; EDWARDS, 2015). Acredita-se que o micélio do patógeno cresça intercelularmente através do mesófilo, produz haustórios para a absorção de nutrientes (STAPLES, 2000; MENDGEN; HAHN, 2002; NOGUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2017). Sob alta severidade da doença, as lesões necróticas são densamente distribuídas sobre o limbo foliar, diminuindo a assimilação de CO₂ e comprometendo a taxa fotossinteticamente ativa das folhas. O patógeno sequestra

carbono e desvia os metabólitos dos produtos fotossintéticos para seu próprio benefício (TESSMANN *et al.*, 2004; HODSON, 2011; HELFER, 2013; NOGUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2017).

Em condições controladas, a germinação dos urediniósporos necessita de temperatura ótima de 24 à 25°C, na presença ou ausência de luz, com período de molhamento foliar superior a 12 horas (NARUZAWA *et al.*, 2006; ANGELOTTI *et al.*, 2011; EDWARDS, 2015; PRIMIANO *et al.*, 2017). No campo, são restritas as informações epidemiológicas nas condições ambientais brasileiras (SCAPIN-BUFFARA *et al.*, 2018). Sabe-se que regiões de clima tropical e subtropical, a doença pode ocorrer em todo o ciclo das plantas e ser mais severa, devido à sobrevivência do fungo ser favorecida pela presença das folhas e a possibilidade de produzir mais de uma safra por ano. Já nas regiões de clima temperado, a doença tem sido observada somente no final do ciclo da cultura (ONO 2000; SONEGO; GARIDO; GAVA, 2005; WEINERT *et al.*, 2003). A ferrugem já é considerada uma importante doença em uvas de mesa no noroeste do estado de São Paulo (NAVES; GARRIDO; SÔNEGO, 2006), sendo mais severa na estação entre verão-outono do que no inverno-primavera (SCAPIN-BUFFARA *et al.*, 2018). Em decorrência de mudanças nas condições climáticas, os danos causados pela doença podem ser significativos (GHINI; HAMADA; BETTIOL, 2011; PRIMIANO *et al.*, 2017; PONTI *et al.*, 2018; HODSON, 2011). De acordo com Garrido; Angelotti (2011) a projeção para a década de 2080 prevê o aumento significativo da severidade da ferrugem da videira nas regiões Sul e Sudeste do Brasil nos meses de fevereiro a abril (NOPSA; THOMAS-SHARMA; GARRETT, 2014; GÓMEZ-ZELEDÓN; KAISER, 2016).

O uso de produtos químicos consiste na técnica de controle mais utilizada para o seu controle. No Mapa (2018) são registrados para a cultura e patógeno produtos com princípio ativo tebuconazol e estrobilurina. O controle químico além de elevar os custos de produção, deixa resíduos, influenciando negativamente na saúde dos animais, humanos e do ambiente (GHINI; BETTIOL, 2000), induz a seleção de fitopatógenos resistentes e pode causar fitotoxidez às plantas, quando utilizado de forma inadequada (SOBRINHO *et al.*, 2005). Inversamente, o controle genético é considerado o método mais eficiente e sustentável para o controle de doenças de plantas, pois, contribui de forma significativa na redução do uso de produtos químicos no setor vitícola (ELLINGBOE, 1978). Embora grandes avanços foram alcançados na genética e melhoramento da videira para resistência ao míldio e oídio, outras doenças,

como é o caso da ferrugem, foram negligenciadas e poucos estudos estão disponíveis. No caso da ferrugem, sabe-se que os porta-enxertos '41B' e 'Seibel 128' apresentam maior nível de resistência ao patógeno (HENNESSY; DALY; HEARNDEN, 2007). E que nos porta-enxertos IAC313, IAC572 e IAC766, há baixa eficiência da infecção do patógeno (ANGELIOTTI, 2008). Deste modo, estudos sistemáticos caracterizando o germoplasma da videira quanto a resistência a ferrugem são fundamentais para dar suporte a programas de melhoramento e permitir a introgressão de genes de resistência a doença em germoplasma cultivado (MONTAIGNE; COELHO; KHEFIFI, 2016). O desenvolvimento de novas cultivares de videira é demorado, trabalhoso e de custo elevado (ALLEWELDT G; POSSINGHAM, 1988; GÓMEZ-ZELEDÓN; KAISER, 2016). No entanto, a sustentabilidade econômica e ambiental do setor vitícola, em longo prazo, dependerá da exploração da diversidade genética da videira (MYLES *et al.*, 2011). Um dos grandes desafios da viticultura mundial, incluindo o Brasil, é a redução na aplicação de fungicidas.

A primeira etapa de um programa de melhoramento genético com ênfase na resistência a qualquer doença, consiste na identificação seguida da seleção das fontes de resistência (SIVIERO *et al.*, 2002; ANGELOTTI *et al.*, 2008; RAWAT, 2016), oriundas de espécies localizadas nos centros de origem, ou então, espécies, cultivares ou híbridos protegidos em Bancos Ativos de Germoplasmas - BAGs (TÖPFER *et al.*, 2011). Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo geral caracterizar acessos de videira quanto a resistência à *P. euvitis*, através de bioensaio com discos foliares. Os acessos testados foram obtidos do Banco Ativo de Germoplasma da Uva - BAG-Uva, da Embrapa Uva e Vinho, selecionados de modo a representar o maior número de espécies de *Vitis* presente no BAG.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Local de execução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Santa Catarina/Campus de Curitibanos, Santa Catarina.

4.3.2 Obtenção e multiplicação de *P. euvitis*

Folhas de videira com sintomas de ferrugem foram coletadas de plantas do porta-enxerto '420A' infectadas naturalmente à campo no município de Canoinhas, estado de Santa Catarina, Brasil. As folhas com sintomas foram levadas ao laboratório, onde realizou-se a identificação da doença através de comparações com a literatura (ONO, 2000; TESSMANN *et al.*, 2004; ANGELOTTI *et al.*, 2008; SPHD, 2015).

O inóculo foi coletado a partir de uma monopústula. O mesmo foi depositado sobre folhas destacadas do porta-exerto 420A sem pilosidade que foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (1,5% de cloro ativo), seguida da tríplice lavagem com água estéril e secas com papel toalha. As folhas foram depositadas em placas de Petri (90 mm), com a parte abaxial voltada para cima sobre ágar-água (1,5%) (PÉROS *et al.*, 2006). A inoculação dos urediniósporos foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Zambolim e Chaves (1974), sendo que, água esteril aspergida sobre a face abaxial das folhas, a monopústula foi depositada com agulha histológica e espalhadas com um pincel sobre o limbo foliar. As placas de Petri foram mantidas em câmara DBO (demanda bioquímica de oxigênio), com fotoperíodo de 12 horas de luz e temperatura de 25°C ± 2 (COPATTI, 2011).

Foram realizadas multiplicações sucessivas a partir monopústula até se ter inóculo suficiente para a implantação dos experimentos.

4.3.3 Material vegetal

Nos ensaios de resistência à *P. euvitis* foram utilizados 25 acessos de videira do Banco Ativo de Germoplasma de Uva, BAG-Uva, localizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Uva e Vinho, no município de Bento Gonçalves – RS (Tabela 9). Os acessos foram selecionados de modo o representar o maior número de espécies dentro do gênero *Vitis*. Foi coletada a quarta folha, do ápice para base de plantas, utilizando folhas totalmente expandidas. As plantas eram conduzidas em vaso em casa de vegetação, sob condições ambientais controladas, no final do ciclo produtivo das plantas, em março de 2018.

Tabela 9 - Acessos de videira (*Vitis* spp.) do Banco Ativo de Germoplasma da Uva, mantidos pela Embrapa Uva e Vinho utilizados nos ensaios de resistência à *P. euvinis*.

Genótipo	Acesso	Espécie
Niágara Rosada	2798	<i>Vitis labrusca</i> x <i>V. vinifera</i>
420-A MGT	1781	<i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis riparia</i>
Sangiovese	643	<i>Vitis vinifera</i>
<i>V. cordifolia</i>	1076	<i>Vitis cordifolia</i>
<i>V. shuttleworthii</i>	2378	<i>Vitis shuttleworthii</i>
<i>V. longii</i>	2513	<i>Vitis longii</i>
<i>V. doaniana</i>	2476	<i>Vitis doaniana</i>
Baco 1	755	<i>V. riparia</i> x <i>V. labrusca</i>
Herbemont	1173	<i>Vitis bourquina</i>
Seibel 128	999	'Jaeger 70' (<i>V. linsecumii</i> x <i>V. rupestris</i>) x <i>V. vinifera</i>
IAC 766	2033	'106-8 Mgt' [<i>V. riparia</i> x (<i>V. rupestris</i> x <i>V. cordifolia</i>)] x <i>V. tilifolia</i>
<i>V. silvestris</i>	2438	<i>Vitis silvestris</i>
Seibel 405	708	Seibel 14 ['Jaeger 70' (<i>V. linsecumii</i> x <i>V. rupestris</i>) x <i>V. vinifera</i>] x 'Ganzin 1' (<i>V. vinifera</i> x <i>V. rupestris</i> ganzin)
<i>V. vulpina</i>	2377	<i>Vitis vulpina</i>
<i>V. thunbergii</i>	2462	<i>Vitis thunbergii</i>
<i>V. berlandieri</i>	2208	<i>Vitis berlandieri</i>
<i>V. girdiana</i>	2474	<i>Vitis girdiana</i>
<i>V. del rioi</i> Sd1	3092	<i>Vitis del rioi</i>
<i>V. candicans</i>	2206	<i>Vitis candicans</i>
Gropel	1345	<i>Vitis bourquina</i>
<i>V. slavinii</i>	2559	<i>Vitis slavinii</i>
<i>V. arizonica</i>	2473	<i>Vitis arizonica</i>
<i>V. andersoni</i>	2515	<i>Vitis andersoni</i>
<i>V. Jacquemontii</i>	2701	<i>Vitis Jacquemontii</i>
<i>V. amurensis</i>	2567	<i>Vitis amurensis</i>

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.4 Inoculação de *P. euvitis*

Discos foliares de 12 mm das folhas de todos os acessos estudados, foram recordados. Os 12 discos por acesso foram submetidos a tríplice lavagem, como descrita no item 3.3.2 e acondicionados sobre meio ágar-água (15g/L) em placas de Petri de 90 mm. Sobre a face adaxial dos discos foi depositada uma gota de 30 µL da suspensão de urediniósporos, na concentração 30.000 urediniósporos/mL. Simultaneamente a implantação do experimento foi realizado o teste de viabilidade dos urediniósporos, seguindo a metodologia proposta por Beledelli *et al.*, (2012), conforme descrito no item 3.3.3.

Após a inoculação, as placas de Petri foram acondicionadas na câmara de crescimento DBO, com temperatura de 25°C ± 2, ficando as primeiras 24 horas na ausência de luz, posteriormente com fotoperíodo de 12 horas de luz (COPATTI, 2011).

O delineamento experimental utilizado foi blocos inteiramente casualizados, com quatro blocos, sendo cada unidade experimental constituída por três discos.

4.3.4 Avaliação de componentes de resistência à *P. euvitis*

Para determinar o nível de resistência ao patógeno os componentes de resistência avaliados foram período latente (PL), número de pústulas por disco, número de pústulas por cm², diâmetro médio de pústula, severidade e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPSD).

Avaliou-se o período latente, que se refere ao tempo em dias entre a inoculação da suspensão de urediniósporos ao aparecimento das primeiras pústulas contendo urediniósporos (ALVES, 2005; AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

Realizou-se a captura diária de imagens fotograficas dos discos a partir do aparecimento das primeiras pústulas até 10 dpi, através do software Tropviewn versão 3.7 com estereomicroscópio (x 20). Com o programa ImageJ versão 1.51j8 foi determinado o número de pústulas por disco, o número de pústulas por cm² e o diâmetro médio de pústulas, a severidade (% de área foliar infectada em 40 mm², multiplicada por 4) e visualmente a intensidade de tricomas sobre os discos foliares, atribuindo sinais de mais. Através da severidade foi determinada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPSD), através da fórmula descrita por Shaner &

Finney (1977): $AACPSD = \sum ((Y_i + Y_{i+1})/2)(t_{i+1} - t_i)$, onde “Y” representa a intensidade da doença, “t” o tempo e “i” o número de avaliações no tempo.

Os acessos foram classificados de acordo com a escala de resistência considerando a severidade (Tabela 10).

Tabela 10 - Escala de classificação da resistência à *P. euvitis* em acessos de videira de acordo com a severidade da doença em uma área de 40 mm².

Classe	Categoria	Severidade
1	Resistente	<2
2	Parcialmente resistente	2-5
3	Suscetível	6-30
4	Muito suscetível	>31

Fonte: Elaborato pelo autor.

4.3.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) no programa estatístico Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 1998). Quando houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre os tratamentos realizou-se o teste de comparação de médias de Scott knot. E realizou-se a análise multivariada de componentes principais (PCA), executada no programa Canoco 4.5.

4.4 RESULTADOS

A diversidade genética do gênero *Vitis* spp. permite a identificação de fontes de resistência a doenças, bem como, a ferrugem da videira. A resistência genética deve ser explorada para que cultivares resistentes a ferrugem seja disponibilizadas no mercado.

Neste estudo houve diferença estatística significativa entre os 25 acessos avaliados quanto aos componentes de resistência ($p < 0,05$), conforme apresentado na Tabela 11. O período latente nos genótipos mais resistentes foi de 10 dias e nos mais suscetíveis iguais a cinco dias. Os acessos IAC 766 e Seibel 405 apresentaram menor severidade 0,03% e 1,48%, ambos não possuem tricomas sobre o limbo foliar, e foram classificados como resistentes. Os acessos Seibel 128, *V. del rioi* Sd1, *V. slavinii* e *V. candidans* apresentam valores intermediários, severidade de 3,66, 3,80%, 4,28% e

4,18%, respectivamente. Destes, *V. candidans* possui alta intensidade de tricomas. Outros acessos com tricomas, a exemplo de *V. girdiana*, *V. berlandieri*, Gropel (*V. bourquina*), *V. shuttleworthii*, Niágara Rosada (*V. labrusca* x *V. vinifera*), *V. doaniana*, *V. longii*, *V. amurenses* e *V. jacquemontii* apresentaram maior intensidade da doença sobre os discos foliares e assim foram enquadradas como suscetíveis. Os acessos, *V. thunbergii*, Baco 1 (*V. riparia* x *V. labrusca*), 420-A MGT (*Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*), *V. cordifolia* e *V. vulpina* apresentam menor período latente e maior severidade, o que permitiu classificá-los como muito suscetíveis.

Tabela 11 - Análise dos componentes de resistência à *Phakopsora euvitis* de 25 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Uva, mantido pela Embrapa Uva e vinho.

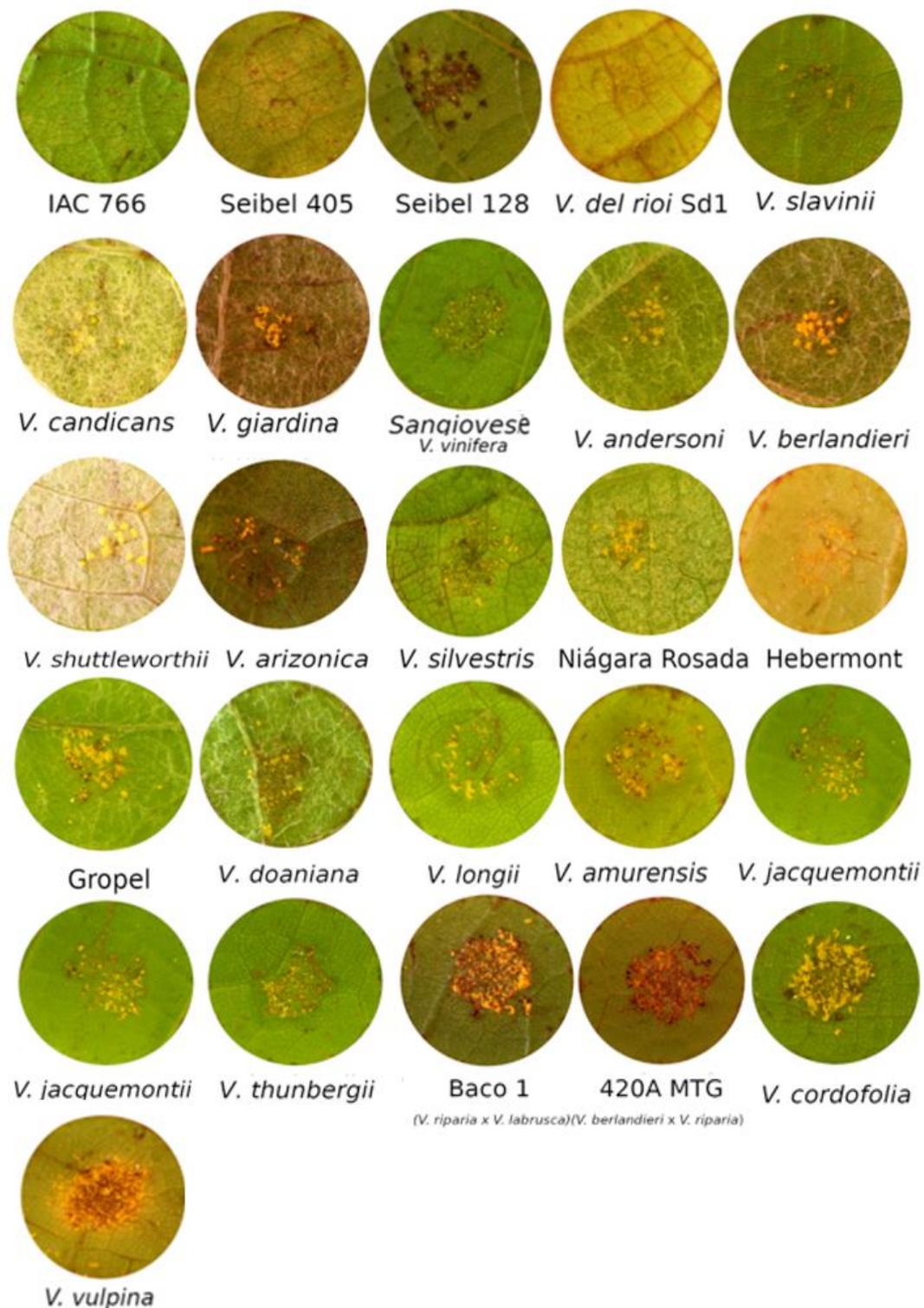
Classe	Intensidade de tricomas	Genótipo	PL (dias)		Severidade (%)	
1		1. IAC 766 (<i>V. tiliifolia</i> x '106-8 Mgt' [<i>V. riparia</i> x (<i>V. rupestris</i> x <i>V. cordifolia</i>)] x <i>V. tiliifolia</i>)	10	A	0,03	A
1		2. Seibel 405 (Seibel 14 x Ganzin1)	8	B	1,48	A
		Média	9		0,75	
2		Seibel 128 (Jaeger 70 x <i>V. vinifera</i>)	8	B	3,66	B
2		<i>V. del rioi</i> Sd1	8	B	3,80	B
2		<i>V. slavinii</i>	8	B	4,28	B
2-3	+++++	<i>V. candidans</i>	8	B	4,18	B
		Média	8		4,23	
3	+++	<i>V. girdiana</i>	6	D	8,96	C
3	+++++	Sangiovese (<i>V. vinifera</i>)	5	E	9,29	C
2	+++	<i>V. andersoni</i>	8	B	10,27	C
3	+++	<i>V. berlandieri</i>	7	C	11,40	C
3	++++	<i>V. shuttleworthii</i>	6,5	C	11,51	C
3		<i>V. arizonica</i>	7	C	11,61	C
3		<i>V. silvestris</i>	6	D	13,86	C
3	+++++	Niágara Rosada (<i>V. labrusca</i> x <i>V. vinifera</i>)	6	D	16,32	D
3		Herbemont (<i>V. bourquina</i>)	7	C	16,94	D
3	+	Gropel (<i>V. bourquina</i>)	7	C	19,21	D
3	++	<i>V. doaniana</i>	7	C	19,22	D
3		<i>V. longii</i>	6	D	22,30	E
3		<i>V. amurenses</i>	6	D	23,62	E
3		<i>V. jacquemontii</i>	6	D	28,05	E
		Média	6		15,89	
4		<i>V. thunbergii</i>	6	D	44,11	F
4		Baco 1 (<i>V. riparia</i> x <i>V. labrusca</i>)	5	E	46,37	F
4		420-A MGT (<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>)	5	E	55,36	G
4		<i>V. cordifolia</i>	5	E	56,97	G
4		<i>V. vulpina</i>	5	E	100,00	E
		Média	5		61,00	
		Média Geral	7		21,86	

PL -Período latente - C.V = 7,22% dados normais; Severidade C.V = 13,62, dados transformados através da fórmula $\sqrt{(x + 0,5)}$.

Na Figura 9 é possível observar a intensidade da doença nos discos de todos os genótipos analisados. Acessos com resistência apresentam menor intensidade da doença e conforme aumenta a suscetibilidade da planta, é maior a região ocupada pelas pústulas.

O acesso Seibel 128 desencadeou resposta de hipersensibilidade, quando em contato com o patógeno. Em *V. thunbergii* é possível verificar a erupção de novas pústulas, pequenas e lisas, indicando possivelmente a ocorrência de ciclos secundários, o que poderá resultar em maior intensidade da doença ao longo do tempo. Em *V. vulpina*, a grande intensidade da doença induziu o aparecimento de lesões necróticas do tecido, levando a senescência da folha.

Figura 9 - Intensidade de esporulação de acessos do gênero *Vitis* spp. na presença de *Phakopsora euvitis*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

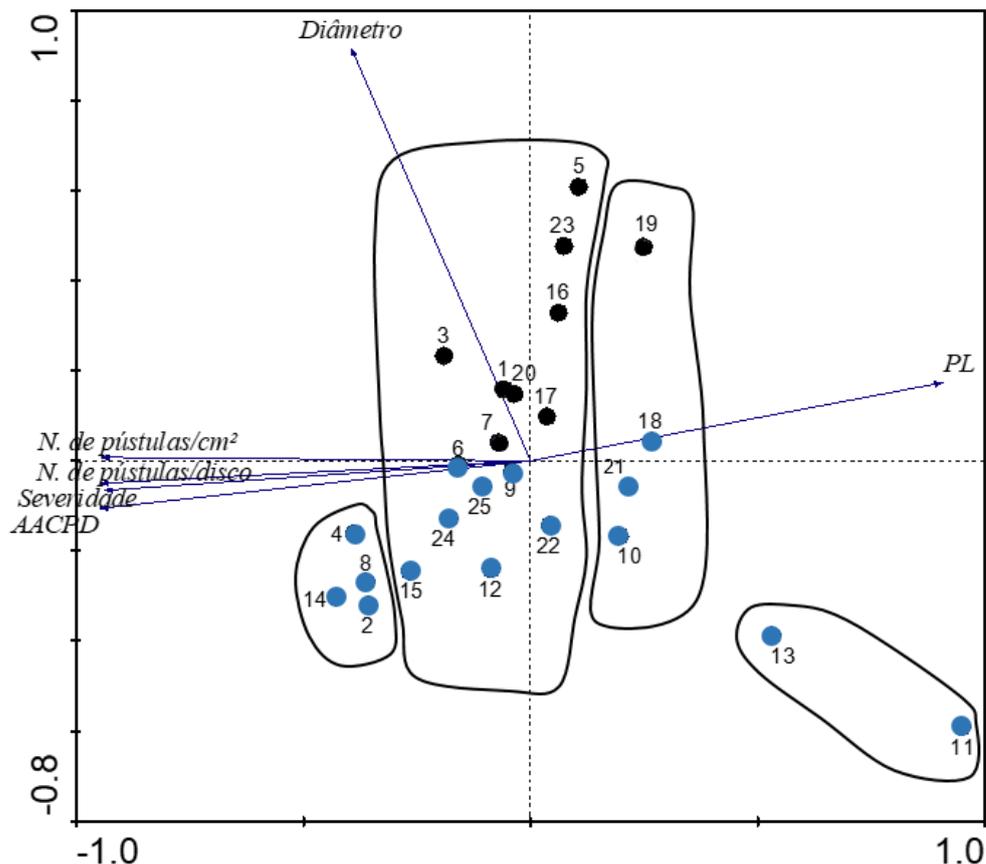
Através da análise multivariada dos componentes principais (PCA), o eixo X explica 75,9%, e o eixo Y explica 14,8% da distribuição dos acessos em relação os componentes epidemiológicos de resistência, totalizando 90,7% da variação (Figura

10). Os dados da análise multivariada reforçam os resultados obtidos na ANOVA. Quanto maior o período latente, menores serão o nº de pústulas por disco e por cm², severidade e AACPSD.

O acesso IAC 766 (11) e Seibel 405 (13) são os mais discrepantes dos demais, com maior período latente e menor severidade e AACPSD e foram classificados como resistentes. Os acessos parcialmente suscetíveis, Seibel 128 (10), *V. del rioi* Sd1 (18), *V. slavinii* (21) e *V. candicans* (19) estão distribuídos praticamente na mesma posição do eixo X, variando no eixo Y de acordo com o diâmetro das pústulas.

Os acessos suscetíveis foram distribuídos próximos a interseção do eixo X com o eixo Y, sendo eles: *V. shuttleworthii* (5), *V. andersoni* (23), *V. berlandieri* (16), *V. girdiana* (17), *V. arizonica* (22), Gropel (20), Niágara Rosada (1), *V. doaniana* (7), Herbemont (9), *V. silvestres* (12), *V. amurenses* (25), Sangiovese (3), *V. longii* (6), *V. jacquemontii* (24). Os acessos *V. vulpina* (14), *V. cordifolia* (4), Baco 1 (8), 410-A MGT (2), *V. thunbergii* (15) foram os que apresentaram menor período latente, e maior severidade e AACPSD, sendo distribuídos na extremidade esquerda do eixo X, sendo classificados como muito suscetíveis a ferrugem.

Figura 10 - Análise da multivariada Biplot bidimensional dos componentes principais das variáveis referentes aos componentes de resistência à *Phakopsora euvtis*, inoculado in vitro sobre discos foliares de 25 acessos de *Vitis* spp. do BAG-Uva com diferentes níveis de resistência



1 - Niágara Rosada; 2- 410-A MGT; 3 – Sangiovese; 4 – *V. cordifolia*; 5 – *V. shuttleworthii*; 6 – *V. longii*; 7- *V. doaniana*; 8 - Baco 1; 9 – Herbemont 10 - Seibel 128; 11 - IAC 766; 12 – *V. silvestris*; 13 -Seibel 405; 14 – *V. vulpina*; 15 – *V. thunbergii*; 16 – *V. berlandieri*; 17 – *V. girdiana*; 18 – *V. del rioi* Sd1; 19 – *V. candidans*; 20 - Gropel; 21- *V. slavinii*; 22- *V. arizonica*; 23- *V. andersoni*; 24 – *V. jacquemontii*; 25 – *V. amurensis*; ● Representa acesso com tricomas; ● Representa acessos sem tricomas.

Através da representação gráfica da severidade (Figura 13A) e da AACPSD (Figura 13B), é visível a diferença existente entre os acessos. Quanto maior a severidade e a AACPSD, mais suscetível é o acesso e quanto menor a severidade e a AACPSD, maior o nível de resistência. Assim, os acessos IAC 766 e Seibel 405 foram classificados como resistentes, enquanto que *V. del rioi* Sd1; Seibel 128 e *V. slavinii*, são parcialmente resistentes, *V. shuttleworthii* e *V. longii* como suscetíveis e *V. cordifolia* como muito suscetível.

4.5 DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados 25 acessos do Banco de germoplasma de uva, mantido pela Embrapa Uva e Vinho. Estes acessos selecionados representam

16 espécies diferentes de videira (*Vitis* spp.), cinco híbridos e quatro cultivares. Quando considerado a genealogia dos híbridos e cultivares, o número de espécies de *Vitis* representada é de 23. Apesar de haver diversidade genética intraespecífica, optou-se em fazer um primeiro ensaio de resistência utilizando apenas um acesso por espécie, para depois, ampliar os estudos com as espécies associadas com a resistência a *P. euvitis*.

A técnica de discos foliares consiste em um bioensaio *in vitro* rotineiramente utilizado para ensaios de resistência ao míldio da videira em estudos de caracterização de germoplasma, mapeamento genético de loci de resistência e de virulência (STAUDT; KASSEMAYER, 1995; BROWN *et al.*, 1999; JÜRGES *et al.*, 2009; SCHWANDER *et al.*, 2012; CALO; NEC *et al.*, 2012; BOSO *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015; SANCHEZ-MORA, *et al.* 2017; SAIFERT *et al.*, 2018 GÓMEZ-ZELEDÓN; KAISER, 2016). Cohen (1993) através da técnica avaliou a resistência de amostras de melão (*Cucumis melo*) ao oídio, causada pela raça 1 de *Sphaerotheca fuliginea*. Santos *et al.*, (2009) para comparar métodos de caracterização da resistência do cacauzeiro (*Theobroma cacao*) à podridão-parda (*Phytophthora palmivora*). Tyson; Afullerton, (2015) desenvolveu um bioensaio em disco foliar para identificação de genótipos de taro com tolerância a *Phytophthora colocasiae* agente causal da ferrugem do taro (*Colocas esculenta*). Guyer *et al.*, (2015) fez uso da mesma para testar o potencial de bactérias no controle de *P. infestans*, com análise automatizada de imagens. Estas informações, demonstram a ampla utilização da técnica em diversos patossistemas, na busca de materiais resistentes. Para o patossistema videira x *P. euvitis* o bioensaio em discos foliares também demonstrou ser efetivo para os ensaios de resistência.

Os resultados deste estudo demonstram que há diferenças no nível de resistência/suscetibilidade à *P. euvitis* entre os acessos de videira testados, assim como já relatado em outros estudos (PATIL *et al.*, 1998; HENNESSY; DALY; HEARNDEN, 2007; ANGELOTTI, 2008). Os acessos foram divididos em quatro classes de resistência/suscetibilidade de acordo com a severidade: 1) resistentes, 2) parcialmente resistentes, 3) suscetíveis e 4) muito suscetíveis. A severidade e AACPSD consistem nas variáveis mais representativas para determinar o nível de resistência das plantas com e sem tricomas, pois em sua determinação integram outras variáveis mensuradas. A AACPSD maior é a mais robusta, pois em sua determinação leva em consideração o percentual de área lesionada (severidade)

desde o início do aparecimento dos sintomas, ou seja, inclui em suas mensurações o número e tamanho de pústula e o período de latência. Toffolatti *et al.*, (2012) afirma que o nível de doença expresso como AACPSD representa a interação entre a virulência do patógeno e a resistência do hospedeiro. No entanto, é uma variável que demanda muito trabalho para a sua mensuração. Devido a severidade ter apresentado elevada correlação (0,9) com a AACPSD e ser de fácil mensuração, esta foi adotada para definir as classes de resistência. Com a possibilidade da automatização das análises de imagens, o uso da severidade da doença aos 10 dpi viabiliza a fenotipagem de populações de plantas (LI; ZHANG; HUANG, 2014; MUTKA; BART, 2015; BUONASSISI *et al.*, 2017; MATSUNAGA *et al.*, 2017).

A maioria dos acessos avaliados foram classificados como suscetíveis (56%) ou muito suscetíveis (20%) (Tabela 11). Dentre eles, oito já foram relatados na literatura como suscetíveis. Incluindo apenas três espécies, demonstrando a importância do presente estudo em ampliar a avaliação do número espécies de videira (*Vitis* spp.), quanto a resistência à ferrugem.

Os componentes epidemiológicos de resistência permitiram visualizar a resposta do hospedeiro durante a sua interação com o patógeno. Os acessos suscetíveis apresentaram em média período latente menor, severidade e AACPSD maiores quando comparados aos acessos classificados como resistentes ou parcialmente resistentes. Segundo Parlevliet, (1985), na presença de resistência quantitativa ou parcial além do aumento do período de latência, os mecanismos de defesa do hospedeiro resultam na redução da intensidade da doença, devido a menor taxa de infecção.

Assim como no presente estudo, Hennessy; Daly; Hearnden (2007) também observaram o estabelecimento de *P. euvitis* nas espécies *V. cordifolia*, *V. vinifera*, *V. longii*, e juntamente com Angelotti, (2008) e Scapin-Buffara *et al.*, (2018), classificaram a cv. Niágara rosada (*V. labrusca*) como suscetível ao patógeno em ensaio em casa de vegetação e à campo. Navaro (2016) também observou em estudos epidemiológicos que *V. labrusca* apresenta maior intensidade de ferrugem da videira do que *V. vinifera*, embora ambas sejam suscetíveis. A congruência dos resultados do presente bioensaio com estudos prévios reforça a eficácia do uso de discos foliares na caracterização de germoplasma quanto a resistência a *P. euvitis*.

Apenas os acessos IAC 766 e Seibel 405 (8%) foram classificadas como resistentes à ferrugem e apresentaram em média período latente maior e menor

severidade. Angelotti (2008), também classificou o porta-enxerto IAC 766 como classe I (resistente). O acesso Seibel 405 ainda não foi avaliado em outros trabalhos, sendo identificado pela primeira vez como fonte de resistência a doença. O acesso IAC 766 é uma cultivar de porta-enxerto obtido do cruzamento entre '106-8 Mgt' [*V. riparia* x (*V. rupestris* x *V. cordifolia*)] x *V. tilifolia* desenvolvida no Brasil pelo Instituto Agrônomo de Campinas (SILVA *et al.*, 2010). Supõe-se que a resistência pode ser oriunda de *V. riparia* e/ou *V. rupestris* e/ou *V. tilifolia*, já que *V. cordifolia* foi classificada como muito suscetível neste trabalho. Considerando que *V. riparia* é parental de 420-A MGT (suscetível à doença), juntamente com *V. berlandieri* (suscetível à doença), *V. rupestris* pode ser o doador da resistência já que também está na genealogia de Seibel 405, que foi desenvolvida na França por Alberta Seibel, a partir, do cruzamento entre Seibel 14 ['Jaeger 70' (*V. linsecumii* x *V. rupestres*) x *V. vinifera*] x 'Ganzin 1' (*V. vinifera* x *V. rupestris* ganzin) (<http://www.vivc.de>). Angelotti, (2008), em seu estudo classificou o porta-enxerto Rupestris (*V. rupestris*) como classe II (resistência parcial). Patil *et al.*, (1999), classificou *V. riparia* e *V. rupestres*, como resistentes. Assim, os parentais *V. riparia*, *V. rupestres*, *V. tilifolia* e *V. linsecumii* devem ser avaliados em estudos futuros, pois podem ser importantes fontes de resistência à *P. euvitis* a serem explorados em programas de melhoramento genético.

Os acessos Seibel 128, *V. del rioi* Sd1, *V. slavinii* e *V. candicans* foram classificados como parcialmente resistentes. Para Seibel 128 o mesmo resultado foi encontrado por Hennessy; Daly; Hearnden (2007). *V. del rioi* Sd1, *V. slavinii*, ainda não foram relatados em outros trabalhos, sendo considerados pela primeira vez como fonte de resistência a ferrugem. *V. candicans* foi classificado por Patil *et al.*, (1998) como resistente. Assim como Seibel 405, Seibel 128 possui 'Jaeger 70' [*V. linsecumii* x *V. rupestres*] x *V. vinifera* (<http://www.vivc.de>) em sua genealogia, reforçando a importância da avaliação da resistência dos parentais envolvidos nestes cruzamentos.

Patil *et al.* (1998) em avaliações à campo registrou que o cruzamento *V. riparia* x *V. rupestris* foi altamente resistente a ferrugem. No entanto, Hennessy; Daly; Hearnden (2007) ao avaliar Schwarzmann, seleção deste cruzamento, a classificou como suscetível. O híbrido 41 B Mgt, resultante do cruzamento entre *V. vinifera* e *V. berlandieri* foi classificado por Hennessy; Daly; Hearnden, (2007) como altamente resistente. No entanto, ambas as espécies foram classificadas como suscetíveis neste estudo. O que pode ser explicado pela variabilidade genética do patógeno em

diferentes locais e também pela variabilidade genética intraespecífica do hospedeiro (TOFFOLATTI *et al.*, 2012).

Como resposta da interação planta-patógeno Seibel 128 apresentou necroses nos pontos de infecção do patógeno (Figura 11), possivelmente devido ao desencadeamento da resposta de hipersensibilidade, através da morte celular programada nos locais de penetração (CHISHOLM, S. T *et al.*, 2006). Nos estudos de Angelotti (2008), o autor observou a presença de necrose do tecido no porta-enxerto IAC 752. A ocorrência de hipersensibilidade é considerada uma resposta comum de mecanismo de resistência contra patógenos biotróficos, poucas horas após a tentativa de infecção, o que pode restringir o crescimento do patógeno (POZO; PEDLEY; MARTIN, 2004). Os demais acessos classificados como resistentes ou parcialmente resistentes não apresentaram necroses visíveis em aumento de 20 x, sugerindo mecanismos diferentes de defesa. A defesa das plantas à patógenos biotróficos está relacionado à capacidade de reconhecer moléculas do patógeno, realizar transdução de sinal e reagir defensivamente através de vias que envolvem a expressão de genes, que regulam alterações na parede celular, formação de calose, síntese de Proteínas R (quitinases ou glucanases), espécies reativas de oxigênio e enzimas antimicrobianas (defensinas e fitoalexinas), que podem atuar isoladamente ou em conjunto (STASKAWICZ *et al.*, 1995; CHISHOLM, S. T *et al.*, 2006; ANDERSEN *et al.*, 2018). No entanto, os reguladores associados à resistência à *P. euvtis* ainda não foram esclarecidos. Por isso, os mecanismos moleculares da interação planta-patógeno, devem ser objeto de estudo para esclarecer as estratégias pré e pós-formadas de defesa utilizadas pelos hospedeiros (BOSO *et al.*, 2014).

Dos acessos classificados com algum grau de resistência, *V. candidans* apresenta tricomas. Os tricomas são considerados uma barreira pré-formada de resistência através da formação de uma superfície hidrofóbica que bloqueia a germinação dos esporos (KORTEKAMP; ZYPRIAN, 1999), neste caso, a presença de tricomas limitou a colonização do tecido pelo patógeno.

Para a produção de novas cultivares de videira, com ênfase na seleção por imunidade ou ao menos para altos níveis de resistência, os genes que conferem estas características são manipulados em gerações segregantes, (ELLINGBOE, 1978; MANDELI, 2002; CAMARGO, 2012). Para facilitar a introgressão de genes de resistência em genótipos elite é fundamental conhecer a herança do caráter, bem como localizar o(s) gene(s) que conferem a resistência, desenvolver marcadores

moleculares (MM) ligados a estes genes e usá-los em retrocruzamentos-assistidos por MM para acelerar a introgressão (HERZOG *et al.*, 2013; TÖPFER *et al.*, 2011). Assim como já realizado em patossistemas da ferrugem do trigo (BUERSTMAYR, M *et al.*, 2014) e do míldio da videira (MERDINOGLU *et al.*, 2003; WIEDEMANN-MERDINOGLU *et al.* 2006; WELTER *et al.*, 2007; EIBACH *et al.*, 2007; BELLIN *et al.* 2009; MARGUERIT *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2010; SCHWANDER *et al.*, 2012; VENUTI *et al.*, 2013). Portanto, o presente estudo identificou acessos de videira com diferentes níveis de resistência à ferrugem que precisam agora ser empregados em estudos genéticos para esclarecer a herança da característica e localizar os genes que conferem a resistência.

Assim como já relatado por Hennessy; Daly; Hearnden, (2007) para a ferrugem da videira e por demais autores para diversas doenças, o controle genético consiste em uma estratégia econômica e ecológica de grande importância (BUERSTMAYR *et al.*, 2014) através do uso de cultivares resistentes ou parcialmente resistente (MYLES *et al.*, 2011; MONTAIGNE; COELHO; KHEFIFI, 2016). O uso de cultivares resistentes permite a redução do uso de produtos químicos e a sustentabilidade da viticultura (BUONASSISI *et al.*, 2017).

4.6 CONCLUSÕES

O bioensaio de discos foliares foi efetivo na caracterização de germoplasma de videira quanto a resistência/suscetibilidade a *P. euvitis*, permitindo classifica-los os 25 acessos do Banco Ativo de Germoplasma da Uva.

Os acessos IAC 766 (acesso 2033) e Seibel 405 (acesso 708) são os mais resistentes ao isolado de *P. euvitis* utilizado, enquanto que acessos Seibel 128 (acesso 999), *V. del rioi* Sd1 (acesso 3092), *V. slavinii* (acesso 2559) e *V. candidans* (acesso 2206) apresentam resistência parcial a doença.

Os acessos resistentes e parcialmente resistentes podem ser explorados em programas de melhoramento genético da videira para resistência à *P. euvitis*.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi adaptado e validado um bioensaio *in vitro* através de discos foliares para fenotipagem da resistência/susceptibilidade a ferrugem da videira. O bioensaio foi efetivo para acessos com e sem tricomas na face abaxial das folhas. Este bioensaio, associado a automatização de análise de imagens, permite a fenotipagem rápida e precisa de grande número de plantas.

A concentração de 30.000 urediniósporos/mL na ausência do surfactante Tween 20, permitiu a caracterização do nível de resistência à *P. euvitis*, através da avaliação do período latente e da severidade da doença em plantas com e sem tricomas sobre a superfície foliar.

O emprego do bioensaio permitiu classificar acessos do BAG-uva em quatro níveis de resistência/susceptibilidade à ferrugem da videira (*P. euvitis*) e possibilitou a identificação de novas fontes de resistência a doença.

Os acessos IAC 766 (acesso 2033) e Seibel 405 (acesso 708) são resistentes ao isolado de *P. euvitis* utilizado, enquanto que os acessos Seibel 128 (acesso 999), *V. del rioi* Sd1 (acesso 3092), *V. slavinii* (acesso 2559) e *V. candidans* (acesso 2206) apresentam resistência intermediária à doença. Todos estes acessos são fontes de resistência a doença que podem ser explorados em programas de melhoramento genético da videira com ênfase na resistência genética à *P. euvitis*. Eles também podem ser utilizados em estudos de interação hospedeiro-patógeno, para a compreensão das estratégias de defesa utilizadas por estas plantas e estudos genéticos para a localização dos genes.

REFERÊNCIAS

- ADAM-BLONDON, A. F. et al. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. **Theoretical and Applied Genetics**, [s.l.], v. 109, n. 5, p.1017-1027, 4 jun. 2004
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5 ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.
- ALAGUMANI, T.; ANJUGAM, M. Economic analysis of grape production in Tamil Nadu. *Journal of Innovative Agriculture*, v.5, n.1, p. 13-18, mar 2018.
- ALLEWELDT G; POSSINGHAM J.V. Progress in grapevine breeding. **Theoretical and Applied Genetics** v. 75, p. 669-673, 1988.
- ALMANÇA, M. A. K; LERIN, S; CAVALCANTI, F. R. Doenças da videira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 36, n. 289, p.7-12, 2015.
- ALVES et al. Influência da temperatura e da duração do período de molhamento foliar no desenvolvimento da ferrugem da soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p.127. 2005.
- ALVES, R. F; MASSOLA JUNIOR, N. S; SPÓSITO, M. B. Preservation of the urediniospores of *Phakopsora euvtis*, the causal agent of grape leaf rust. **European Journal of Plant Pathology**, [s.l.], v. 150, n. 4, p.1103-1106, 2017.
- AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Fenologia, patometria e quantificação de danos. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. (eds.) Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2. p. 517-542.
- AMORIM, L.; KUNIYUKI, H. Doenças da videira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. (eds.) Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2. p. 736-757.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo -SP: Agronômica Ceres Ltda, 2011. Cap. 4. p. 69-100.
- ANDERSEN, E et al. Disease Resistance Mechanisms in Plants. **Genes**, [s.l.], v. 9, n. 7, p.1-30, 4 jul. 2018.
- ANGELOTTI, F. **Epidemiologia da ferrugem (*Phakopsora euvtis*) da videira (*Vitis spp.*)**. 2006. 66p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

ANGELOTTI, F. et al. Efeito da temperatura e da luz na germinação de urediniosporos de *Phakopsora euvitis*. **Summa Phytopathologica**, [s.l.], v. 37, n. 1, p.59-61, mar. 2011.

ANGELOTTI, F. et al. Resistência de genótipos de videira à ferrugem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 43, n. 9, p.1129-1134, set. 2008.

Associação Nacional dos Fabricantes de Cerâmica para Revestimentos, Louças Sanitárias e Congêneres (ANFACER). História da Cerâmica, 2011. Disponível em: <http://www.anfacer.org.br/principal.aspx?tela=ucTelaConteudos&idMenu=92>. Acesso em: 10 de setembro de 2018.

AZEVEDO V.C.R.; BUSTAMANTE P.G. Recursos genéticos preservados na Embrapa: Histórico e Inventário Atualizado; Brasília, DF: Embrapa, 2014.

BAGIROVA, S.F. Hypersensitivity. **Comprehensive and Molecular Phytopathology**, [s.l.], p.247-263, 2007.

BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL. Agência de Florianópolis. Gerência de Planejamento. **Viticultura em Santa Catarina: situação atual e perspectivas**. – Florianópolis: BRDE, 2005. 83 p

BARBIERI, R.; STEEMPT, E. R. T. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília, DF: Embrapa. p. 909. 2008.

BAYER, T, M.; COSTA, I. F. D da. Ocorrência de *Phakopsora euvitis* Ono em Santa Maria, Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.1307-1308, ago. 2006.

BEDENDO I. P. Ferrugens In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (eds.) Manual de fitopatologia: Princípios e Conceitos. 4.ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. p. 479-485.

BELEDELLI D et al. Viabilidade de urediniosporos de *Phakopsora pachyrhizi* sidow na ausência do hospedeiro. Uberlândia, MG: **Biosci. J.** p. 604-612. Jul-Ago. 2008.

BELLIN, D et al. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. **Theoretical and Applied Genetics**, [s.l.], v. 120, n. 1, p.163-176, 11 out. 2009.

BENNETT, J.S. **Relationships between Carbohydrate Supply and Reserves and the Reproductive Growth of Grapevines (*Vitis vinifera* L.)**. 2007. 222 f. Tese (Doutorado) - Curso de Filosofia, Lincoln University, Christchurch, 2002.

BERGAMIN FILHO, A. Curvas de Progresso da doença. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. Cap. 37. p. 647-666.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; Epidemiologia de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de**

Fitopatologia: Princípios e Conceitos. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. Cap.5. p. 101-118.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M. Importância das doenças de plantas. In: AMORIM, L; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos.** 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. Cap. 2. p. 19-36.

BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. **Introdução ao Melhoramento de Plantas.** In: BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. Melhoramento de Plantas Melhoramento de Plantas. Disponível em www.bespa.agrarias.ufpr.br., p.1-9.

BOCK, C. H. et al. Automated Image Analysis of the Severity of Foliar Citrus Canker Symptoms. **Plant Disease**, [s.l.], v. 93, n. 6, p.660-665, jun. 2009.

BOIS, B.; ZITO, S.; CALONNEC, A. Climate vs grapevine pests and diseases worldwide: the first results of a global survey. **Oeno One**, [s.l.], v. 51, n. 2, p.133-139, 15 maio 2017.

BUONASSISI, D et al. Breeding for grapevine downy mildew resistance: a review of “omics” approaches. **Euphytica**, [s.l.], v. 213, n. 5, p.103-124, 13 abr. 2017.

BOSO, S et al. Susceptibility to downy mildew (*Plasmopara viticola*) of different *Vitis* varieties. **Crop Protection**, [s.l.], v. 63, p.26-35, set. 2014.

BOITEL-CONTI, M. et al. Inducer effect of Tween 20 permeabilization treatment used for release of stored tropane alkaloids in *Datura innoxia* Mill hairy root cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 241–244, 1996.

BORÉM, A; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas.** 5. ed. Viçosa: UFV, 2009. 529 p.

CASAGRANDE, K et al. Defence responses in Rpv3-dependent resistance to grapevine downy mildew. **Planta**, [s.l.], v. 234, n. 6, p.1097-1109, 7 jul. 2011.

BOEDO, C. et al. Evaluation of different methods for the characterization of carrot resistance to the alternaria leaf blight pathogen (*Alternaria dauci*) revealed two qualitatively different resistances. **Plant Pathology**, [s.l.], v. 59, n. 2, p.368-375, abr. 2010.

BRASIL. Ministério da agricultura pesca e abastecimento. Embrapa Uva e Vinho. **Banco Ativo de Germoplasma de Uva.** Bento Gonçalves, 2014. Disponível em:<http://www.cnpuv.embrapa.br/prodserv/germoplasma/>. Acesso em 10 set. 2018.

BROWN, M. V. et al. Comparison of Leaf Disk, Greenhouse, and Field Screening Procedures for Evaluation of Grape Seedlings for Downy Mildew Resistance. **Hortscience**, [s.l.], v. 34, n. 2, p.331-332, abr. 1999.

BUERSTMAYR, M et al. Mapping of quantitative adult plant field resistance to leaf rust and stripe rust in two European winter wheat populations reveals co-location of three QTL conferring resistance to both rust pathogens. **Theor Appl Genet**, [s.l.], v. 127, n. 9, p. 2011–2028, ago. 2014.

BURUTICÁ P. Cambios taxonômico y nuevos registros de Uredinales de la Flora Andina. **Revista del Instituto de Ciencias Naturales y Ecología**, v. 5, p. 173-190, 1994.

BUSIN, I. **A importância do cultivo e da produção da uva bordô para a agricultura familiar de Monte Alegre dos Campos**. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2002. Disponível em: <http://www.emater.tche.br/site/arquivos_pdf/teses/Mono_Ivan_Busin.pdf>. Acesso em: 01 set 2018.

BUSTAMANTE, P. G.; FERREIRA, F. R. Accessibility and exchange of plant germplasm by Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [s.l.], v. 11, p.95-98, jun. 2011.

CALONNEC, A et al. The reliability of leaf bioassays for predicting disease resistance on fruit: a case study on grapevine resistance to downy and powdery mildew. **Plant Pathology**, [s.l.], v. 62, n. 3, p.533-544, 4 ago. 2012.

CAMARGO, U. A. **Uva para Processamento: Cultivares**. 2012. Agência Embrapa de Informações Tecnológicas. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/index.html>>. Acesso em: 05 jul. 2018.

CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 33, n. 1, p.144-149, out. 2011.

CAMARGO, U.A.; PROTAS, J.F.S.; MELLO, L.M.R. Grape growing and processing in Brazil. **Acta Horticulturae**, [s.l.], n. 785, p.51-58, maio 2008.

CANTERI, M. G.; GIGLIOTI, É. A.; SUMIDA, C.H. Fenômica de resistência a doenças. In: FRITSCHÉ NETO, R.; BORÉM, A (Ed.). **Fenômica: Como a fenotipagem de próxima geração está revolucionando o melhoramento de plantas**. [s.l.]: UFV, 2015.

CHATASIRI, S.; ONO, Y. Phylogeny and taxonomy of the Asian grapevine leaf rust fungus, *Phakopsora euvitis*, and its allies (Uredinales). **Mycoscience**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.66-74, fev. 2008.

CHISHOLM, S. T et al. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. **Cell**, [s.l.], v. 124, n.4, p. 803-814, 2016.

COHEN, R. A Leaf Disk Assay for Detection of Resistance of Melons to *Sphaerotheca fuliginea* Race 1. **Plant Disease**, [s.l.], v. 77, n. 5, p.513-517, 1993.

COPATTI, A. S. **Avaliação *in vitro* da resistência de diferentes genótipos de videira à ferrugem**. p.33. TCC (Graduação) –Curso de Agronomia, Universidade Federal do Pampa- Campus Itaqui, 2011.

COSTA, H.; VENTURA, J.A. Ocorrência da ferrugem da videira no Estado do Espírito Santo. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v.42, p.190, 2009.

DALY, A.; HENNESSY, C. **Grapevine Leaf Rust: Assessment of Cultivars for Resistance or Immunity and Fungicides Useful for control (Project1B) and Molecular Characterisation, Host Range and Biological Studies (Project 1C)**. Australia: Northern Territory Department of Primary Industry, Fisheries and Mines, 2007. 36 p.

DANGL, J. L.; HORVATH, D. M.; STASKAWICZ, B. J. Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. **Science**, [s.l.], v. 341, n. 6147, p.746-751, 15 ago. 2013.

DEGLÈNE-BENBRAHIM, L et al. Evaluation of Downy Mildew Resistance in Grapevine by Leaf Disc Bioassay with In Vitro- and Greenhouse-Grown Plants. **American Journal of Enology and Viticulture**, [s.l.], v. 61, n. 4, p.521-528, dez. 2010.

DIAS, M et al. São Francisco valley: Vitivini culture activities in the brazilian unthinkable semiarid climate and its challenges. **International Journal of Business and Management Review**, [s.l.], v. 4, n. 10, p.1-13, dez. 2010.

DIETEL P. Einige Uredinen aus Ostasien. *Hedwigia*, v. 37, p. 212-218, 1898.

DIXON, G R. Climate change – impact on crop growth and food production, and plant pathogens. **Canadian Journal of Plant Pathology**, [s.l.], v. 34, n. 3, p.362-379, jul. 2012.

EDWARDS J. **Grapevine leaf rust**. In: WILCOX W.F, GUBLER W.D, UYEMOTO J.K, eds. *Compendium of Grape Diseases, Disorders and Pests*. St Paul, MN, USA: APS Press, 2015. 61-3 p.

ELLINGBOE, A. H. A genetics analysis of host-parasite interactions. In: SPENCER, D. M. *The powdery mildews*. London: Academic Press, 1978. p. 159-180.

EL-SHARKAWY, H. H. A.; RASHAD, Y. M.; IBRAHIM, S. A. Biocontrol of stem rust disease of wheat using arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma* spp. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [s.l.], v. 103, p.84-91, ago. 2018.

FERREIRA, D. F. *Sisvar - sistema de análise de variância para dados balanceados*. Lavras: UFLA, 1998. 19 p.

FLOR, H.H. Host parasite interaction in flax rust, its genetics and other implications. *Phytopathology*, St. Paul-MN, v.19, p.680-685, 1955.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). *Faostat: Countries by commodity*, 2017. Disponível em: < http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity >. Acesso em 20 jan. 2019.

FULLER, K. B.; ALSTON, J. M.; SAMBUCCI, O. S. The value of powdery mildew resistance in grapes: Evidence from California. **Wine Economics And Policy**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.90-107, dez. 2014.

FURTADO G. Q et al. Influência do estágio fenológico e da idade dos trifólios de soja na infecção de *Phakopsora pachyrhizi*. **Tropical Plant Pathology**, [s.l.], n. 34, v. 2, p. 118–22, 2009.

GALET, P. **A practical ampelography: Grapevine identification**. Ithaca: Cornell University Press, 1979. 248 p.

GARRIDO, L. R.; ANGELOTTI, F. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças da videira no Brasil. In: GHINI, R; HAMADA, E; HAMADA, E (Ed.). **Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambient, 2011. Cap. 20. p. 331-356.

GAVA, R.; SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R. Ocorrência da ferrugem da videira no Rio Grande do Sul e Mato Grosso. In: Congresso brasileiro de viticultura e enologia, 10., Bento Gonçalves, 2003. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p. 201, 2005. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 55).

GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W (Ed.). **Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2011. p.356 .

GHINI, R.; BETTIOL, W. Proteção de plantas na agricultura sustentável. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 17, n. 1, p.61-70, jan-abr. 2000.

GNOLA, B et al. Evidence that a Leaf-Disk Test Allows Assessment of Isolate-Specific Resistance in Brassica oleracea Crops Against Downy Mildew (*Peronospora parasitica*). **European Journal of Plant Pathology**, [s.l.], v. 109, n. 5, p.471-478, 2003.

GOMES, B. G. **Efetivação de bioensaio para avaliação da resistência á Ferrugem da Videira**. p.42. TCC (Graduação) – Curso de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina- Campus Curitibanos, 2016.

GOMES, E. C de et al. Métodos de inoculação de *Phakopsora euvtis* Ono em *Vitis labrusca* L. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 4, p.983-985, abr. 2010.

GOMES, I.S et al. Ocorrência de *Phakopsora euvtis* Ono em Videira cv. Isabel em Ipameri, Goiás. **Revista Agrotecnologia - Agrotec**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.8-12, 30 dez. 2016.

GOMEZ-LOPEZ, A. et al. Analysis of the Influence of Tween Concentration, Inoculum Size, Assay Medium, and Reading Time on Susceptibility Testing of *Aspergillus* spp. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 43, n. 3, p.1251-1255, 1 mar. 2005.

- GÓMEZ-ZELEDÓN, J.; KAISER, M. An Extended Leaf Disc Test for Virulence Assessment in *Plasmopara Viticola* and Detection of Downy Mildew Resistance in *Vitis*. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, [s.l.], v. 07, n. 05, p.1-6, 2016.
- GÓMEZ-ZELEDÓN, JZIPPER, R.; SPRING, O. Assessment of phenotypic diversity of *Plasmopara viticola* on *Vitis* genotypes with different resistance. **Crop Protection**, [s.l.], v. 54, p.221-228, dez. 2013.
- GOVRIN, E. M.; LEVINE, A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. **Current Biology**, [s.l.], v. 10, n. 13, p.751-757, jun. 2000.
- GUEDE, A. C.; GOEDERT, C. O.; BUSTAMANTE, P. G. **Artigo “9” da convenção sobre diversidade biológica: Conservação Ex Situ**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 1998. 37 p.
- GUYER, A et al. The Anti-Phytophthora Effect of Selected Potato-Associated Pseudomonas Strains: From the Laboratory to the Field. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 6, p.1-13, 27 nov. 2015.
- HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L.; BARBOSA, R. N. T. Ocorrência da ferrugem da videira em Roraima. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 4, p. 332, 2009.
- HAMMAMI, I et al. *Ruta montana* L. leaf essential oil and extracts: characterization of bioactive compounds and suppression of crown gall disease. **Excli Journal**, [s.l.], v. 14, p.83-94, jan. 2015.
- HELFER, S. Rust fungi and global change. **New Phytologist**, [s.l.], v. 201, n. 3, p.770-780, 30 out. 2013.
- HENNESSY, C. R.; DALY, A. M.; HEARNDEN, M. N. Assessment of grapevine cultivars for resistance to *Phakopsora euvitis*. **Australasian Plant Pathology**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.313-317, 2007.
- HIRATDUKA N. Notes on some Melampsorar of Japan. III. Japanese species of Phacopsora. **Botanical Magazine**. Tokyo, v. 14, p. 87-93, 1900.
- HIRATDUKA N. Phakopsora of Japan II. **Botanical Magazine**. Tokyo, v. 49, p. 853-860, 1935.
- HODSON, D. P. Shifting boundaries: challenges for rust monitoring. **Euphytica**, [s.l.], v. 179, n. 1, p.93-104, 8 jan. 2011.
- HOFFMANN, A. Apresentação. In: MENEGUZZO, J; RIZZON, L. A. **Sistema de Produção de Destilado de Vinho**. 2. ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008.
- HUNZICKER, G. M. A novel regulatory system in plants involving medium-chain fatty acids. **Planta**, [s.l.], v. 231, n. 1, p.143-153, 30 out. 2009.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo Agropecuário, 2017. Disponível em: https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=0&tema=76402. Acesso em: 28 set. 2018

INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO (IBRAVIN). Panorama Geral. Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/Panorama-Geral>. Acesso em 28 set. 2018

JACKSON, H. S. The rusts of South America based on the Holway Collections III. **Mycologia**, v. 23, p.96-116, 1931.

JANSEN, M et al. Image processing for bioassays. **Bioassays**, [s.l.], p.263-287, 2018.

JEUN, Y-C; LEE, K-H. Observations of Infection Structures after Inoculation with *Colletotrichum orbiculare* on the Leaves of Cucumber Plants Pre-inoculated with Two Bacterial Strains *Pseudomonas putida* or *Micrococcus luteus*. **Mycobiology**, [s.l.], v. 33, n. 3, p.131-136, 2005.

JIA, Y.; VALENT, B.; LEE, F. N. Determination of Host Responses to *Magnaporthe grisea* on Detached Rice Leaves Using a Spot Inoculation Method. **Plant Disease**, [s.l.], v. 87, n. 2, p.129-133, fev. 2003.

JOHNSON, M. Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. **Materials and Methods**, [s.l.], v. 3, p.1-18, 18 jan. 2013.

JULIATTI, F. C.; FIGUEIRÓ, A. A.; ALVES, É. O. Severity evaluation methods for southern polysora corn rust. **Bioscience Journal**, [s.l.], p.969-977, 2016.

JÜRGES, G. et al. The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. **Plant Biology**, [s.l.], v. 11, n. 6, p.886-898, nov. 2009.

KARDIN, M. K. Density-Dependent Fitness Interactions in the Bean Rust Fungus. **Phytopathology**, [s.l.], v. 79, n. 4, p.409-412, 1989.

KELLER, B.; FEUILLET, C.; MESSMER, M. Genetics of disease resistance. In: SLUSARENKO, A.J.; FRASER, R.S.S.; VAN LOON, L.C. (Ed.). **Mechanisms of Resistance to Plant Diseases**. 8. ed. Dordrecht: Springer, 2000. Cap. 2. p. 101-160.

KELLER, H. Pathogen-Induced Elicitin Production in Transgenic Tobacco Generates a Hypersensitive Response and Nonspecific Disease Resistance. **The Plant Cell Online**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.223-236, 1 fev. 1999.

KHIOOK, I. L. K et al. Image analysis methods for assessment of H₂O₂ production and *Plasmopara viticola* development in grapevine leaves: Application to the evaluation of resistance to downy mildew. **Journal Of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 95, n. 2, p.235-244, nov. 2013.

- KIMATI, H. Controle químico. In: AMORIM, L; REZENDE, J. A. M; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo -SP: Agronômica Ceres Ltda, 2011. Cap. 4. p. 343-365.
- KONO, A et al. Effect of Detergent on the Quantification of Grapevine Downy Mildew Sporangia from Leaf Discs. **Hort Science**, [s.i.], v. 6, n. 50, p.656-660, maio 2015.
- KORTEKAMP, A.; ZYPRIAN, E. Leaf Hairs as a Basic Protective Barrier against Downy Mildew of Grape. **Journal of Phytopathology**, [s.l.], v. 147, n. 7-8, p.453-459, jul. 1999.
- KORTEKAMP, A; ZYPRIAN, E.V.A. Characterization of *Plasmopara*-Resistance in grapevine using in vitro plants. **Journal of Plant Physiology**, [s.l.], v. 160, n. 11, p.1393-1400, jan. 2003.
- KUSHALAPPA, A. C.; YOGENDRA, K. N.; KARRE, S. Plant Innate Immune Response: Qualitative and Quantitative Resistance. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.38-55, 2 jan. 2016.
- LAGERHEIM N. G. Sur un nouveau parasite dangereux de la Vigne. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'académie des sciences, Paris, v. 110, p. 728-729, 1890.
- LEÃO, P. C. S.; BORGES, R. M. E. **Melhoramento Genético de Videira**. Petrolina: Embrapa semiárido, 2009. Série Documentos, 224.
- LEPPIK, E E. Gene Centers of Plants as Sources of Disease Resistance. **Annual Review Of Phytopathology**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.323-344, set. 1970.
- LEPPIK, E. E. Gene Centers of Plants as Sources of Disease Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.323-344, set. 1970.
- LEU, L.S. Rust. In: PEARSON, R.C.; GOHEEN, A.C. (Ed.). **Compendium of grape diseases**. Minnesota: APS, 1988. p.28-30.
- LEU, L.S.; WU, H.G. Uredospore germination, infection and colonization of grape rust fungus, *Phakopsora ampelopsidis*. **Plant Protection Bulletin**, Taiwan, v. 25, p. 167-175, 1983.
- LI, L; ZHANG, Q.; HUANG, D. A Review of Imaging Techniques for Plant Phenotyping. **Sensors**, [s.l.], v. 14, n. 11, p.20078-20111, 24 out. 2014.
- LI, X et al. Comparative transcriptome analysis reveals defense-related genes and pathways against downy mildew in *Vitis amurensis* grapevine. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s.l.], v. 95, p.1-14, out. 2015.
- LOPES, K. B de A et al. Screening of bacterial endophytes as potential biocontrol agents against soybean diseases. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 125, n. 5, p.1466-1481, 19 set. 2018.

MALINOVSKI, L.I et al. Highlands of Santa Catarina/Brazil: A region with high potential for wine production. **Acta Horticulturae**, [s.l.], n. 931, p.433-439, mar. 2012.

MANDELI, F. **Comportamento meteorológico e sua influência na Vidma de 2002 na serra gaúcha**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2002.

MARGUERIT, E et al. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. **Theoretical and Applied Genetics**, v.118, p.1261- 1278, 2009.

MATSUNAGA, T. M. et al. Direct quantitative evaluation of disease symptoms on living plant leaves growing under natural light. **Breeding Science**, [s.l.], v. 67, n. 3, p.316-319, 2017.

MCGOVERN, P.E. Ancient wine: the search for the origin of viniculture. Princeton. Princeton University Press. 2003.

MELLO, L. M. R; PROTAS, J. F. S. Produção e Mercado de Uvas Viníferas. In:

PROTAS, J. F S. **Uvas Viníferas para Processamento em Regiões de Clima Temperado**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003.

MENDES, M. A. S.; FREITAS, V. M de. **Espécies invasoras potenciais e atuais para a videira**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 8 p. Comunicado Técnico 129

MENDGEN, K.; HAHN, M. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends in Plant Science**, [s.l.], v. 7, n. 8, p.352-356, ago. 2002.

MERDINOGLU, D et al. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. **Acta Horticulturae**, [s.l.], n. 603, p.451-456, abr. 2003.

MIELE, A.; MIOLO, A. **O Sabor do Vinho**. Bento Gonçalves: Miolo: Embrapa Uva e Vinho, 2003. 133 p.

MINISTERIO DA AGRICULTURA PECUARIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Agrofit: Sistema de agrotóxicos fitossanitário. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 04 out. 2018.

MITTENDORF, V et al. Polyhydroxyalkanoate synthesis in transgenic plants as a new tool to study carbon flow through beta-oxidation. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.45-55, out. 1999.

MONTAIGNE, E.; COELHO, A.; KHEFIFI, L. Economic issues and perspectives on innovation in new resistant grapevine varieties in France. **Wine Economics and Policy**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.73-77, dez. 2016.

- MOREIRA, F. M. et al. Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (*Vitis* spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. **Tree Genetics & Genomes**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.153-167, 17 ago. 2010.
- MUTKA, A. M.; BART, REBECCA S. Image-based phenotyping of plant disease symptoms. **Frontiers In Plant Science**, [s.l.], v. 5, p.479-482, 5 jan. 2015.
- MYLES, S et al. Genetic structure and domestication history of the grape. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 108, n. 9, p.3530-3535, 18 jan. 2011.
- MWAMBURI, Lizzy A.; LAING, Mark D.; MILLER, Ray M.. Effect of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of *Beauveria bassiana*. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 46, n. 1, p.67-74, maio 2015.
- NARUZAWA, E. S. et al. Estudos epidemiológicos e controle químico de *Phakopsora euvitis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p.41-45, 2006. Mensal.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE – NAS. **Insect Pest Management and Control**. Publ. 1965. Washington, National Academy of Science, 1969.
- NAVARRO, B. L. **A ferrugem da videira em *V. vinifera* e *V. labrusca***: componentes epidemiológicos e resposta dos hospedeiros. 2017. 93 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Fitopatologia, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2017
- NAVES, R.L.; GARRIDO, L.R.; SÔNEGO, O.R. Controle de doenças fúngicas em uvas de mesa na região noroeste do Estado de São Paulo. In: Circular Técnica 68. Embrapa, Bento Gonçalves, 2006.
- NOGUEIRA JÚNIOR, A. F et al. *Phakopsora euvitis* Causes Unusual Damage to Leaves and Modifies Carbohydrate Metabolism in Grapevine. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 8, p.1-12, 26 set. 2017.
- NOPSA, J.F. H.; THOMAS-SHARMA, S.; GARRETT, K.A. Climate Change and Plant Disease. **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**, [s.l.], p.232-243, 2014.
- NYASSÉ, S. et al. Leaf inoculation as an early screening test for cocoa (*Theobroma cacao* L.) resistance to *Phytophthora* black pod disease. **Crop Protection**, [s.l.], v. 14, n. 8, p.657-663, dez. 1995.
- NYASSÉ, S.; DESPRÉAUX, D.; CILAS, C. Validity of a leaf inoculation test to assess the resistance to *Phytophthora megakarya* in a cocoa (*Theobroma cacao* L.) diallel mating design. **Euphytica**, [s.l.], v. 123, n. 3, p.395-399, 2002.
- OERKE, E. C. Crop losses to pests. **The Journal of Agricultural Science**, [s.l.], v. 144, n. 01, p.31-43, 9 dez. 2005.

OKANE, I; ONO, Y. Phylogenetic study of indigenous grapevine leaf rust fungi in North America and biological identity of an invasive grapevine leaf rust fungus in Brazil. **Mycoscience**, [s.l.], v. 59, n. 2, p.99-104, mar. 2018.

OLIVEIRA, P. R. D et al. Análise da diversidade genética por AFLP e identificação de marcadores associados à resistência a doenças em videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p.454-457, dez. 2005

OLIVEIRA, R. Melhoramento de Plantas. Disponível em www.bespa.agrarias.ufpr.br, p.1-9.

OLIVEIRA, T. B et al. Cúmulo de compostos fenólicos na indução de resistência a *Phakopsora pachyrhizi*. In: Encontro brasileiro de ecologia química, 8., 2013, Natal. **Anais...** Natal: Embrapa Tabuleiros Costeiros: Emparn, 2013. p. 4 - 4.

OLIVEIRA, T. B. **Influência do jasmonato de metila e do tween 20 na fisiologia e na severidade da ferrugem asiática na soja**. 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Agronomia, Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

OLMO, H. P. Grapes. In: SMARTT, J.; SIMMONDS, N. W. (Ed.) **Evolution of crop plants**. 2. ed. Essex: Longman, 1995. p. 485-490.

OLMO, H. P. The potential role of (*vinifera x rotundifolia*) hybrids in grape variety improvement. **Experientia**, [s.l.], v. 42, n. 8, p.921-926, ago. 1986.

ONO, Y. Taxonomy of the *Phakopsora ampelopsidis* Species Complex on Vitaceous Hosts in Asia Including a New Species, *P. euvitis*. **Mycologia**, [s.l.], v. 92, n. 1, p.154-173, jan. 2000.

ORGANISATION OF VINE AND WINE (OIV). A história do vinho no Brasil, 2018. Disponível em: <<http://www.ibravim.org.br/Historia-do-Vinho-no-Brasil>>. Acesso em 27 set. 2018.

ORGANISATION OF VINE AND WINE (OIV). International Variety Catalogue (IVC), 2018. Disponível em: <<http://www.vivc.de/index.php?r=passport%2Findex>>. Acesso em 18 dez. 2018.

ORGANISATION OF VINE AND WINE (OIV). World Vitiviculture Situation: OIV Statistical Report on World Vitiviculture, 2016. Disponível em: <<http://www.oiv.int/public/medias/5029/world-vitiviculture-situation-2016.pdf>>. Acesso em 27 set. 2018.

PANUGANTI, S. J. Principles Involved in Bioassay by different Met HODSON: A Mini-Review. **Research Journal of Biology**, Warangal, v. 3, n. 2, p.1-18, abr-jun. 2015.

PARIAUD, B. et al. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. **Plant Pathology**, [s.l.], v. 58, n. 3, p.409-424, jun. 2009.

PARIS, A. **Arquivo Histórico Municipal: Breve história da uva e do vinho no Rio Grande do Sul**. Bento Gonçalves, 2015. Disponível em: <<http://www.bentogoncalves.rs.gov.br/a-cidade/historia-da-uva-e-do-vinho>>. Acesso em: 22 set. 2018.

PARLEVLIE, J. E. Resistance of the nonrace-specific type. In: BUSHNELL, W.R.; ROELFS, A.P. (Ed.). *The cereal rusts: diseases, distribution, epidemiology and control*. New York: Academic Press, p.501-525, 1985.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como os patógenos atacam as plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e controle**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 4. Ed. v.2, cap. 34, p. 543-591, 2011a.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e controle**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 4. Ed. v.2, cap. 34, p. 543-591, 2011b.

PATIL, S. G.; HONRAO, B. K.; KARKAMKAR, S. P. Reaction of some grape germplasm against the rust disease. **Journal of Maharashtra Agriculture University**, v. 23, p.138-140, 1998.

PÉROS J. P., NGUYEN T. H., TROULET C., MICHEL-ROMITI C., NOTTEGHEM J. L. **Assessment of powdery mildew resistance of grape and *Erysiphe necator* pathogenicity using a laboratory assay**, 2006.

PIFFANELLI, P et al. A barley cultivation-associated polymorphism conveys resistance to powdery mildew. **Nature**, [s.l.], v. 430, n. 7002, p.887-891, 19 ago. 2004.

PONTI, L et al. Analysis of Grape Production in the Face of Climate Change. **Climate**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.1-6, 21 mar. 2018.

POZO, O. del.; PEDLEY, K. F.; MARTIN, G. B. MAPKKK α is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease. **Embo J**, [s.l.], v. 23, n. 15, p.3072-3082, ago. 2004.

PRIMIANO, I. V. et al. Asian grapevine leaf rust caused by *Phakopsora euvitidis*: an important disease in Brazil. **Plant Pathology**, [s.l.], v. 66, n. 5, p.691-701, 31 jan. 2017.

R Development Core Team. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2008.

RADMANN, E.B.; BIANCHI, V. J. **Uva**. In: BARBIERI, R.L.; STEEMPT, E.R.T. *Origem e evolução de plantas cultivadas*. Brasília, DF: Embrapa. 2008. 909 p

RAWAT N. Approaches for Disease Resistant Candidate Genes Identification in

Plants: Recent Techniques and Trends. **Austin Food Sci.** [s.l.], v. 2, n.1, p.1-3, 2016.

REIS, E. M; ZANATTA, T; DANELLI, A L. Effect of the concentration of inoculum and tensoactive on the efficiency of *Bipolaris sorokiniana* infection in wheat leaves. **Summa Phytopathologica**, [s.l.], v. 40, n. 2, p.178-181, jun. 2014.

REISCH, B.I; PRATT, C. Grapes. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Fruit breeding: vine and small fruits**. New York. John Wiley. 1996. v.2. p.297–370.

ROSIER, J. P.; BRIGUENTI, E.; SCHUCK, E.; BONIN V. Comportamento da variedade cabernet sauvignon cultivada em vinhedos de altitude em São Joaquim – SC. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 8, 2004, Florianópolis. Anais eletrônicos....Florianópolis.

SAIFERT, L et al. Marker-assisted pyramiding of resistance loci to grape downy mildew. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 53, n. 5, p.602-610, maio 2018.

SALOMON, D.; SESSA, G. Biotechnological strategies for engineering plants with durable resistance to fungal and bacterial pathogens. **Plant Biotechnology and Agriculture**, [s.l.], p.329-342, 2012.

SÁNCHEZ-MORA, F. D et al. Behavior of grape breeding lines with distinct resistance alleles to downy mildew (*Plasmopara viticola*). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.141-149, jun. 2017.

SANTOS, R. C.; OLIVEIRA, G. B. de. Estudo sobre o cultivo de frutas como alternativa de desenvolvimento do sub-médio São Francisco. **Revista das Faculdades Santa Cruz**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.32-47, dez. 2009.

SCAPIN-BUFFARA, C. R. et al. Seasonal progression of leaf rust in 'Niagara Rosada' grapevine in a biannual crop system in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, [s.l.], v. 152, n. 3, p.589-597, maio 2018.

SCHOLES, J.; ROLFE, S. Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. **Planta**, [s.l.], v. 199, n. 4, p.573-582, ago. 1996.

SCHWANDER, F et al. *Rpv10*: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. **Theoretical And Applied Genetics**, [S.l.], v. 124, n. 1, p.163-176, set. 2012.

SEKHWAL, M. K et al. Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants. **Int J Mol Sci.** [s.l.], v. 16, n. 8, p. 19248–19290, ago. 2015.

SERENO, M. J. C. M.; WIETHÖLTER, P.; TERRA T. F. Domesticação das plantas. In: BARBIERI, R.L.; STEEMPT, E.R.T. Origem e evolução de plantas cultivadas. Brasília, DF: Embrapa. 2008. 909 p.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. **The effects of nitrogen fertilization on the expression of slowmildwing in knox wheat.** *Phytopathology*, v.67, p.1051-1055, 1977.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B.; CHEN, H. J. A Comparative Study of Various Tests for Normality. **Journal of the American Statistical Association**, [s.l.], v. 63, n. 324, p.1343-1372, dez. 1968.

SHIOMI, H. F.; MELO, I. S. de; MINHONI, M. T. de A. Avaliação de bactérias endofíticas para o controle biológico da mancha foliar de *Exserohilum turcicum* em milho. **Arquivos do Instituto Biológico**, [s.l.], v. 82, p.1-4, 3 nov. 2015.

SILVA, T. P da et al. Nota - Avaliação de porta-enxertos de videira em condições subtropicais. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 1, p.93-97, 2010.

SIVCEV, B.; SIVCEV, I.; RANKOVIC-VASIC, Z. Natural process and use of natural matters in organic viticulture. **Journal of Agricultural Sciences, Belgrade**, [s.l.], v. 55, n. 2, p.195-215, 2010.

SIVIERO, A et al. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em plântulas e plantas jovens de citros. **Fitopatologia Brasileira**, [s.l.], v. 27, n. 6, p.574-580, nov. 2002.

STAUDT, G.; KASSEMAYER, H. Evaluation of downy mildew resistance in various accessions of wild *Vitis* species. **Vitis – J Grapevine**. v.34, p.225-228, 1995.

SOBRINHO, C.A et al. Indutores abióticos. In: CAVALCANTO, L.S et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.51-80.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. da R.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa, 2005. Circular Técnica 56.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. da R. Doenças fúngicas e medidas de controle. In: KUHN, Gilmar Barcelos (Ed.). **Uvas Americanas e Híbridas para Processamento em Clima Temperado**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, jan 2003.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. da R.; GAVA, R. **Ferrugem da videira no Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p. 4, 2005. (Embrapa Uva e Vinho Comunicado Técnico, 62).

SONG, J et al. Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 100, n. 16, p.9128-9133, 18 jul. 2003

SOUSA, J. S. I. de. (Coord.) **Uvas para o Brasil**. Piracicaba: FEALQ, 1996. 791p.

SOUZA, N. S. de. Ocorrência de ferrugem em videira em Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.226-226, abr. 2004.

SPHD. National diagnostic protocol for *Phakopsora euvtis*, the cause of grapevine leaf rust. Australia: Subcommittee on Plant Health Diagnostics, 2015. Disponível em: <<http://plantbiosecuritydiagnostics.net.au/wordpress/wp-content/uploads/2015/03/NDP-29-Grapevine-Leaf-Rust-V1.1.pdf>>. Acesso em 16 out 2018.

SPRING, O.; ROZYNEK, B.; ZIPPER, R. Leaf Disk Inoculation — a Useful Tool for Selecting Infections of Sunflower Downy Mildew at Low Inoculum Concentration, but Inappropriate to Pathotype Characterization. **Journal of Phytopathology**, [s.l.], v. 145, n. 4, p.189-191, maio 1997.

SREDOJEVIĆ, Z., SVIRČEV, B., PECO, E. Rentabilnost ulaganja u podizanje i eksploataciju zasada vinograda kao izazov za investitore, **Agroekonomika**, Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, v.44, n.68, p. 89-102, 2015.

STAPLES, R. C. Research on the Rust Fungi During the Twentieth Century. **Annual Review of Phytopathology**, [s.l.], v. 38, n. 1, p.49-69, set. 2000.

STASKAWICZ, B. et al. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, [s.l.], v. 268, n. 5211, p.661-667, 5 maio 1995.

STASKAWICZ, B. J. Genetics of Plant-Pathogen Interactions Specifying Plant Disease Resistance. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 125, n. 1, p.73-76, 1 jan. 2001.

SYDOW, P. Diagnosen neuer, aus verschiedenen Gegenden stammender Pilze. **Hedwigia Beiblatt**, v. 38, p. 140-144, 1899.

TENG, P. S.; CLOSE, R. C. Effect of temperature and uredinium density on urediniospore production, latent period, and infectious period of *Puccinia hordei* Otth. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, [s.l.], v. 21, n. 2, p.287-296, maio 1978.

TANKSLEY, S. D. Mapping pol ygenes. **Annual Reviews Inc. All Rights Reserved**, Ithaca, n. 27, p.205-233, 1993.

TER BRAAK, C. J. F.; SMILAUER P. **Manual de Referência CANOCO e Manual do Usuário CanoDraw para Windows: Software para Ordenação Comunitária Canônica (versão 4.5)**. Ithaca, Microcomputer Power, 2002, 500p.

TERRAL, J et al. Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: New morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. **Annals of Botany**, [s.l.], v. 105, n. 3, p.443-455, 23 dez. 2009.

TESSMANN, D. J et al. Grape Rust caused by *Phakopsora euvtis*, a New Disease for Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Curitiba - PR, v. 29, n. 3, p.338-338, maio – jun 2004.

TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B.; LOPES, D. B. Uva: Novo Problema. **Cultivar HF**, v. 4, n. 22, p.22-25, 2003.

TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B. A ferrugem da videira no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38, 2005, Brasília. **Anais**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, p.220-222, 2005.

THALER, J. S. The Role of the Jasmonate Response in Plant Susceptibility to Diverse Pathogens with a Range of Lifestyles. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 135, n. 1, p.530-538, 1 maio 2004.

THIS, P.; LACOMBE, T.; THOMAS, M. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. **Trends in Genetics**, [s.l.], v. 22, n. 9, p.511-519, set. 2006.

THUEMEN, F. de. New Species of North American Uredinei. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, [s.l.], v. 6, n. 39, p.215-216, mar. 1878.

TOFFOLATTI, S et al. Phenotypic and histochemical traits of the interaction between *Plasmopara viticola* and resistant or susceptible grapevine varieties. **Bmc Plant Biology**, [s.l.], v. 12, n.1, p.124-139, 2012.

TÖPFER R et al. New Horizons for Grapevine Breeding. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, v.5, p. 79-100. 2011.

TYSON, J. L; AFULLERTON, R. A leaf disc assay for determining resistance of taro to *Phytophthora colocasiae*. **New Zealand Plant Protection**, [s.i.], v. 68, n. 0, p.415-419, 2015.

VALE, F. X. R.; PARLEVLIET, J. E.; ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, [S.I.], v. 26, n. 3, p.577-589, set. 2001

VALOIS, A.C.C.; SALOMÃO, A.N.; ALLEM, A.C. **Glossário de recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa-SPI, 1996. 62 p

VENUTI, S et al. Historical Introgression of the Downy Mildew Resistance Gene *Rpv12* from the Asian Species *Vitis amurensis* into Grapevine Varieties. **Plos One**, [S.I.], v. 8, n. 4, abr. 2013.

VERDI, A. R et al. Arranjo Produtivo Local: identificação das possibilidades da viticultura na Região de Campinas. **Agricultura em São Paulo**, São Paulo, v. 52, n. 2, p.73-86, jul - dez 2005.

VINARDELI M.; INFANTE M. The relationship between the chain length of non-ionic surfactants and their hemolytic action on human erythrocytes. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol**. P. 124-117, 1999.

VLAHOVIĆ, B., POTREBIĆ, V., JELOČNIK, M. Preferences of wine consumers on Serbian market. **Economics of Agriculture**, v. 59, n. 1, p. 37-49, 2012.

WEINERT, M. P et al. First record of grapevine leaf rust in the Northern Territory, Australia. **Australasian Plant Pathology**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.117-118, 2003.

WELTER, L J et al. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). **Molecular Breeding**, [s.l.], v. 20, n. 4, p.359-374, 5 maio 2007.

WIEDEMANN-MERDINOGLU, S et al. Genetic analysis of resistance to downy mildew from *Muscadinia rotundifolia*. In: International conference on grape genetics and breeding, 9., 2006, Udine. **Programme and Abstracts**. Udine: ISHS, 2006

WINKLER, A. J. **Vitivinicultura**. Continental S.A. 1ed espanhol, 1980. 792 p.

WONG, F. P.; WILCOX, W. F. Distribution of Baseline Sensitivities to Azoxystrobin Among Isolates of *Plasmopara viticola*. **Plant Disease**, [s.l.], v. 84, n. 3, p.275-281, mar. 2000.

WURZ, D. A et al. New wine-growing regions of Brazil and their importance in the evolution of Brazilian wine. **Bio Web of Conferences**, [s.l.], v. 9, p.1-4, 2017.

XAVIER, A. A et al. Ocorrência da ferrugem da videira em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.317-319, mar. 2012.

YANG, W et al. Rutin-Mediated Priming of Plant Resistance to Three Bacterial Pathogens Initiating the Early SA Signal Pathway. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.1-2, 11 jan. 2016.

ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G.M. Efeito de baixas temperaturas e do binômio temperatura-umidade relativa sobre a viabilidade dos uredósporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. e *Uromyces phaseolityca* Arth. **Experientiae**, v.17, p.151-184, 1974.

ZELEDÓN, J. J. G. **Plasmopara viticola, the downy mildew of grapevine: phenotypic and molecular characterization of single sporangium strains infecting hosts with different resistance levels**. 2015. 123 f. Tese (Doutorado) - Curso de Postgraduate Courses In Natural Sciences, University Of Hohenheim, Institute Of Botany, San José, Costa Rica, 2015.

ZENG, J et al. Variation for Resistance to White Rust (*Puccinia horiana*) among *Ajania* and *Chrysanthemum* Species. **Hortscience**, [s.i.], v. 10, n. 48, p.1231-1234, jan. 2013.

GLOSSÁRIO

Para melhorar e facilitar o entendimento sobre assunto referente a dissertação, o conhecimento sobre a definição dos termos usados na fitopatologia, bem como no melhoramento genético vegetal são de fundamentais importância. Deste modo, o texto a seguir, corrobora com as terminologias utilizadas.

Acesso: indivíduo de uma coleção de germoplasma (BÓREM; MIRANDA, 2009).

Ambiente: Soma total de todas as condições externas que afetam o crescimento e desenvolvimento de um indivíduo (BÓREM; MIRANDA, 2009).

Cultivar: Variedade cultivada, grupo de indivíduos da mesma espécie que se relacionam por ascendência e se apresenta uniforme quanto às características fenotípicas (BÓREM; MIRANDA, 2009).

Endemia: A doença está presente em uma determinada área geográfica e caracteriza-se por não estar em expansão (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2011).

Epidemia: refere-se ao aumento da doença em uma população de plantas (incidência e severidade) em intensidade e/ou extensão geográfica (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2011).

Estabelecimento: Reação parasita entre patógeno e hospedeiro (AMORIM; PASCHOLATI, 2011a).

Fenótipo: Aparência de um indivíduo sem referência à sua composição genética ou genótipo (BÓREM; MIRANDA, 2009).

Genótipo: Constituição genética total de um organismo, neste trabalho, referindo-se as diferentes espécies pertencentes ao gênero *Vitis* spp (BÓREM; MIRANDA, 2009).

Infecção: Processo que tem início na pré-penetração e termina com o estabelecimento de relações parasitárias entre patógeno e hospedeiro. A infecção representa o início

da patogênese. É na infecção o patógeno ataca e o hospedeiro utiliza seus mecanismos de defesa (AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

Pré-penetração: movimento direcionado do patógeno em reação ao hospedeiro, crescimento do patógeno na superfície do hospedeiro, em alguns casos a produção de estruturas especializadas como apreensório em patógenos de parte aérea (AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

Sinal: Estrutura reprodutivas do patógeno, quando exteriorizada no tecido doente. (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2011).

Sintomas: Qualquer manifestação das reações da planta a um agente nocivo (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2011).

Variedade: Subdivisão de uma espécie, ou grupo de indivíduos dentro de uma espécie, que se distingue de outra por sua forma ou função (BÓREM; MIRANDA, 2009).

Indutor: composto ou fator capaz de ativar o mecanismo de defesa das plantas (PASCHOLATI, 2011b).

Eliciator: molécula presente em um indutor responsável direto pela ativação dos mecanismos de defesa das plantas (PASCHOLATI, 2011b).