

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS CURITIBANOS  
BEATRIZ RIBEIRO GOMES

**EFETIVAÇÃO DE BIOENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA  
AFERRUGEM DA VIDEIRA**

Curitibanos  
2015

**BEATRIZ RIBEIRO GOMES**

**EFETIVAÇÃO DE BIOENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A  
FERRUGEM DA VIDEIRA**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Curso de Agronomia, do Campus Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Leocir José Welter  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup>Msc. Cláudia Aparecida  
Guginski Piva

Curitibanos  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gomes, Beatriz Ribeiro

Efetivação de bioensaio para avaliação da resistência a  
ferrugem da videira / Beatriz Ribeiro Gomes ; orientador,  
Leocir José Welter ; coorientadora, Claudia Aparecida  
Guginski Piva . - Curitiba, SC, 2015.

42 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus  
Curitiba. Graduação em Agronomia.

Inclui referências

1. Agronomia. 2. Phakopsora euvtis. 3. Resistência  
genética. 4. Viticultura. 5. Discos foliares. I. Welter,  
Leocir José . II. Piva , Claudia Aparecida Guginski . III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em  
Agronomia. IV. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia

Rodovia Ulysses Gaboardi km3

CP: 101 CEP: 89520-000 - Curitibanos - SC

TELEFONE (048) 3721-2178 E-mail: agronomia.cbs@contato.ufsc.br.

BEATRIZ RIBEIRO GOMES

**EFETIVAÇÃO DE BIOENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A  
FERRUGEM DA VIDEIRA**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Colegiado do Curso de Agronomia, do Campus Curitibanos, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

**Orientador(a): Leocir José Welter**

Data da defesa: 03/12/2015

**MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:**

**Presidente e Orientador:** Leocir José Welter

**Titulação:** Doutor

**Área de concentração em** Genética e Melhoramento de Plantas

**Universidade Federal de Santa Catarina**

**Membro Titular:** Patrícia M. O. Pierre Castro

**Titulação:** Doutora

**Área de concentração em** Genética e Melhoramento de Plantas

**Instituição:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Membro Titular:** Claudia Aparecida Guginski Piva

**Titulação:** Mestre

**Área de concentração em** Fitopatologia

**Instituição:** Universidade do Estado de Santa Catarina

**Local:** Universidade Federal de Santa Catarina

## RESUMO

Causada pelo fungo fitopatogênico *Phakopsora euvitis* Ono, a ferrugem da videira é uma doença recente no Brasil. A expansão das regiões produtoras e as mudanças climáticas são fatores que podem torná-la uma doença de importância econômica. O melhoramento genético visando resistência a doenças representa uma importante estratégia para evitar prejuízos e reduzir o uso de produtos químicos. Uma das etapas dos programas de melhoramento genético consiste na seleção de indivíduos resistentes. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar uma metodologia de avaliação (bioensaio) da interação entre ferrugem e videira, que seja consistente, reproduzível e viável, buscando diminuir o tempo e aumentar a precisão na identificação de fontes de resistência utilizando discos foliares. A multiplicação dos urediniósporos foi realizada em folhas das cultivares Niágara Rosada, Bordô e Cabernet Franc. Realizou-se a desinfestação com hipoclorito de sódio, seguida da tríplex lavagem das folhas com água destilada e autoclavada, que foram acondicionadas em placas de Petri contendo em seu interior ágar-água. Com uma agulha, os urediniósporos foram depositados sobre a face abaxial e com um pincel foram espalhados sobre a folha. As placas foram armazenadas em câmara BOD com fotoperíodo de 16 h, ficando as primeiras 24 h na ausência de luz e temperatura de 25°C. Isolou-se apenas uma pústula da primeira multiplicação. Para a determinação da forma de inoculação, foram utilizados os cultivares Bordô e Niágara Rosada. Discos foliares com 12 mm de diâmetro foram recortados e acondicionados em placas de Petri e mantidos em BOD. O experimento consistiu em bifatorial (2x5) com cinco repetições, sendo folhas com e sem pilosidade (removida com fita crepe) x formas de inoculação da doença. As formas de inoculação foram: T1 borrifado água autoclavada e pincelado dos urediniósporos, T2 disco mergulhado na suspensão de esporos, T3 aspersão com um borrifador, T4 deposição de uma gota de 30 µl, removida após 24 horas e T5 testemunha. A concentração da suspensão foi de 10<sup>5</sup> esporos/mL. Para determinar a melhor concentração de esporos a ser depositada sobre as folhas, foram cortados discos de 14 mm do cultivar Bordô. O experimento consistiu em bifatorial (2x5) com e sem adição de Tween 20 e cinco formas de inoculação, sendo estas 5x10<sup>4</sup>, 1x10<sup>5</sup>, 1,5x10<sup>5</sup>, 2x10<sup>5</sup> esporos/mL e a testemunha, com cinco repetições. Para ambos os experimentos quantificou-se o número de pústulas diariamente, no 10º dia foi avaliado número total de pústulas, diâmetro das pústulas e o número de urediniósporos. A análise estatística foi realizada no programa ASSISTAT. O método de inoculação mais eficiente foi o da deposição da gota sobre os discos, onde a remoção da pilosidade não influenciou na sua ocorrência e a concentração da suspensão de esporos foi igual 1x10<sup>5</sup>. Para a validação do bioensaio estudos mais detalhados devem ser realizados para compreender melhor sua ocorrência, a fim de torná-lo mais confiável, efetivo e reproduzível.

**Palavras chave:** *Phakopsora euvitis*. Resistência genética. Viticultura. Discos foliares. Melhoramento genético.

## ABSTRACT

Caused by the phytopathogenic fungi *Phakopsora euvittis* Ono, the grapevine rust is a recent disease in Brazil. The expansion of productive regions and weather changes are factors that can turn it as an economical important disease. Plant breeding looking for disease resistance represents one important strategy to avoid economical losses and reduce the use of chemical products. One step of plant breeding programs consists on select resistant individuals. The currently work had the objective of develop and validate on evaluation methodology (bioassay) between the interaction of rust and grapevines, that is consistent, reproducible and viable, looking to decrease the time and increase the accuracy to identify the resistance sources using foliar discs. For the uredospore multiplication process, we utilized foliar discs from Pink Niagara, Bordeaux and Cabernet Franc varieties. The triple wash of the leaves were made, those were packed in Petri dishes with agar-water medium. With the help of one needle, the urediniospores were deposited on the down face of the leaf, and with one brush, they were spread on the leaf surface. The Petri dishes were stored in BOD chamber with 16-hour photoperiod, staying the first 24 hours without light, and temperature of 25°C. After we isolated only one pustule of the first multiplication. To determine the inoculation way, we utilized the Bordeaux and Pink Niagara cultivars. Foliar discs within 14 mm diameter, cut off, packed in Petri dishes, and stored in BOD chamber. The experiment was bi-factorial (2x5) with five repetitions, leaf with hairiness and without hairiness (removed with tape) versus different ways of pathogen inoculation. The inoculation ways were: T1 sprayed autoclaved water and brushed urediniospores, T2 disc dipped in spore solution, T3 sprayed with a spray bottle, T4 deposited in one 30µl drop, removed after 24 hours and T5 witness. The spore concentration in the solution was 105 spores/mL. To determine the best spore concentration to deposit on the leaves, we used cut discs from Bordeaux cultivar. The experiment consisted in bi-factorial (2x5) with or without Tween 20, and five different spore concentration, 5x10<sup>4</sup>, 1x10<sup>5</sup>, 1,5x10<sup>5</sup>, 2x10<sup>5</sup> spores/mL and the witness, with five repetitions. For both experiments, the number of pustules were quantified daily, in the 10<sup>th</sup> day evaluated the total number of pustules, pustules diameter, and urediniospores number. To the statistical analysis, we used the program ASSISTAT. The most efficient inoculation method was the drop on the discs, where the removal of hairiness did not show any influence in the occurrence; and the best spore concentration was 1x10<sup>5</sup>. To the validation of the bioassay, studies with more details might be necessary for better occurrence comprehension, to turn it more accurate, effective, and reproducible.

**Key Words:** *Phakopsora euvittis*. Genetic resistance. Viticulture foliar discs. Breeding program.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Obtenção e multiplicação dos urediniósporos da ferrugem da videira .....	19
<b>Figura 2.</b> Metodologia utilizada para a inoculação dos discos foliares com a ferrugem da videira .....	21
<b>Figura 3.</b> Determinação do número e diâmetro de pústulas da ferrugem da videira em estereomicroscópio .....	22
<b>Figura 4.</b> Determinação da intensidade de esporulação da ferrugem da videira .....	23
<b>Figura 5.</b> Inoculação da ferrugem da videira. ....	24
<b>Figura 6.</b> Discos foliares da cultivar Bordô, submetidas a diferentes formas de inoculação.....	27
<b>Figura 7.</b> Discos foliares da cultivar Niágara Rosada, submetidas a diferentes formas de inoculação .....	28
<b>Figura 8.</b> Número de pústulas em discos foliares do cultivar Bordô em diferentes concentrações de suspensão de esporos da ferrugem da videira .....	30
<b>Figura 9.</b> Discos foliares da cultivar Bordô, submetidas a diferentes concentrações de esporos com e sem Tween 20. ....	31
<b>Figura 10.</b> Número urediniósporos em discos foliares da cultivar Bordô em diferentes concentrações de suspensão de esporos da ferrugem da videira .....	31
<b>Figura 11.</b> Diâmetro médio de pústulas ( $\mu\text{m}$ ) em discos foliares em diferentes concentrações de suspensão, com e sem a adição de Tween 20 .....	32
<b>Figura 12.</b> Período latente em dias nos discos foliares em diferentes concentrações de suspensão, com e sem a adição de Tween 20 .....	33
<b>Figura 13.</b> Coleta das pústulas em plantas com pilosidade e com ausência de pilosidade. ....	35
<b>Figura 14.</b> Discos depositados sobre Papel Filtro e Meio de cultura ágar-água.....	36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Número de pústulas, diâmetro de pústula, número de urediniósporos e período latente médio em cinco formas de inoculação, em discos foliares na cultivar Bordô.....	26
<b>Tabela 2.</b> Número médio de pústulas por disco, diâmetro de pústula, número de urediniósporos e período latente médio em cinco formas de inoculação, em discos foliares na cultivar Niágara Rosada.....	27
<b>Tabela 3.</b> Período latente médio (em dias) em discos foliares na cultivar Niágara Rosada.....	28



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
1.1 JUSTIFICATIVA .....	10
1.2 OBJETIVO.....	11
<b>1.2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2.2 Objetivo específico</b> .....	<b>11</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
2.1 A CULTURA DA VIDEIRA.....	12
2.3 PRINCIPAIS DOENÇAS E SUAS IMPLICAÇÕES.....	13
<b>2.3.1 Ferrugem da videira</b> .....	<b>13</b>
2.4 MELHORAMENTO GENÉTICO VISANDO A RESISTÊNCIA A DOENÇAS.....	16
<b>2.4.1 Resistência genética a Ferrugem da videira</b> .....	<b>16</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DO TRABALHO .....	18
3.2 OBTENÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DO PATÓGENO .....	18
3.3 EXPERIMENTO 1: DETERMINAÇÃO DA FORMA DE INOCULAÇÃO QUE MELHOR EXPRESSA A DOENÇA EM VIDEIRA .....	20
<b>3.3.1 Avaliação e análise estatística dos dados</b> .....	<b>21</b>
3.4 EXPERIMENTO 2: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS QUE MELHOR EXPRESSA A DOENÇA EM VIDEIRA.....	24
<b>3.4.1 Avaliação e análise estatística dos dados</b> .....	<b>25</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>26</b>
4.1 FORMA DE INOCULAÇÃO EM DISCOS FOLIARES .....	26
4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS.....	30
4.3 RECOMENDAÇÕES.....	35
<b>4.3.1 Coleta das pústulas</b> .....	<b>35</b>
<b>4.3.2 Ágar-água ou Papel Filtro</b> .....	<b>35</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A videira (*Vitis* spp.) é uma das culturas mais importantes economicamente em todo o mundo (PIVA, 2014). Contudo, a viticultura é uma atividade econômica recente no Brasil, quando comparada aos tradicionais países produtores da Europa (MELLO; PROTAS, 2003). Ainda assim, segundo dados da FAO de 2012 o Brasil é o 12º maior produtor mundial.

A popularidade dos produtos que utilizam a uva como matéria-prima e o elevado consumo *in natura* do fruto fazem da viticultura uma atividade de importância econômica e social para as regiões produtoras. Além de gerar renda às famílias produtoras, articula-se com outros setores da economia, integrando a produção com o processamento por meio de agroindústrias e ainda o favorecimento do turismo local (VERDI *et al.*, 2005).

Dentre os fatores que podem afetar negativamente a produção, destacam-se os ligados às doenças. Vários são os patógenos que afetam a videira no Brasil, dentre eles, o fungo *Phakopsora euvitidis* Ono, parasita obrigatório, agente causal da ferrugem da videira (ONO, 2000; GALLOTTI *et al.*, 2009). A doença é recente no Brasil, constatada pela primeira vez em 2001, no Norte do Paraná (TESSMANN *et al.*, 2004). Atualmente é considerada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) praga quarentenária A2, ou seja, está presente no país, mas restrita a algumas áreas, com potencial de causar danos econômicos (SÔNEGO; GARIDO; GAVA, 2005).

A doença ocorre geralmente em folhas maduras e os principais sintomas são o aparecimento de pústulas amareladas com urediniósporos nas superfícies abaxial das folhas e, na parte adaxial, opostas as pústulas, ocorre a necrose do tecido. Quando o ataque é muito severo favorece a desfolha precoce, que compromete o desenvolvimento dos próximos estádios fenológicos, como a maturação dos frutos, inviabilizando sua comercialização e prejudicando a sua qualidade. O acúmulo de reserva também pode ser comprometido, considerando que, a planta após a frutificação, anterior ao estágio da queda das folhas, acumula reservas, que serão utilizadas na próxima safra. A desfolha precoce interrompe esse processo e a planta perde área foliar fotossinteticamente ativa, comprometendo a safra seguinte (SÔNEGO; GARIDO; GAVA, 2005).

A melhor forma de evitar a doença e a contaminação do ambiente pela utilização de produtos químicos é o uso de variedades resistentes. Assim, em virtude do elevado apelo pela redução do uso de produtos químicos nas atividades agrícolas, os programas de melhoramento genético têm buscado explorar a variabilidade genética para desenvolver novos cultivares, que além de apresentarem qualidade, sejam produtivas e resistentes às doenças (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

São poucas as informações sobre a resistência genética à ferrugem da videira, especialmente devido ao fato dela não ocorrer nas regiões vitícolas tradicionais do mundo. Mas, com a expansão de novas regiões produtoras, a importância econômica da doença vem crescendo. Desta forma, é desejável e indispensável a identificação e caracterização de genótipos resistentes à ferrugem (ANGELOTTI *et al.*, 2008).

Para tornar possível a seleção de genótipos resistentes e utilizá-los nos programas de melhoramento, uma etapa importante é a identificação precoce do nível de resistência dos materiais vegetais. Para tanto, uma das alternativas é o desenvolvimento de metodologias de avaliação *in vitro* que permita a identificação de plantas resistentes, de forma rápida, fácil e eficiente (SIVIERO *et al.*, 2002).

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Para o desenvolvimento de um programa de melhoramento genético, alguns bioensaios são utilizados para selecionar os níveis de resistência dos indivíduos (SIVIERO *et al.*, 2002). O uso de discos foliares é uma técnica de fácil execução, de baixo custo e que possibilita a seleção de genótipos rapidamente. Por exemplo, discos foliares são utilizados rotineiramente na seleção genótipos resistentes ao míldio da videira (SCHWANDER *et al.*, 2012).

No caso da ferrugem da videira, Copatti (2011) testou o método dos discos foliares para avaliar a resistência genética. No entanto, o autor encontrou dificuldades para avaliar os níveis de resistência de genótipos que apresentam pilosidade na face abaxial das folhas. No bioensaio utilizado, plantas com pilosidade que se apresentaram suscetíveis a campo, revelaram elevado grau de resistência. Ao detalhar os estudos, observou que a pilosidade atua como uma barreira física, sendo este um fator que pode mascarar os resultados. Assim, no presente estudo foram testadas diferentes formas de inoculação e concentrações, com a finalidade de avaliar a interferência da pilosidade das folhas e sua relação com a eficácia do método em causar a doença.

## 1.2 OBJETIVO

### **1.2.1 Objetivo geral**

Desenvolver uma metodologia de avaliação (bioensaio) da interação entre ferrugem e videira, que seja consistente, reproduzível e viável, buscando diminuir o tempo e aumentar a precisão na identificação de fontes de resistência em plantas de videira, utilizando a técnica de discos foliares.

### **1.2.2 Objetivo específico**

Identificar uma metodologia que possa ser utilizada tanto para plantas com presença ou ausência de pilosidade;

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A CULTURA DA VIDEIRA

A videira pertence à classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Rhamnales, família Vitaceae e ao gênero *Vitis* (BARBIERI; STEEMPT, 2008), sendo composta por mais de 60 espécies, cuja distribuição geográfica espontânea contempla os continentes asiático, europeu e americano. As espécies *Vitis vinifera*, de origem européia, são sensíveis a uma série de doenças fúngicas e exigentes em tratos culturais e *Vitis labrusca*, americana, produtiva e mais resistente às doenças, representam as espécies de maior destaque no mundo (CAMARGO, 2012; SEBRAE, 2014).

A videira é uma planta perene, lenhosa, caducifolia e sarmentosa, provida de órgãos de sustentação denominados gavinhas. As folhas são grandes, verdes e palmadas. A planta pode atingir até sete metros de altura. Sua frutificação ocorre a partir do terceiro ano após o plantio, passando por vários estádios de desenvolvimento até chegar à produção, o estágio do início da brotação, inicia no final do inverno, início da primavera, conforme o aumento da temperatura. O estágio de floração e frutificação necessita de condições de tempo seco e ensolarado com temperatura média de 18°C, ocorre nos meses de novembro e março na região Sul e o ano todo na região Semi-árida Nordestina. O estágio de queda das folhas e repouso vegetativo é influenciado pela redução da temperatura e ocorre nos meses de inverno (MANDELI, 2002; SEBRAE, 2014).

A videira é produzida em diversas regiões do Brasil, concentrando-se nas Regiões Sul, Sudeste e Nordeste (SÔNIGO; GARRIDO; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2005). A viticultura brasileira ocupa 81 mil hectares, com vinhedos desde o extremo Sul até regiões próximas à Linha do Equador, destacando-se os Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Pernambuco e Bahia (BRASIL, 2014; SHIMANO; SENTELHAS, 2013).

Não diferente do que ocorre no mundo, a viticultura apresenta-se como uma das atividades de maior diversidade de uso. Isso porque além da comercialização *in natura* (ZANELLA, 2008; SALES; MELO, 2014), seu fruto é matéria prima para o processamento, que resulta na produção de vinhos, sucos, destilados, vinagre, geléias e uvas passas (HOFFMANN, 2008). O manejo mais racional permite além

destes, utilizar o óleo das sementes na indústria de cosméticos e a produção de adubo orgânico com os restos culturais (ZANELLA, 2008; SALES; MELO, 2014). Os produtos derivados da uva possuem valor econômico agregado, sendo uma excelente oportunidade de mercado para a geração de renda nas propriedades (HOFFMANN, 2008).

### 2.3 PRINCIPAIS DOENÇAS E SUAS IMPLICAÇÕES

As condições climáticas nas regiões brasileiras produtoras de uva favorecem o aparecimento de diversas doenças, dentre elas o míldio (*Plasmopara vitícola*), o oídio (*Erysiphe necator*), a escoriose (*Phomopsi sviticola*), a antracnose (*Elsinoe ampelina*) e a ferrugem (*Phakopsora euvitis*) (SÔNEGO; GARRIDO, 2003). O ataque destes patógenos representa um dos principais problemas para a produção de uvas no Brasil, pois o controle inadequado destas doenças compromete a qualidade e a quantidade produzida e, conseqüentemente, limita a exploração econômica da atividade e aumenta os custos de produção, que pode se elevar em até 30% com os tratamentos fitossanitários (SÔNEGO; GARRIDO; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2005).

#### 2.3.1 Ferrugem da videira

As ferrugens são fungos pertencentes ao filo Basidiomycota, classe Urediniomycetes e ordem Uredinales (PATIL; HONRAO; KARKAMKAR, 1998). A ferrugem da videira é causada pelo fungo *Phakopsora euvitis* Ono, um parasita obrigatório, isso é, coloniza apenas os tecidos vivos das plantas. Nas Américas, a espécie *Phakopsora uva* também pode ser o agente causal da ferrugem em videiras cultivadas (ONO, 2000).

A doença já foi relatada na Ásia, América Central, América do Norte (PEARSON; GOHERRN, 1988), na Austrália (WEINERT *et al.*, 2003) e no Brasil (TESSMANN; VIDA; LOPES, 2003).

O primeiro registro da doença no Brasil ocorreu em 2001, no município de Jandaína do Sul, no estado do Paraná, em parreirais comerciais da variedade Itália (TESSMANN *et al.*, 2004). Posteriormente, esta foi relatada em São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia (TESSMANN *et al.*, 2004), Rio Grande do Sul, Mato Grosso (GAVA; SÔNEGO; GARRIGO, 2005), Santa Catarina (SÔNEGO;

GARIDO; GAVA, 2005), Espírito Santo (COSTA; VENTURA, 2009) e Roraima (HALFELD-VIEIRA; NECHET; BARBOSA, 2009).

Segundo o Parecer Técnico Nº 10/DPC/COO do MAPA de maio/2012, *Phakopsora euvitis* é classificada como uma praga quarentenária A2, ou seja, já está presente em algumas regiões e possui importância econômica potencial (SÔNEGO; GARIDO; GAVA, 2005).

O fungo fitopatogênico provoca o aparecimento de sintomas característicos. São observadas na face abaxial das folhas as estruturas de frutificação, denominadas urédias, que são pústulas de coloração amarelada, formada por vários urediniósporos. A infecção ocorre por meio dos estômatos, o que ajuda a explicar sua ocorrência em maior quantidade de pústulas na parte abaxial das folhas e também de não infectar folhas muito jovens (LEU; WU, 1983). Na face adaxial ocorre a necrose do tecido, com lesões de coloração castanha a avermelhada de tamanho e formato variáveis. Geralmente, as pústulas cobrem grande parte do limbo foliar de folhas maduras (SONEGO; GARIDO; GAVA, 2005).

Em estádios posteriores ao aparecimento da necrose, ocorre a formação da télia, com coloração castanha escura no em torno da urédia (MENDES; FREITAS, 2005).

O ciclo de vida completo do patógeno foi encontrado apenas na Ásia, onde se tem a presença de um hospedeiro alternativo o arbusto *Meliosma myriantha* (ONO, 2000). 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 dos urediniósporos geralmente ocorre pela ação do vento, que possui capacidade de deslocá-los a longas distâncias. Outras formas de disseminação do patógeno são através de material vegetativo contaminado ou pelo transporte dos esporos realizado por humanos ou veículos (SÔNEGO; GARIDO; GAVA, 2005).

Caso o ataque do patógeno seja severo, provoca a senescência e desfolha precoce, anterior a maturação dos frutos, prejudicando o amadurecimento dos mesmos e comprometendo a sua qualidade, conseqüentemente reduzindo a produção, e ainda a redução do acúmulo de reservas que irá afetar o vigor das plantas na próxima safra (SONEGO; GARIDO; GAVA, 2005).



Nas regiões de clima tropical e subtropical, a doença pode ocorrer em todo o ciclo da planta 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 (SÔNEGO; GARIDO; GAVA, 2005).

O fungo infecta principalmente folhas maduras, com os estômatos desenvolvidos. Alta umidade durante a noite e temperatura ideal favorece o desenvolvimento de epidemias (SÔNEGO; GARRIDO; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2005). Para a germinação dos urediniosporos a temperatura ótima é de 24-25°C na ausência de luz. Em temperaturas de 16 a 30°C as pústulas aparecem após 5 a 6 dias após a inoculação e a 12 °C aparecem após 15 a 20 dias (PEARSON; GOHEEN 1988).

#### 2.3.1.1 Formas de controle

O controle da ferrugem consiste basicamente na compra de mudas de viveiros certificados, evitar o transporte de materiais contaminados, aplicação de fungicidas e uso de variedades resistentes (MENDES; FREITAS, 2005).

No Brasil, até o momento não há registro de um fungicida para o controle da ferrugem da videira. Alguns estudos avaliaram os fungicidas dos grupos triazólicos (PAPA *et al.*, 2003) e estrobilurinas, que apresentaram resultados satisfatórios no controle de *Phakopsora euvitis* (TESSMANN; VIDA; LOPES, 2003). No que se refere ao controle de doenças esta é a técnica mais utilizada pelos agricultores. No entanto, este método apresenta uma série de limitações (SÔNEGO, GARRIDO, GRIGOLETTI JÚNIOR, 2005), por deixam resíduos, acabam influenciando negativamente na saúde dos animais, humanos e do ambiente (GHINI; BETTIOL, 2000). Além disso, podem induzir a seleção de pragas patogênicas resistentes e causar fitotoxidez às plantas (SOBRINHO *et al.*, 2005).

O melhoramento genético mostra-se uma importante estratégia para o controle de doenças, do ponto de vista econômico e ambiental (ANGELOTTI *et al.*, 2008).

## 2.4 MELHORAMENTO GENÉTICO VISANDO A RESISTÊNCIA A DOENÇAS

Para o progresso e inovação da agricultura o melhoramento genético é essencial, pois além de aumentar a produtividade, reduz a necessidade de uso de insumos, diversifica a produção gerando novos produtos para o mercado (CAMARGO, 2008).

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 comparado com o uso de produtos químicos sintéticos (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2014), além de proporcionar a estabilização da produtividade das safras e reduzir a exposição tanto dos agricultores quanto à dos consumidores e reduzir os custos de produção, com a menor dependência de uso dos produtos químicos (BORÉM; MIRANDA, 2009).

As informações sobre resistência genética a ferrugem da videira são limitadas. Provavelmente explicada pelo fato de que nas regiões vitícolas tradicionais do mundo a doença não foi registrada. Porém, com a expansão de novas regiões produtoras, a importância econômica da doença está aumentando (ANGELOTTI *et al.*, 2008).

A primeira etapa de um programa de melhoramento genético é a seleção de genótipos resistentes, ou seja, identificar fontes de resistência nos bancos de germoplasma, para o desenvolvimento de cultivares com maior resistência ou tolerância a essa doença (CAMARGO; BERGAMIN FILHO, 1995).

### 2.4.1 Resistência genética a Ferrugem da videira

Em condições de campo, no Brasil, as cultivares de *V. labrusca*, *V. vinifera* e *V. rotundifolia* mostram-se suscetíveis a doença (SÔNEGO; GARRIDO; GAVA 2005).

Angelotti *et al.* (2008) avaliou os níveis de resistência de alguns genótipos de *V. vinifera*, cultivadas em vasos em câmara de crescimento. Identificou que os genótipos mais resistentes são as cultivares de porta-enxertos IAC313, IAC572 e IAC766. Destacou ainda que com o aumento da concentração do inóculo, ocorreu aumento do grau de infecção da doença. Observou-se ainda, que o patógeno coloniza, indiscriminadamente, folhas jovens e folhas maduras de videira.

*In vitro*, utilizando discos foliares de 14 mm, Copatti, (2011) observou que os genótipos *V. candicans*, *V. longii*, *V. caribea*, *V. amurensis*, Gropel, IAC-572 apresentaram grau moderado de resistência à doença. Os genótipos Baco 10, *V. thumbergi*, *V. slavinii* e *V. vulpina* apresentam maior suscetibilidade. O mesmo autor relatou que o método utilizado mostrou-se 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, nesse caso, a pilosidade atua como barreira física (resistência mecânica), impedindo a penetração do patógeno, mas sabe-se que, naturalmente, o patógeno é capaz de romper esta barreira.

Hennessy; Daly; Hearnden (2007) utilizaram discos foliares de 8 cm, classificaram o híbrido 41 B como resistente. As demais plantas avaliadas mostraram-se suscetíveis e altamente suscetíveis. Alguns dos resultados encontrados neste estudo divergem de outros realizados anteriormente, assim, os autores destacam a ocorrência de agentes causais pertencentes a espécies diferentes. Estes levantam a hipótese de que a divergência de resultados provém da utilização de metodologias distintas. Houve ainda, divergência de dados com experimento a campo, destacando a possibilidade de uso de uma elevada pressão de inóculo na inoculação artificial.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DO TRABALHO

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Santa Catarina/Campus Curitibanos.

#### 3.2 OBTENÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DO PATÓGENO

O inóculo inicial, urediniósporos, foi coletado de plantas de *Vitis vinifera* em março de 2014, no município de Curitibanos SC, e armazenado em geladeira e de mudas, oriundas do município de Rodeio, SC, conduzidas em casa de vegetação.

Para a multiplicação inicial, os urediniósporos foram depositados sobre folhas das cultivares Niágara Rosada e Bordô (*V. labrusca*), conduzidas em casa de vegetação (Figura 1A), por apresentarem certa suscetibilidade à doença em plantas conduzidas no campo. Posteriormente, as multiplicações seguiram na cultivar Cabernet Franc (*V. vinifera*), em virtude da ausência de pilosidade, facilidade de coleta das pústulas e suscetibilidade à doença.

Para a multiplicação em laboratório dos urediniósporos, folhas foram coletadas de mudas em vasos, acondicionadas em sacos plásticos umedecidos para evitar desidratação e devidamente identificados (COPATTI, 2011). No laboratório, as folhas foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (1,5% de cloro ativo), seguida da lavagem com água destilada e autoclavada, durante 5 min, 2 min e 2 min, respectivamente, seguidas da secagem com papel toalha (Figura 1B). As folhas foram então acondicionadas em placas de Petri, com a parte abaxial voltada para cima sobre ágar-água na concentração de 15 g.L<sup>-1</sup> (PÉROS *et al.*, 2006).

A inoculação do patógeno seguiu a metodologia proposta por Zambolim e Chaves (1974), na qual sobre uma folha destacada, com uma agulha, úredias e urediniósporos foram depositados sobre a face abaxial da folha. Na sequência aspergiu-se água destilada/autoclavada e com um pincel os urediniósporos foram espalhados por toda a superfície da folha.

As placas foram armazenadas em Câmara BOD (demanda bioquímica de oxigênio), com fotoperíodo de 16 horas, ficando as primeiras 24 horas na ausência de luz, e temperatura de 25°C ± 2. Diariamente acompanhou-se o aparecimento dos

primeiros sinais do patógeno. A partir do 7<sup>o</sup> - 10<sup>o</sup> dia iniciou-se a coleta das pústulas com o auxílio de agulha e/ou pincel sobre um fundo preto. Os esporos coletados foram armazenados em microtubos tipo Eppendorf e acondicionadas em geladeira (Figura 1C e1D). Posteriormente, as placas retornavam a BOD para nova esporulação, seguindo de novas coletas até iniciar o aparecimento de contaminantes ou a senescência da folha.

Com a finalidade de selecionar apenas uma raça e reduzir a possibilidade de variabilidade do patógeno, isolou-se apenas uma pústula da primeira multiplicação, recebendo a denominação UFSC-01. A pústula selecionada foi inoculada com o auxílio de uma agulha histológica sobre outra folha seguindo as mesmas etapas utilizadas na primeira multiplicação. Assim sucessivamente os urediniósporos foram multiplicados até se adquirir um número suficiente para o desenvolvimento dos experimentos (item 3.3 e 3.4).



**Figura 1.** Obtenção e multiplicação dos urediniósporos da ferrugem da videira. (A) Mudanças de Bordô e Niágara conduzidas em casa de vegetação; (B) Etapas da tríplice lavagem; (C) Multiplicação de urédias em folhas destacadas de videiras Cabernet Franc; (D) Coleta das pústulas.

### 3.3 EXPERIMENTO 1: DETERMINAÇÃO DA FORMA DE INOCULAÇÃO QUE MELHOR EXPRESSA A DOENÇA EM VIDEIRA

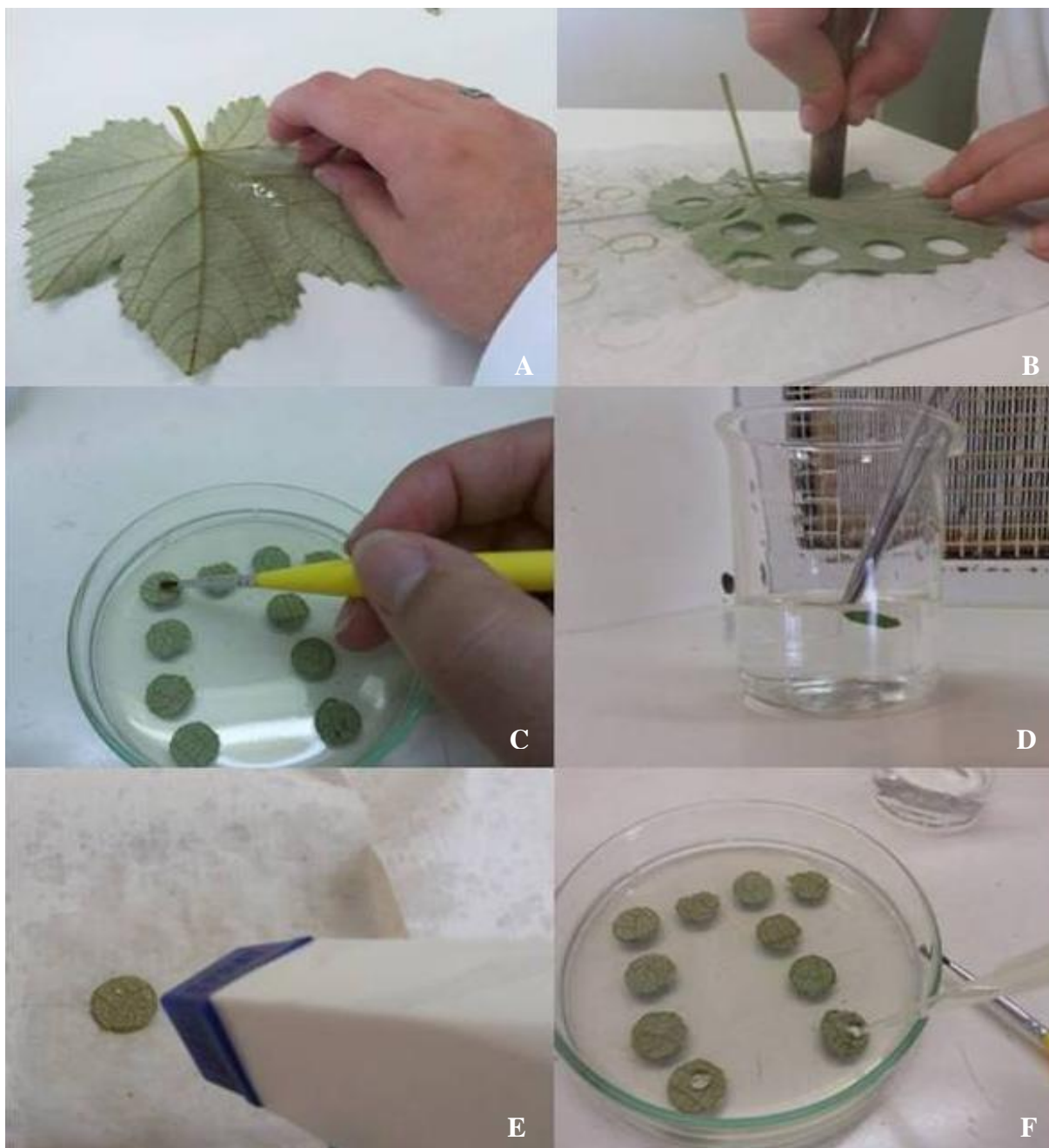
Foram coletadas folhas das cultivares Niágara Rosada e Bordô (*V. labrusca*), cultivadas em vaso, em casa de vegetação com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas e acondicionadas em sacos plásticos umedecidos, devidamente identificados.

Em laboratório, na capela de fluxo laminar, com o auxílio de uma fita durex removeu-se a pilosidade de algumas folhas (Figura 2A). Com um perfurador foram recortados 25 discos de 12 mm de diâmetro das folhas e 25 discos de folhas com a pilosidade removida (Figura 2B). Os mesmos passaram pela desinfestação, como descrito no item 3.2. Os discos foram depositados em placas de Petri, contendo 30 mL de ágar-água, na concentração de 15 g.L<sup>-1</sup>, com a parte abaxial voltada para cima.

Os discos foliares foram inoculados seguindo os tratamentos: T1 - Borrifamento de água autoclavada seguido do pincelamento dos urediniósporos (Figura 2C), T2 – Mergulho dos discos na suspensão de esporos (Figura 2D), T3 – Aspersão da suspensão de esporos com um borrifador (Figura 2E), T4 - Deposição de uma gota de 30 µl (Figura 2F), removida após 24 horas e T5 testemunha, somente foi aspergido água destilada. A concentração da suspensão de esporos utilizada nos tratamentos T2, T3 e T4 foi de 1x10<sup>5</sup>esporos/mL.

Após a inoculação as placas foram devidamente identificadas e acondicionadas em câmara BOD com temperatura controlada de 25°C ± 2 (NARUZAWA *et al.*, 2006), permanecendo com a ausência de iluminação nas primeiras 24 horas, e posteriormente com fotoperíodos de 16 horas de luz (COPATTI, 2011).

O delineamento experimental utilizado para ambas as cultivares foi blocos casualizados em esquema bifatorial 2 x 5, sendo, presença e ausência de pilosidade e as cinco formas de inoculação, com cinco repetições, sendo cada repetição composta de um disco foliar.



**Figura 2.** Metodologia utilizada para a inoculação dos discos foliares com a ferrugem da videira. (A) Remoção da Pilosidade com fita durex; (B) Corte dos discos foliares; (C) Tratamento 1 – Pincelamento da suspensão de esporos; (D) Tratamento 2 – Disco mergulhado na suspensão de esporos; (E) Tratamento 3 – Aspersão da suspensão de esporos; (F) Tratamento 4 - Deposição da gota sobre os discos.

### 3.3.1 Avaliação e análise estatística dos dados

#### 3.3.1.1 Aparecimento dos sintomas da doença (período latente)

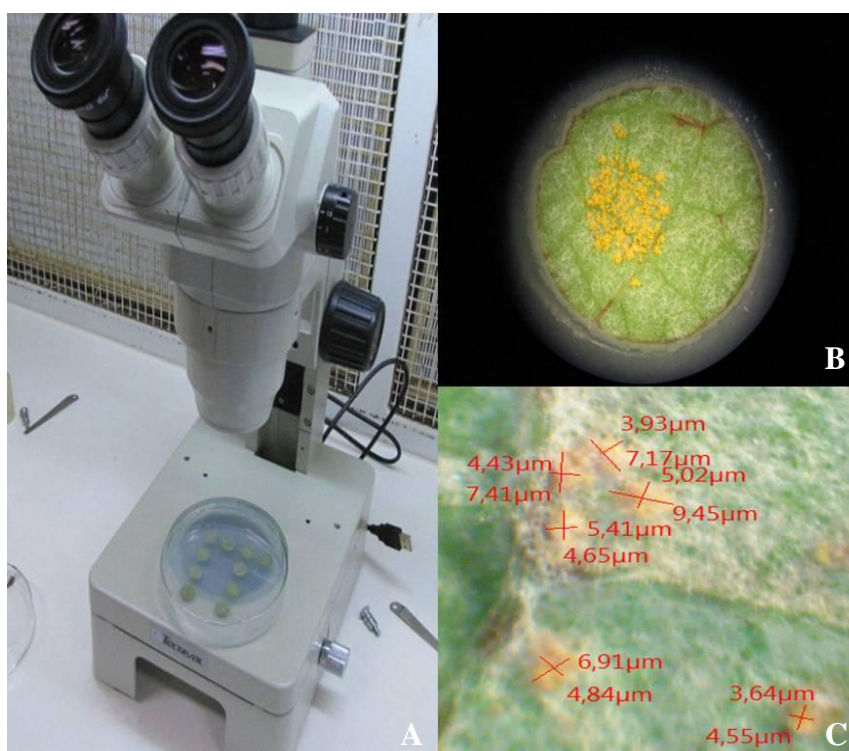
Avaliou-se o tempo, em dias, necessário para o aparecimento dos primeiros sintomas da doença após a inoculação da suspensão de urediniósporos com a



quantificação diária do número de pústulas, para determinar o momento em que 50% das urédias estavam em esporulação (ALVES, 2005).

### 3.3.1.2 Número e diâmetro de pústulas

No décimo dia após a inoculação, foram tiradas fotos com Microscópio Estereoscópio, (aproximação de 20 vezes) Tecmival 6754 (Trimocilar), acoplado com câmera digital Tropicam UCMOS 03100KPA com programa de medidas e captura de imagens Tropviewn realizou-se a contagem total do número de pústulas presentes nos discos foliares (Figura 3A e 3B). Na sequência determinou-se o diâmetro médio das pústulas com a coleta de medidas de comprimento e largura das pústulas de até 50 pústulas por disco (Figura 3C) (COPATTI, 2011; ANGELOTTI, 2008).



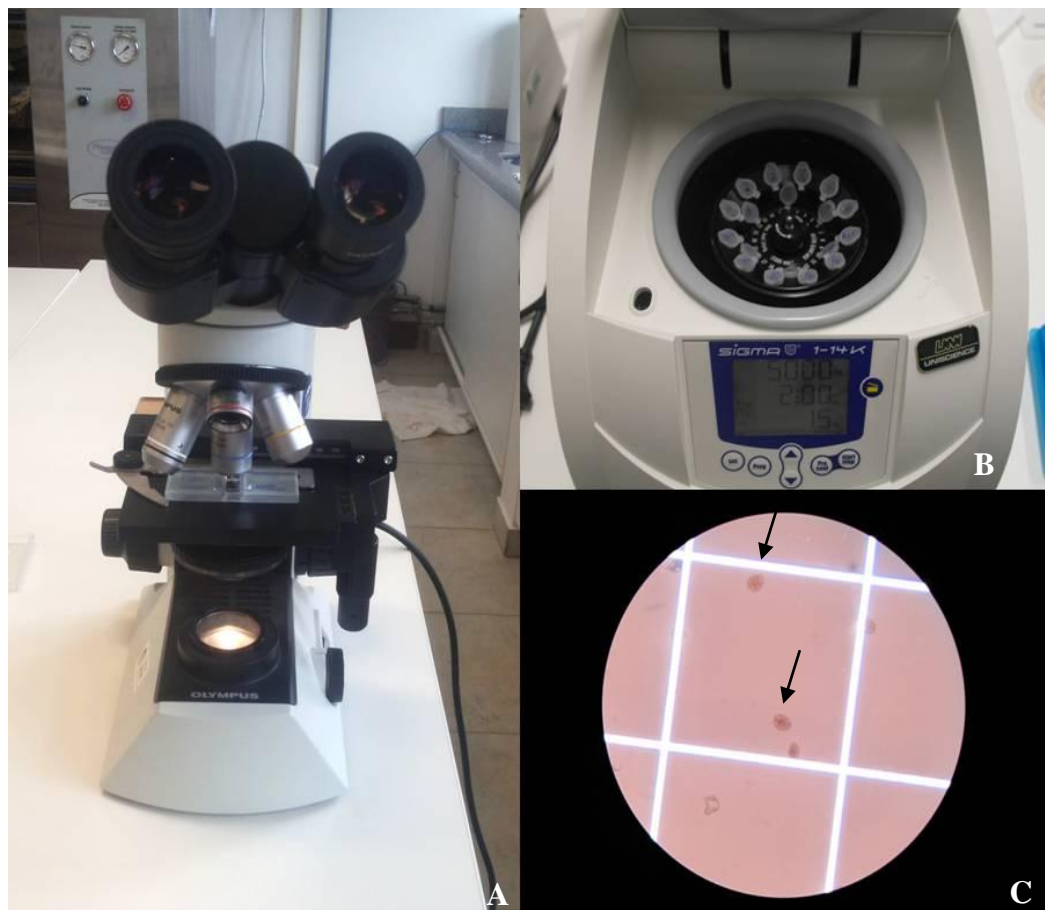
**Figura 3.** Determinação do número e diâmetro de pústulas da ferrugem da videira em estereomicroscópio. (A) Estereomicroscópio; (B) Disco foliar com pústulas; (C) Medidas de comprimento e largura da pústula.

### 3.3.1.4 Intensidade de esporulação

Para avaliar a intensidade de esporulação, os discos foram depositados dentro de microtubos do tipo Eppendorf contendo solução de 1 mL de água destilada



e 1 $\mu$ L de Tween 20. Os microtubos foram centrifugados a 5.000 x g durante 1 min (Figura 4 B). E os esporos contados em câmara de Neubauer® (Figura 4A, 4C) (ANGELOTTI, 2008).



**Figura 4.** Determinação da intensidade de esporulação da ferrugem da videira. (A) Microtubos do tipo Eppendorf na centrifuga; (B) Microscópio de luz de campo claro (aproximação de 40 vezes) com a câmara de Neubauer; (C) Urediniósporos de *Phakopsora euvitis*.

### 3.3.1.5 Análise estatística dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância empregando o programa estatístico ASSISTAT® versão 7.7 beta e quando houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre os tratamentos realizou-se o teste de comparação de médias de Tukey (SILVA; AZEVEDO, 2006).

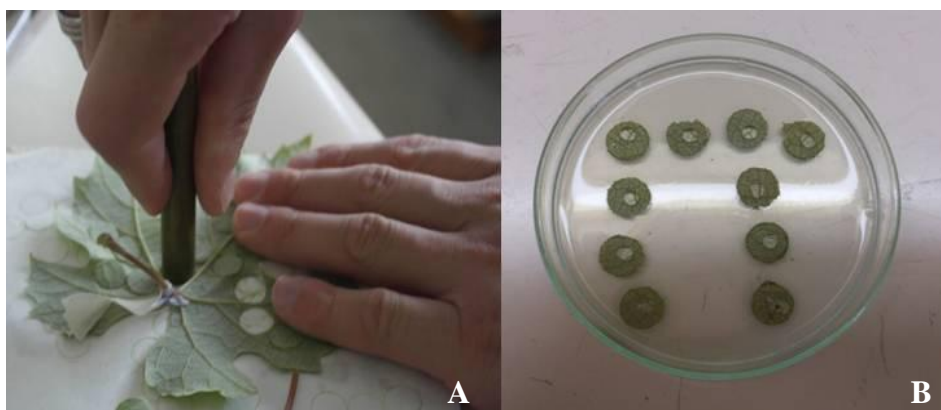
### 3.4 EXPERIMENTO 2: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS QUE MELHOR EXPRESSA A DOENÇA EM VIDEIRA

Foram coletadas folhas maduras da cultivar Bordô (*V. labrusca*), cultivadas em vaso, em casa de vegetação com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas.

Em laboratório, na capela de fluxo laminar com um perfurador as folhas foram recortadas em discos de 12 mm de diâmetro (Figura 5A). Os mesmos passaram pela desinfestação, como descrito no item 3.2 Os discos foram depositados em placas de Petri contendo 30 mL de ágar-água na concentração de 15 g.L<sup>-1</sup>, com a parte abaxial voltada para cima. Sobre cada disco, foram depositadas gotas de 30 µl de suspensão de uredinósporos (Figura 5B).

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completamente casualizados em esquema bifatorial 2 x 5. O primeiro fator consistiu na ausência ou presença (0,053 µl por mL) de Tween 20 na suspensão de esporos, e o segundo fator, cinco concentrações de esporos (5x10<sup>4</sup>, 1x10<sup>5</sup>, 1,5x10<sup>5</sup>, 2x10<sup>5</sup> esporos/mL e apenas água destilada e autoclavada). O experimento foi composto de cinco repetições, sendo a unidade experimental um disco foliar.

Após a inoculação as placas foram devidamente identificadas e acondicionadas em câmara BOD com temperatura controlada de 25°C ± 2 (NARUZAWA *et al.*, 2006), permanecendo com a ausência de iluminação nas primeiras 24 horas, e posteriormente com fotoperíodos de 16 horas de luz (COPATTI, 2011).



**Figura 5.** Inoculação da ferrugem da videira. (A) Corte dos discos foliares; (B) Deposição da gota de 30 µL contendo a suspensão de esporos sobre os discos da cultivar Bordô.

### **3.4.1 Avaliação e análise estatística dos dados**

Foram realizadas as avaliações das mesmas variáveis descritas no experimento 1, item 3.31.

#### **3.4.1.1 Análise estatística dos dados**

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico ASSISTAT® versão 7,7 beta e quando houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre os tratamentos realizou-se o teste de comparação de médias de Tukey (SILVA; AZEVEDO, 2006).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 FORMA DE INOCULAÇÃO EM DISCOS FOLIARES

Para a cultivar Bordô não houve interação entre formas de inoculação do patógeno com presença e ausência de pilosidade. Analisando os fatores separadamente não houve diferença significativa entre remover ou não a pilosidade. Contudo, as formas de inoculação diferiram significativamente ( $p < 0.01$ ) em todas as variáveis respostas analisadas como demonstram os dados na Tabela 1.

O número médio de pústulas por disco variou entre 1,1 a 4,0, sendo que, com a deposição da gota o número de pústulas foi superior aos demais tratamentos, porém não diferiu significativamente. O pincelamento obteve um valor intermediário.

As pústulas dos discos pincelados, mergulhados na suspensão e aspergidos apresentaram menores diâmetros, diferindo significativamente da deposição de gota sobre os discos, que apresentou maior diâmetro, com média de 6,26  $\mu\text{m}$ .

O número de urediniósporos por disco variou entre 1.200 a 7.000, sendo que a maior intensidade de esporulação ocorreu quando a gota foi depositada sobre o disco, porém não diferindo do pincelamento. Os menores valores foram observados quando os discos foram mergulhados e aspergidos com suspensão de esporos.

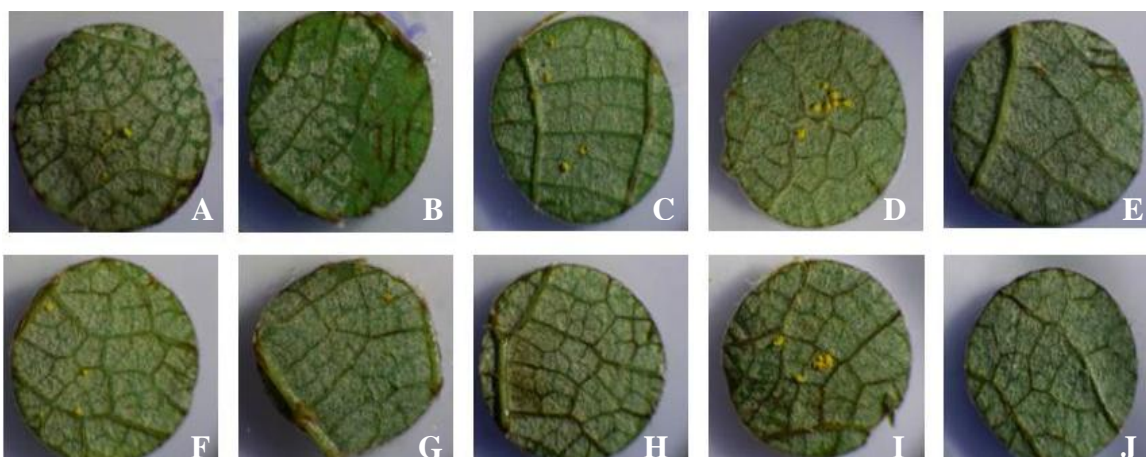
Com a deposição da gota as pústulas demoraram mais para se estabelecer, em torno de 7,6 dias. No entanto, a doença apresentou maior desenvolvimento.

**Tabela 1.** Número de pústulas, diâmetro de pústula, número de urediniósporos e período latente médio em cinco formas de inoculação, em discos foliares na cultivar Bordô.

Tratamento	Número de pústulas por disco	Diâmetro de pústulas ( $\mu\text{m}$ )	Número de urediniósporos por disco	Período latente (dias)
Pincelamento	3,2 a	2,84 b	2000 ab	6,2ab
Discos mergulhados em suspensão de esporos	1,4 ab	2,20b	1200b	3,8 b
Aspersão	1,1 ab	2,20b	1200b	3,2bc
Deposição de gota	4,0 a	6,26 a	7000 a	7,6 a
Testemunha	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 c
Teste F	4,31 **	8,01 **	4.3141 **	10,57 **
CV%	127,80	93,63	182,53	68,52

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0.01$ ); Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey; CV% - Coeficiente de variação.

Não houve diferenças entre os discos com e sem pilosidade e os tratamentos com deposição da gota apresentaram maior número de pústulas (Figura 6).



**Figura 6.** Discos foliares da cultivar Bordô, submetidas a diferentes formas de inoculação. (A a E) Com pilosidade; (F a J) Sem a pilosidade removida; (A e F) Pincelamento da suspensão de esporos; (B e G) Disco mergulhado na suspensão; (C e H) Aspersão da suspensão; (D e I) Deposição da gota; (E e J) Testemunhas.

O resultados obtidos com os discos da cultivar Niágara foram semelhante aos da cultivar bordô, não havendo interação entre os fatores, em três das quatro variáveis analisadas. Também não houve diferença significativa entre remover ou não remover a pilosidade. Entretanto, as formas de inoculação diferiram significativamente ( $p < 0,01$ ) em todas as variáveis respostas analisadas como apresentado na Tabela 2.

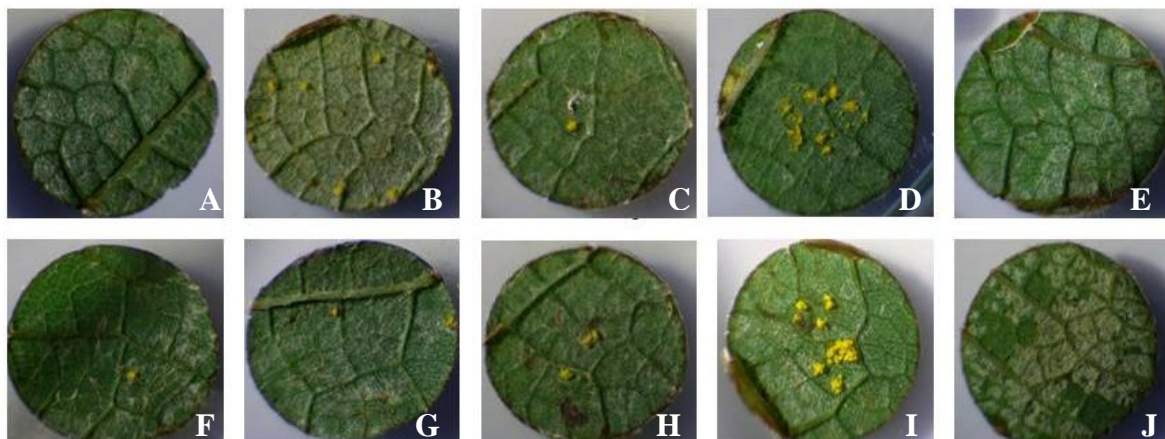
**Tabela 2.** Número médio de pústulas por disco, diâmetro de pústula, número de urediniósporos e período latente médio em cinco formas de inoculação, em discos foliares na cultivar Niágara Rosada.

Tratamento	Número de pústulas por disco	Diâmetro de pústulas ( $\mu\text{m}$ )	Número de urediniósporos por disco
Pincelamento	1,8 b	4,01 a	4000 b
Discos mergulhados em suspensão de esporos	4,6 b	2,68ab	4000 b
Aspersão	0,6 b	2,58ab	1400 b
Deposição de gota	16,2 a	5,70 a	33600 a
Testemunha	0,0 b	0.0 b	0.0 b
Teste F	22.8025 **	6.2028 **	41.1559 **
CV%	95.62	88.93	80.71

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0.01$ ); Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey; CV% - Coeficiente de variação em %.

O número de pústulas variou entre 0,6 com a aspersão a 16,2 com a deposição da gota, a qual diferiu significativamente das demais. Da mesma forma o número de urediniósporos, com 33600 urediniósporos por disco, foi superior. (Tabela 2; Figura 7). O maior valor de diâmetro de pústulas foi observado com a deposição da gota, (5,70  $\mu\text{m}$ ), contudo, este não diferiu significativamente dos demais

tratamentos. Especialmente para o método deposição de gota, o número de pústulas e número de urediniósporos observado foi substancialmente superior na cultivar Niágara Rosada quando comparada com a cultivar Bordô.



**Figura 7.** Discos foliares da cultivar Niágara Rosada, submetidas a diferentes formas de inoculação.(A a E) Com pilosidade; (F a J) Sem a pilosidade removida; (A e F) Pincelamento da suspensão de esporos; (B e G) Disco mergulhado na suspensão; (C e H) Aspersão da suspensão; (D e I) Deposição da gota; (E e J) Testemunha.

Para a variável período latente houve interação significativa entre ao nível de 5% de probabilidade entre os tratamentos com e sem pilosidade. O método deposição da gota apresentou o período latente bastante similar entre os tratamentos com presença e sem presença de pilosidade, com valores de 6,8 dias e 6,4 dias, respectivamente(Tabela 3).

**Tabela 3.** Período latente médio (em dias) em discos foliares na cultivar Niágara Rosada.

Tratamentos	Formas de inoculação				
	Pincelamento	Discos mergulhados em suspensão de esporos	Aspersão	Deposição de gota	Testemunha
Com pilosidade	6,4 aA	2,4 bAB	6,2 aA	6,8 aA	0,0 aB
Sem pilosidade	2,6 bAB	6,0 aA	2,0 bAB	6,4 aA	0,0 aB
CV%					70.47

As médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúsculas na coluna, não diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey; CV% - Coeficiente de variação.

As cultivares Bordô e Niágara foram consideradas suscetíveis a ferrugem em avaliações com plantas e em outros trabalhos, utilizando a mesma concentração de

esporos. Assim, a quantidade de pústulas obtidas é considerada baixa e o coeficiente de variação elevado. Um fator importante a ser considerado é a viabilidade dos urediniósporos, que pode ter influenciado diretamente nos dados obtidos. Como confirmado por Naruzawa (2006), a porcentagem de germinação diminuiu com o aumento do período de armazenamento. A temperatura de armazenamento possui influência direta sobre a viabilidade, segundo Angelotti (2011) favorável para a manutenção da germinação, que fica em torno de  $23 \pm 2$  °C com 45 dias de armazenamento. Nesta mesma temperatura, após 60 dias a porcentagem de germinação dos urediniósporos foi inferior a 10%.

Para Gomes (2010) o pincelamento mostrou-se mais eficiente na inoculação de *Phakopsora euvitis* em mudas de videira. No entanto, é importante destacar que este não se mostra um método representativo experimentalmente, visto que, a concentração de esporos é desconhecida e pode ser diferente para cada repetição (se aderindo ou não as cerdas do pincel). Para a inoculação, visando à multiplicação do patógeno, onde não há influência sobre determinação de resistência, este se mostra um eficiente método. Assim, como o pincelamento, observou-se que mergulhar discos na suspensão de esporos, não permitiu quantificar com maior precisão a quantidade de suspensão depositada, não sendo experimentalmente viável.

A aspersão é uma das técnicas mais utilizadas para avaliar a resistência genética a ferrugem, em plantas e em discos de 8 cm (ANGELOTTI,2011; HENNESSY; DALY; HEARNDEN,2007). No presente estudo, a aspersão foi o método que proporcionou o menor desenvolvimento da doença. Por este motivo, a técnica deve ser melhor avaliada, considerando que esta permite a melhor distribuição dos urediniósporos e, conseqüentemente, a formação das pústulas sobre os discos, facilitando a sua contagem. O uso de borrifadores, assim como o pincelamento não se mostra preciso, neste caso recomenda-se o uso de equipamento dosador a exemplo do aerógrafo, um instrumento de ar comprimido usado em pintura com ação semelhante a um pulverizador (XIMENES, 2000).

A deposição da gota foi o método que apresentou desenvolvimento da doença de forma mais consistente. Para este método a remoção da pilosidade não influenciou na ocorrência da doença. Remover a pilosidade com fita durex não se apresenta como uma técnica eficiente, devido à dificuldade e não remoção completa



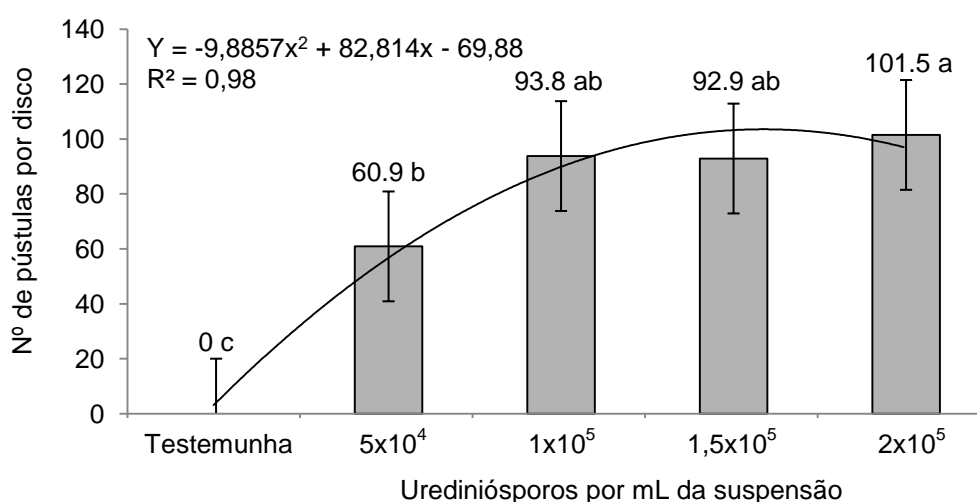
da pilosidade. Outras formas de interação entre patógeno e planta devem ser avaliadas para tornar o bioensaio efetivo.

#### 4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS

O uso ou não de Tween 20 não apresentou interação significativa para o número de pústulas com as diferentes concentrações das suspensões de esporos. Por se tratar de um detergente a função do Tween 20 é quebrar a tensão superficial, tornando a folha mais hidrofílica (MELLO; REIS; SILVA, 2011).

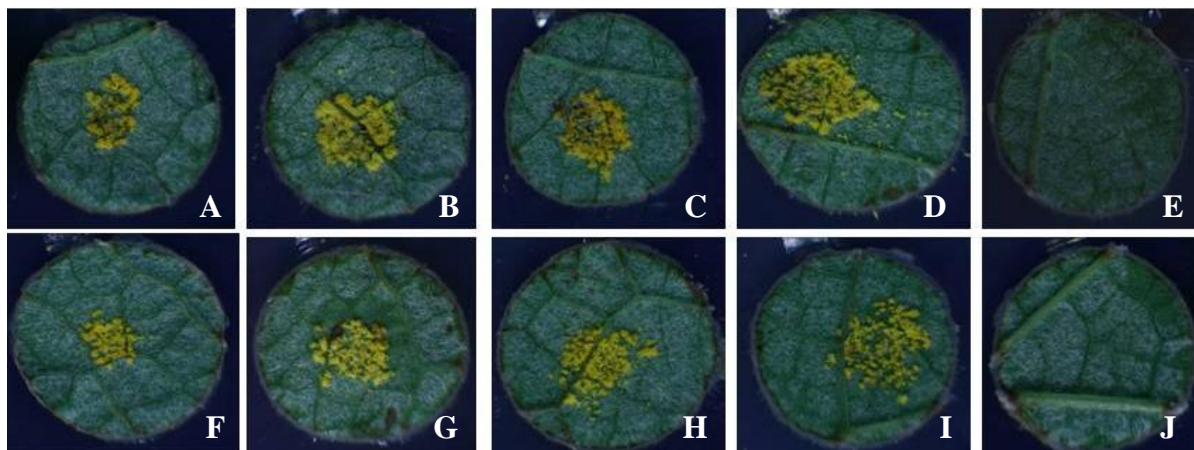
Separadamente, observou-se que não há diferença entre utilizar ou não Tween 20. Considerando os dados, houve uma tendência de aumento do número de pústulas por disco conforme o aumento das concentrações. O maior número absoluto de pústulas por disco foi obtido na concentração de  $2 \times 10^5$ , com média de 101,5 pústulas. No entanto, este não diferiu significativamente das concentrações  $1 \times 10^5$  e  $1,5 \times 10^5$ , que apresentaram média de 93,8 pústulas e 92,9 pústulas, respectivamente. O menor número de pústulas foi observado na concentração de  $5 \times 10^4$ , com valor médio de 60,9 pústulas, porém não diferindo das concentrações intermediárias.

A relação entre concentrações de inoculação e número de pústulas foi descrita pela equação quadrática  $Y = -9,89x^2 + 82,814x - 69,88$  ( $R^2 = 0,98$ ), onde Y = número de pústulas e x = concentrações (Figura 8 e 9).



**Figura 8.** Número de pústulas em discos foliares do cultivar Bordô em diferentes concentrações de suspensão de esporos da ferrugem da videira. As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Cada valor refere-se à média de cinco discos. Coeficiente de Variação - CV% = 39,23;  $R^2$  - Coeficiente de determinação.

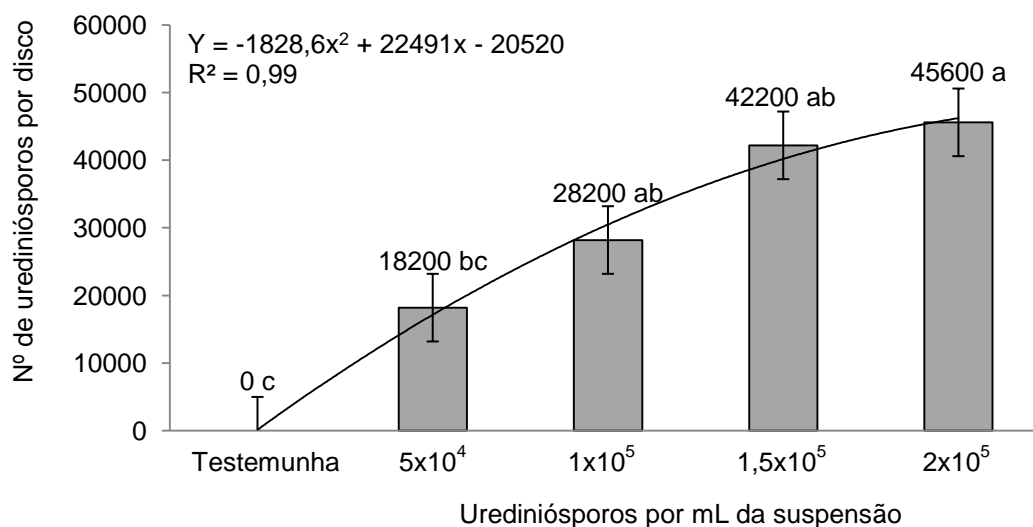




**Figura 9.** Discos foliares da cultivar Bordô, submetidos a diferentes concentrações de esporos com e sem Tween 20. (A à E) Sem Tween 20; (F à J): Com Tween 20; (A e F): $5 \times 10^4$ ; (B e G): $1 \times 10^5$ ; (C e H): $1,5 \times 10^5$ ; (D e I): $2 \times 10^5$ ; (E e J): Testemunhas.

Também não houve interação significativa entre os fatores para número médio de urediniósporos. Com Tween 20, o número médio de urediniósporos foi de 20.240, sendo inferior ao observado em discos com ausência de Tween 20 que foi de 33.440. O número absoluto de urediniósporos aumentou linearmente conforme o aumento das concentrações, variando de 18.200 na menor concentração e 45.600 na maior concentração. Os tratamentos com  $1 \times 10^5$  e  $1,5 \times 10^5$ , apresentaram 28.200 e 42.200 urediniósporos, respectivamente (Figura 10). No entanto, a maior concentração não diferiu significativamente das concentrações intermediárias.

A relação entre concentrações de inoculação e número de pústulas foi descrita pela equação quadrática  $Y = -1828x^2 + 22491x - 20520$  ( $R^2 = 0,99$ ), onde Y = número de urediniósporos e x = concentrações.

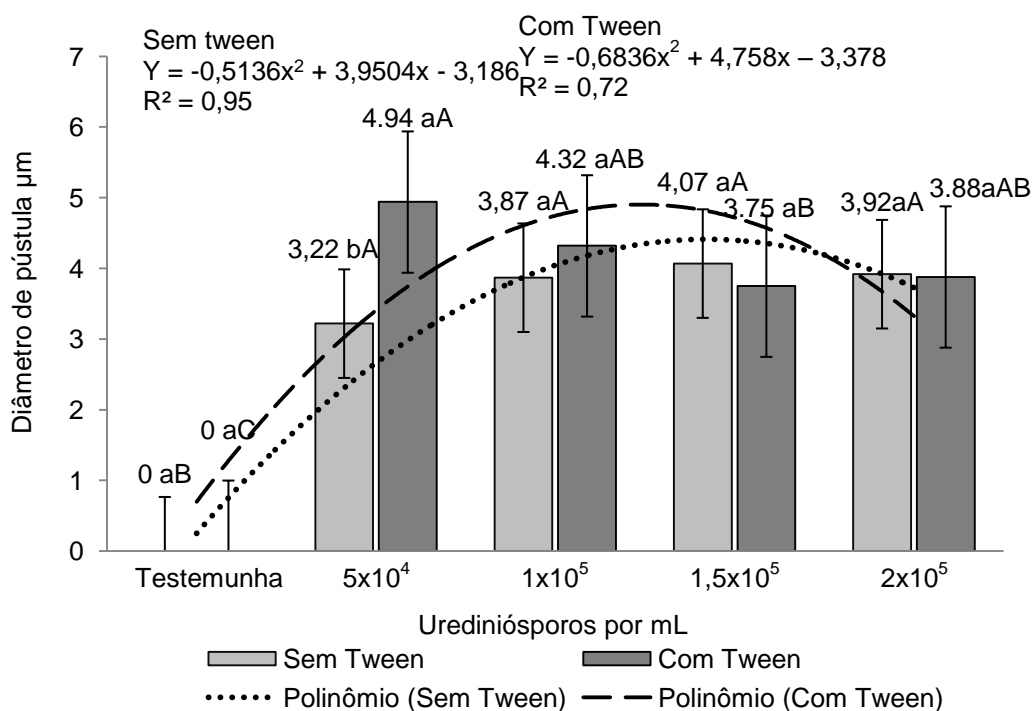


**Figura 10.** Número urediniósporos em discos foliares da cultivar Bordô em diferentes concentrações de suspensão de esporos da ferrugem da videira. As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. Coeficiente de variação – CV% = 77,88.

Na variável diâmetro de pústulas ocorreu interação entre os fatores ( $p < 0.01$ ). No fator Tween 20, apenas a concentração  $5 \times 10^4$  apresentou diferença significativa entre a presença e ausência de Tween 20. O menor diâmetro foi observado para sem Tween 20, com valor de  $3,22 \mu\text{m}$ . Para as demais concentrações a presença ou ausência de Tween 20 não influenciou sobre a ocorrência da doença.

Para o fator diferentes concentrações, quando não utilizado Tween 20 não houve diferença de diâmetro de pústulas entre os tratamentos, o contrário do que ocorreu com a aplicação do espalhante. Com a presença de Tween 20, observou-se variação entre os tratamentos. Com Tween 20, o maior diâmetro encontrado foi igual a  $4,94 \mu\text{m}$  na concentração  $5 \times 10^4$ , enquanto que o menor diâmetro na concentração  $1,5 \times 10^5$  com  $3,75 \mu\text{m}$ . Nas demais obteve-se  $4,32 \mu\text{m}$  na concentração de  $1 \times 10^5$  e  $3,88 \mu\text{m}$  na de  $2 \times 10^5$ .

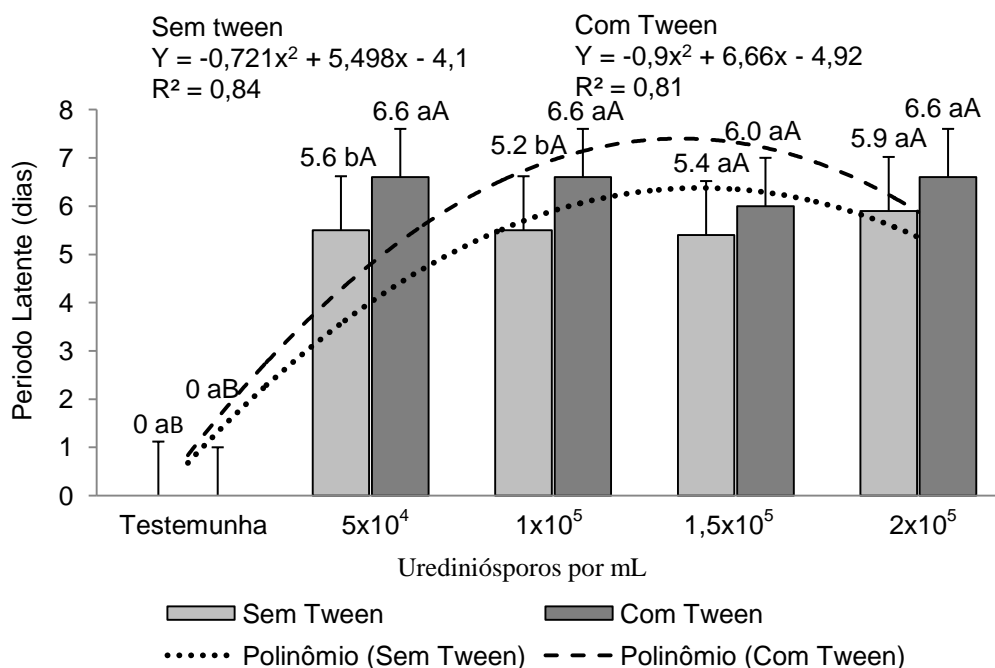
A relação entre formas de inoculação sem adição de Tween 20, e diâmetro de pústulas, foi descrita pela equação quadrática  $Y = -0,513x^2 + 3,9504x - 3,186$  ( $R^2 = 0,95$ ), onde  $Y$  = diâmetro de pústulas e  $x$  = concentrações. E a relação entre formas de inoculação com adição Tween 20, e diâmetro de pústulas, foi descrita pela equação quadrática  $Y = -0,6836x^2 + 4,758x - 3,378$  ( $R^2 = 0,72$ ) (Figura 11).



**Figura 11.** Diâmetro médio de pústulas ( $\mu\text{m}$ ) em discos foliares em diferentes concentrações de suspensão, com e sem a adição de Tween 20. As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. Cada repetição refere-se à média de cinco discos; Letras minúsculas referem-se à variável com e sem Tween 20; Letras maiúsculas referem-se às concentrações da suspensão de esporos; CV% = 18,85.

O período latente não variou entre as concentrações. Com Tween 20 o período latente foi maior em torno de 6,6 dias nas concentrações  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  e  $2 \times 10^5$  e menor quando não adicionado Tween 20 na suspensão de esporos 5,6, 5,2, 5,4 e 5,9 dias nas concentrações  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1,5 \times 10^5$  e  $2 \times 10^5$ , respectivamente (Figura 12).

A relação entre formas de inoculação sem adição Tween 20, e período latente, foi descrita pela equação quadrática  $Y = -0,7214x^2 + 5,4986x - 4,1$  ( $R^2 = 0,84$ ), onde  $Y$  = período latente e  $x$  = concentrações. E a relação entre formas de inoculação com adição Tween 20, e período latente, foi descrita pela equação quadrática  $Y = -0,9x^2 + 6,6x - 4,92$  ( $R^2 = 0,81$ ).



**Figura 12.** Período latente em dias nos discos foliares em diferentes concentrações de suspensão, com e sem a adição de Tween 20. As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. Cada repetição refere-se à média de cinco discos; Letras minúsculas referem-se às variáveis com e sem Tween 20; Letras maiúsculas referem-se às concentrações da suspensão de esporos; CV% = 10,01.

O uso do Tween 20 facilitou a contagem de urediniósporos, necessitando de menor quantidade de inóculo para se chegar à concentração desejada. Desta forma, o não uso de Tween 20 pode extrapolar a concentração utilizada, devido os urediniósporos permanecem aderidos às paredes dos tubos de eppendorf. A concentração de 0,035  $\mu\text{L}$  de Tween 20 por mL permite a permanência de uma gota de 30 $\mu\text{l}$  sobre o disco.

O número de pústulas e o número de urediniósporos apresentaram tendência de aumento linearmente como aumento da concentração de esporos. A

concentração  $1 \times 10^5$ , já é utilizada e recomendada em outros trabalhos. Se considerar a escala de notas proposta por Hennessy; Daly; Hearnden (2007) utilizando esta concentração, a cultivar bordô seria classificada como suscetível e semelhante a resultados encontrados por Angeliotti (2008), onde, foi classificada com a maior classe de suscetibilidade. O mesmo autor ainda destaca que maiores densidades da suspensão depositada sobre a folha, estimulam os urediniósporos a germinar. Hennessy; Daly; Hearnden (2007) afirmam que se deve ter cuidado com elevada pressão de inóculo durante inoculação artificial para não induzir demasiadamente a ocorrência da doença e induzir plantas a serem suscetíveis. Altas concentrações de urediniósporos são condições propícias ao desenvolvimento do patógeno, reduzindo a capacidade da planta se defender.

Na variável diâmetro de pústulas a concentração  $1 \times 10^5$  com Tween 20, pode ser considerada um intermediário entre os demais tratamentos juntamente com a maior concentração  $2 \times 10^5$ . Demonstra que com Tween 20 houve germinação e esporulação das pústulas.

Quando adicionado Tween 20 na suspensão de esporos o período latente foi superior se comparado com os discos onde não se adicionou Tween 20. No entanto, em ambos não há diferença significativa entre as concentrações.

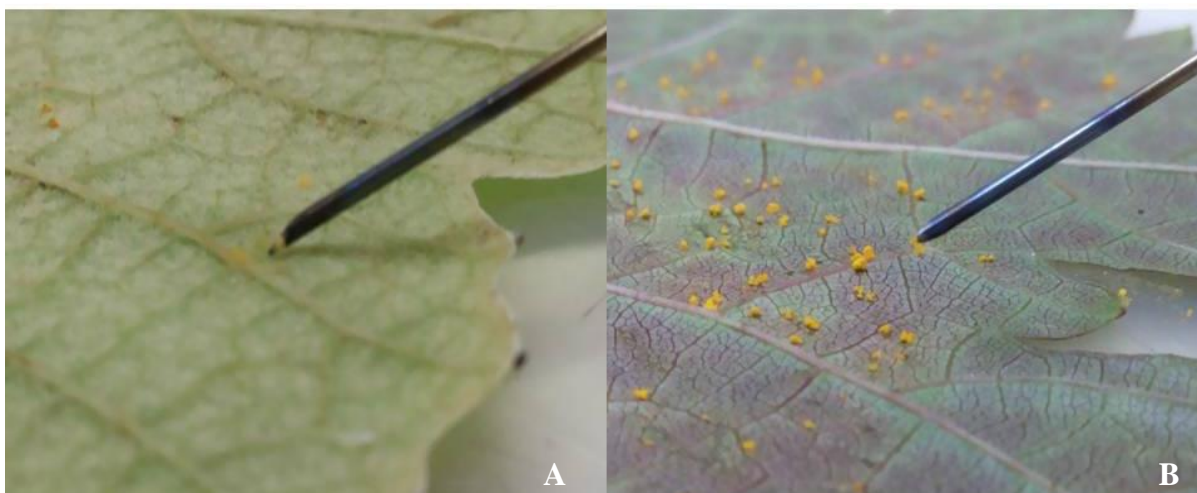
Como é possível observar o segundo experimento apresentou melhores condições de desenvolvimento se comparado ao primeiro, para a mesma forma de inoculação, concentração e ausência de Tween 20, com maior número de pústulas e de urediniósporos e menor diâmetro de pústulas e período latente. Angeliotti et al., (2008), em seu experimento de avaliação da resistência também encontrou maior variação entre os dados das variáveis: eficiência de infecção, tamanho de pústulas e número de urediniósporos produzidos por pústulas, e menor variação em relação ao período latente.

Para facilitar as análises e compreender a ação do patógeno em cultivares com pilosidade, mais estudos se fazem necessários, desde temperatura de armazenamento, concentração de inóculo e correlação entre as variáveis repostas que podem apresentar influencia direta sobre a resposta fenotípica da resistência genética das cultivares.

## 4.3 RECOMENDAÇÕES

### 4.3.1 Coleta das pústulas

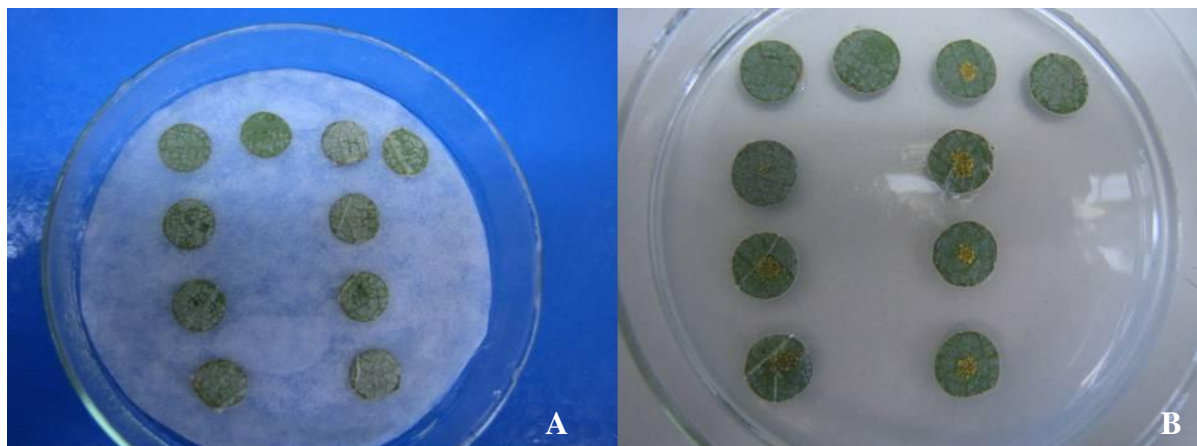
Para tornar o bioensaio ainda mais efetivo estratégias para coleta das pústulas devem ser pensadas visando otimizar tempo, dado que, a coleta com pinça histológica e pincel exige paciência e tempo. Uma estratégia a ser testada é a utilização de um miniaspirador de pó portátil, já utilizado na coleta das pústulas de ferrugem em aveia (CHAVES; MARTINELLI; FEDERIZZI, 2004). Caso se utilize o método da agulha histológica recomenda-se o uso de uma cultivar com ausência de pilosidade em virtude da facilidade de coleta (Figura 13A e 13B).



**Figura 13.** Coleta das pústulas em (A) plantas com pilosidade e (B) com ausência de pilosidade.

### 4.3.2 Ágar-água ou Papel Filtro

O meio utilizado para deposição das folhas pode ser tanto o ágar-água quanto o papel filtro. Quando considerado os custos, o uso do papel filtro mostra-se mais viável. No entanto, o cuidado com a umidade do papel é indispensável. Em avaliações, a cada dois a três dias realizava-se o molhamento dos papéis. Uma opção é sempre utilizar um fundo escuro para facilitar a visualização do controle da umidade (Figura 14A). O uso do meio ágar-água apesar de apresentar maior custo, dispensa cuidados com a umidade (Figura 14B).



**Figura 14.** Discos depositados sobre: (A) Papel Filtro e (B) Meio de cultura ágar-ágar.

## 5 CONCLUSÃO

Para a efetivação do bioensaio de avaliação da resistência genética a ferrugem, estudos mais detalhados devem ser realizados. Pois ainda não foi possível concluir qual a melhor forma de inoculação e concentração da suspensão de esporos a ser utilizada.

Recomendam-se testes de viabilidade dos urediniósporos, que pode estar diretamente relacionada à temperatura de armazenamento. Teste de diferentes formas de remoção da pilosidade com avaliações utilizando microscópio de luz de campo claro. Avaliações de técnicas de inoculação com destaque para o método de deposição da gota com adição de Tween 20 e para o método de aspersão com uso do aerógrafo, ambas apresentam-se alternativas precisas para a inoculação do patógeno. Com aerógrafo avaliar também o tamanho de disco e volume da suspensão a ser depositada. Até o momento a deposição da gota na concentração  $1 \times 10^5$  com Tween 20 foi o método que melhor favoreceu a penetração e desenvolvimento do patógeno em folhas com pilosidade, apresentando maior número de pústulas, de urediniósporos, diâmetro de pústulas e período latente. E ainda a realização de testes para avaliar menores concentrações de inóculo a serem depositadas sobre os discos.

Como ainda não foi possível efetivá-lo, anterior às avaliações de resistência de genótipos, se faz necessário o teste de validação, utilizando plantas com diferentes graus de resistência encontrados em experimentos já realizados para tornar seleção de genótipos *in vitro* mais precisa possível.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, S.A. 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.
- ANGELOTTI, F. et al. Resistência de genótipos de videira à ferrugem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n.9, p. 1129-1134. 2008.
- ANGELOTTI, F. et al. Efeito da temperatura e da luz na germinação de urediniosporos de *Phakopsora euvtis*. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 37, n.1, p. 59-61. 2011.
- BARBIERI, R.; STEEMPT, E. R. T. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília, DF: Embrapa. p.909. 2008.
- BESPALHOK F, J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, Ricardo. Melhoramento para resistência a doenças. In: BESPALHOK F., J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de Plantas**. p. 11-18 Disponível em: <http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%2016.pdf>. Acesso em: 07 set. 2014.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. 5. ed. Viçosa: Ufv, 2009. 529 p.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Uva**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva>>. Acesso em: 08 set. 2014.
- CAMARGO, L. E. A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In.: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, 1995.
- CAMARGO, U. A. Impacto das cultivares brasileiras de uva no mercado interno e potencial no mercado internacional. In: XII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, ed.12, 2008, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. p. 37 – 42.
- CAMARGO, U. A. Cultivares. In: CZERMAINSKI, A. B. C. (Ed.). **Árvore do Conhecimento:Uva para Processamento**. Bento Gonçalves: Agência Embrapa de Informação Tecnológica, 2012.
- CHAVES, Márcia S.; MARTINELLI, J. A.; FEDERIZZI, Luiz C. Resistência quantitativa à ferrugem da folha em genótipos de aveia branca: II - Avaliação de componentes de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Porto Alegre, v.29, n.1, p. 43-51, 2004.



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.

FAO. Food and Agricultural commodities production, 2012. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em 13. set. 2015.

GALLOTTI, G. J. M.et al. Doenças da videira e seu controle em Santa Catarina. 2. ed. Florianópolis: Gmc/Epagri. p. 90, 2009. (Epagri. Boletim Técnico, 51).

GAVA, R.; SÔNEGO, O. R.;GARRIDO, L. da 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.; BETTIOL, W. Proteção de plantas na agricultura sustentável. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v. 17, n. 1, p.61-70, Janeiro – Abril, 2000.

GOMES, E. C. de S. et al. Métodos de inoculação de *Phakopsora euvtitis* Ono em *Vitis labrusca* L. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 4, p.983-985, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n4/a551cr1894.pdf>>. Acesso em: 11 ago. 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.

HENNESSY, C., DALY, A.; HEARNDEN, M. Assessment of grapevine cultivars for resistance to *Phakopsora euvtitis*. **Australasian Plant Pathology**, v. 36, p. 313 – 317. 2007.

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.

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.

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

MELLO, L. M. R.; PROTAS, J. F. da S. Produção e Mercado de Uvas Viníferas. In: PROTAS, J. F. da S. **Uvas Viníferas para Processamento em Regiões de Clima Temperado.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003.

MELLO, S. C. M.; REIS, A.; SILVA, J. B. T. **Manual de Curadores de Germoplasma** – Micro-organismos: Fungos Filamentosos. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. Documento/ Embrapa Hortaliças 134.

MENDES, M. A. S.; FREITAS, V. M. **Espécies invasoras potenciais e atuais para a videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p. 8, set. 2005.

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. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010041582006000100007&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010041582006000100007&script=sci_arttext)> . Acesso em: 16 ago. 2015.

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.

ONO, Y. Taxonomy of the *Phakopsora ampelopsidis* species complex on vitaceous hosts in Asia including a new species, *P. euvitis*. **Mycologia**, v. 92, p. 154-173, 2000.

PAPA, M. F. S.; CELOTO, M. Y. B.; TOMQUELSKI, G. V.; NARUZAWA, E. S.; Boliani, A. C. Ocorrência da ferrugem da videira em São Paulo e Mato Grosso do sul e controle químico em dois sistemas de condução. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n. 28, p. 320, 2003.

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.

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

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.

PIVA, C. A. G. Progresso de antracnose em videira e caracterização de agentes causais. In: PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL, 2., 2014, Lages. Memórias da disciplina de seminários em produção vegetal. **Resumos...** Lages: Universidade do Estado de Santa Catarina, 2014. p. 1.

SALES, M.; MELO, B. **Cultura da videira**. Disponível em:<[http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/videira1#\\_Toc55245525](http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/videira1#_Toc55245525)>. Acesso em: 06 set. 2014.

SCHWANDER, F.; EIBACH, R.; FECHTER, I.; HAUSMANN, L.; ZYPRIAN, E.; TÖPFER, R. *Rpv10*: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. **Theoretical and Applied Genetics** 124: 163–176, 2012.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. O cultivo e o mercado da uva. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/O-cultivo-e-o-mercado-da-uva>>. Acesso em: 04 set. 2014.

SHIMANO, I. S. H.; SENTELHAS, P. C. Risco climático para ocorrência de doenças fúngicas da videira no Sul e Sudeste do Brasil. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 44, n. 3, p.527-537, jul - set 2013. Disponível em: <<http://www.ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/2249/831>>. Acesso em: 06 set. 2014.

SILVA, F. de A.S; AZEVEDO, C.A.V de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance. In: WOLD CONGRESSO ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4., Orlando-FL-USA: **Anais...** Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p. 393-396.

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

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. Doenças fúngicas e medidas de controle. In: KUHNS, Gilmar Barcelos (Ed.). **Uvas Americanas e Híbridas para Processamento em Clima Temperado**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, jan 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaAmericanaHibridaClimaTemperado/doenca.htm>>. Acesso em: 6 set. 2014.

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).

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.

TESSMANN, D. J. et al. Grape Rust caused by *Phakopsora euvitidis*, 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. A ferrugem da videira no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38, 2005, Brasília. **Anais**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, p.220-222, 2005.

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

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. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftpiea/publicacoes/asp6-2-05.pdf>. Acesso em: 05 out. 2014.

WEINERT, M. P.; SHIVAS, R. G.; PITKETHLEY, R. N.; DALTY, A. M. First record of grapevine leaf rust in the Northern Territory, Australia. *Australasian Plant Pathology*, v. 32, p. 117-118, 2003.

XIMENES. S. Minidicionário Ediouro da Língua Portuguesa. 2. Ed. São Paulo: Ediouro, 2000.

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.

ZANELLA, V. Produtos derivados de uva para incremento de renda. Embrapa Uva e Vinho, 2008.