

## PIRAMIDAÇÃO DE LOCOS DE RESISTÊNCIA CONTRA O MÍLDIO DA

### VIDEIRA (*Plasmopara viticola* L.)

Luciano Saifert<sup>1\*</sup>, Rubens Onofre Nodari<sup>2</sup>, Leocir José Welter<sup>3</sup>

<sup>1\*</sup> Acadêmico do curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Caixa Postal 476, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>2</sup> Professor Titular, Depto de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Caixa Postal 476, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>3</sup> Professor Adjunto, Universidade Federal de Santa Catarina/ Campus Curitibanos. Rod. Ulysses Gaboardi, Km 3 – Caixa Postal 101, CEP 89.520-000, Curitibanos, SC, Brasil.

#### Resumo

No Brasil, a região Sul é a principal produtora de vinhos finos do país. A região apresenta elevada precipitação pluviométrica, condição que favorece o ataque do míldio (*Plasmopara viticola* L.), tornando-o o principal agente fitopatogênico na produção vitivinícola no Sul do Brasil. A aplicação de técnicas de biologia molecular permitiu a localização de regiões genômicas associadas com a resistência a essa doença e marcadores moleculares ligados aos locos *Rpv1* e *Rpv3*, que conferem resistência ao míldio, estão disponíveis. No presente trabalho objetivou-se a aplicação da seleção assistida por marcadores moleculares para piramidar os locos de resistência *Rpv1* e *Rpv3* e avaliar o nível de resistência conferido por estes quando combinados, utilizando isolados de míldio brasileiros. Uma progênie de 24 indivíduos proveniente do cruzamento entre '2000-305-122' e 'Gf.Ga 52-42', segregando para os dois locos de resistência foi genotipada com quatro marcadores microssatélites flanqueando os locos de resistência. Além disso, foi realizada uma avaliação fenotípica através de inoculações em discos foliares para determinar o nível de resistência ao míldio de todas as plantas da população. A análise molecular permitiu identificar seis indivíduos (4, 14, 15, 16, 19 e 23) contendo os locos *Rpv1* e *Rpv3* piramidados. Na análise fenotípica, os indivíduos com os locos *Rpv1* + *Rpv3*, *Rpv1*, *Rpv3* e Suscetível apresentaram as seguintes médias de esporangióforos por disco foliar 13, 31, 22 e acima de 50, respectivamente. Indivíduos contendo os genes de resistência combinados (piramidados) apresentaram nível de resistência mais elevado,

quando comparado aos indivíduos contendo apenas um dos genes. Além do maior nível de resistência, espera-se que a resistência dos genótipos contendo os genes de resistência piramidados seja mais duradoura, visto que os genes de resistência *Rpv1* e *Rpv3* são derivados de espécies diferentes de videira.

**Palavras-chave:** *Vitis*, melhoramento de videira, seleção assistida por marcadores moleculares, resistência genética.

## PYRAMIDING RESISTANCE LOCI AGAINST GRAPE DOWNY MILDEW

(*Plasmopara viticola* L.)

### Abstract

Southern Brazil is the principal producer of fine wines in the country, however, the high yearly rainfall provides favorable conditions for spread of grape downy mildew (*Plasmopara viticola* L.), the main plant pathogen in wine production in the region. Molecular approaches can be used to distinguish genomic regions associated with resistance, such as the molecular markers connected to the loci *Rpv1* and *Rpv3*, which confer resistance to grape downy mildew. The objective of this study was to use marker-assisted selection for pyramiding resistance loci *Rpv1* and *Rpv3* and evaluate their conferred resistance to Brazilian mildew isolates. A progeny of 24 individuals were derived from a cross between '2000-305-122' and 'Gf.Ga 52-42' with segregation for the two resistance loci and genotyped with four microsatellite markers flanking the resistance loci. In addition, phenotypic analysis was performed by inoculating leaf discs to determine levels of mildew resistance in all progeny. Molecular analysis identified six individuals (4, 14, 15, 16, 19 and 23) containing the pyramided *Rpv1* and *Rpv3* loci. Individuals with the loci *Rpv1* + *Rpv3*, *Rpv1*, *Rpv3* and susceptible showed an average of 13, 31, 22 and above 50 sporangiophores per foliar disc, respectively. Individuals containing the pyramided resistance loci presented the highest resistance level when compared to individuals with only one resistance locus. In addition to the higher resistance, it is hoped that genotypes with pyramided resistance loci have a longer-lasting resistance, since *Rpv1* and *Rpv3* resistance loci are derived from different grape species.

**Key words:** *Vitis*, grape breeding, marker-assisted selection, genetic resistance.

## Introdução

A viticultura brasileira ocupa uma área de aproximadamente 80.305 hectares, com uma produção de aproximadamente 1,51 milhões de toneladas de uvas (IBGE, 2015). Há uma grande variabilidade no material genético utilizado. São mais de 120 variedades de *Vitis vinifera* e mais de 40 variedades de uvas americanas, incluindo castas de *Vitis labrusca*, *Vitis bourquina* e de híbridas interespecíficas (CAMARGO et al., 2011). O Estado do Rio Grande do Sul se destaca na produção de uvas, representando mais que 50% da produção nacional, sendo também o maior produtor de vinhos do país (MELLO, 2013). Em 2014, este Estado teve uma produção de aproximadamente de 226,8 milhões de litros de vinho, sendo que deste total, em torno de 20,4 milhões (9%) foram de variedades viníferas (*Vitis vinifera*), e o restante provenientes de variedades americanas e híbridas (UNIVIBRA, 2014).

As variedades viníferas possuem alta qualidade enológica, no entanto a baixa produtividade delas é devido a sua suscetibilidade a várias doenças fitopatogênicas, onde a principal doença que afeta a cultura na região Sul do Brasil é o míldio. Já as espécies americanas como *Muscadinia rotundifolia*, *V. rupestris*, *V. riparia* e *V. berlandieri* (WIEDEMANN-MERDINOGLU et al., 2006; MARGUERIT et al., 2009; TERRAL et al., 2010) e espécies asiáticas, principalmente *V. amurensis* (DI GASPERO et al., 2002; MOREIRA et al., 2011; BLASI et al., 2011; SCHWANDER et al., 2012; VENUTI et al., 2013) apresentam alto grau de resistência à doenças, sendo assim usadas em vários programas de melhoramento.

O míldio da videira é causado pelo oomiceto *Plasmopara viticola* (Berk & Kurt) Berlese & de Toni, pertence à classe Oomycetes, ordem Peronosporales, família Peronosporaceae. Esta doença é originária da América do Norte, onde sempre ocorreu em videiras nativas. Sua introdução no Brasil ocorreu conjuntamente com a introdução das videiras americanas em São Paulo, por serem mais rústicas do que as videiras viníferas (GARRIDO e SÔNEGO, 2002).

Este patógeno danifica folhas, ramos herbáceos, inflorescências e bagas da videira, e pode levar à perda total da produção (NAVES et al., 2005). A temperatura ótima para o desenvolvimento do patógeno é de 20°C a 25°C e umidade ótima acima de 95%. É necessário que ocorra condensação de água (água livre) sobre o tecido foliar por um período mínimo de duas horas para haver novas infecções (GARRIDO e SÔNEGO, 2002).

Segundo Genta et al. (2010) a ocorrência de epidemias de míldio está condicionada à presença de umidade na parte aérea da parreira e tanto mais severas são as epidemias quanto mais frequentes e prolongados forem os períodos de molhamento dos tecidos verdes da planta.

O manejo do míldio nas áreas vitícolas da região Sul do Brasil é dependente de diversas aplicações de fungicidas para o seu controle. Fungicidas de classes toxicológicas (III e IV), menos prejudiciais ao homem e ao meio ambiente, tem apresentado baixa eficácia no controle do míldio nos cachos em anos de alta precipitação e alta umidade relativa (UR) do ar (CZERMAINSKI e SÔNEGO, 2004). Pereira et al. (2010) observaram que produtos alternativos usados na proteção da videira contra o míldio não apresentam boa eficiência em comparação aos tratamento com fungicidas químicos.

Mundialmente muitos programas de melhoramento tem procurado aumentar a produção e qualidade da uva, buscando resistência genética as principais doenças desta cultura, com o objetivo de reduzir a utilização de agrotóxicos, contaminação do ambiente e da fruta. Atualmente com o auxílio de ferramentas moleculares a obtenção de variedades resistentes ao míldio e com boa qualidade enológica se torna uma alternativa viável e interessante para a vitivinicultura brasileira.

Mediante estudos de mapeamento genético tem sido identificadas as regiões genômicas *Rpv1* e *Rpv3* associadas com a resistência contra o míldio da videira (WIEDEMANN-MERDINOGLU et al., 2006; WELTER et al., 2007) e marcadores moleculares associados a estas regiões foram empregados na seleção assistida (*Marker-Assisted Selection*) visando a piramidação de genes de resistência (EIBACH et al., 2007). Segundo Alzate-Marin et al. (2005) uma aplicação bastante concreta dos marcadores na seleção assistida é durante o processo de piramidação de alelos de resistência, cujo objetivo é desenvolver variedades com resistência duradoura e de amplo espectro. Marcadores moleculares ligados aos alelos a serem piramidados podem ser monitorados ao longo do processo de piramidação, constituindo-se em uma ferramenta de seleção indireta, evitando as dificuldades inerentes ao processo de seleção via análise de sintomas.

A piramidação de locos de resistência torna a resistência mais complexa e duradoura, dificultando ao patógeno superar a mesma (NELSON, 1978; SING et al., 2001; TAR'AN et al., 2003). Baseado apenas em dados fenotípicos é muito difícil, rastrear a acumulação de genes de resistência em uma nova cultivar, sendo assim, a MAS uma

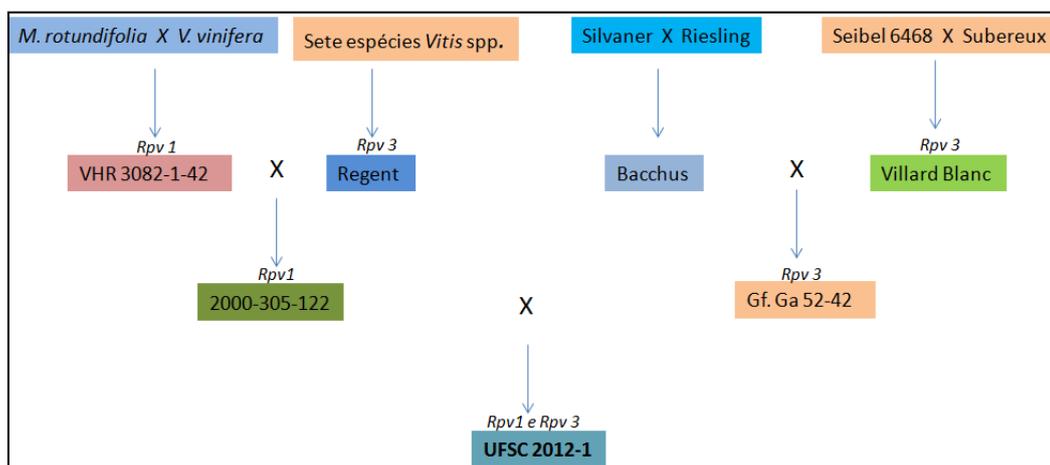
ferramenta fundamental na piramidação de genes de resistência e na seleção de indivíduos com resistência durável em programas de melhoramento (EIBACH et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar uma população experimental de videira utilizando a seleção assistida por marcadores moleculares para piramidar os locos de resistência *Rpv1* e *Rpv3* e estudar o nível de resistência conferido por estes quando combinados, utilizando isolados de míldio brasileiros.

## Material e métodos

### Material vegetal

Uma população de 24 indivíduos, denominada UFSC-2012-1, proveniente do cruzamento entre '2000-305-122' e 'Gf.Ga 52-42' foi genotipada com marcadores moleculares ligados aos locos de resistência *Rpv1* e *Rpv3* e avaliada quanto ao nível de resistência ao míldio da videira. O parental '2000-305-122' é resultante do cruzamento entre 'VHR-3082-1-42' e 'Regent' e possui o loco *Rpv1* (WIEDEMANN-MERDINOGLU et al., 2006), enquanto que o parental 'Gf.Ga 52-42' é resultante do cruzamento entre 'Bacchus' e 'Villard Blanc', este é um genótipo do programa de melhoramento do "Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof"/Alemanha e carrega o loco *Rpv3*. Ambos genes conferem resistência horizontal ao míldio (Figura 1).



**Figura 1.** Pedigree de três gerações da progênie UFSC 2012-1.

### Avaliação molecular

O DNA foi isolado de folhas dissecadas em sílica gel (100 mg) maceradas no homogeneizador Precellys® 24 em tubos de 2 mL (self-standing microtube, Bertin Technologies) com quatro esferas de cerâmica de 2,8 mm, durante dois ciclos de agitação

por 30 s a 5000 rpm. Em seguida, foi utilizado o kit de extração NucleoSpin® Plant II de acordo com as recomendações do fabricante, o DNA resultante foi quantificado com o espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) e, posteriormente, diluído para a concentração de  $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .

Para a genotipagem foram utilizados quatro marcadores microssatélites, dois flanqueando cada um dos locos de resistência. Os marcadores foram gentilmente fornecidos pelo pesquisador Ruldolf Eibach.

As reações de PCR foram realizadas em volume final de  $5 \mu\text{L}$ , combinando os quatro marcadores microssatélites em multiplex utilizando o kit KAPA 2G (Kapa Biosystems, Inc. Boston, USA). O mix foi composto por 1x de KAPA Fast Multiplex Mix, quatro pares de primers na concentração de  $0,01 \mu\text{M}$ . Os primers (5' do primer forward) foram marcados com as fluorescências 6-FAM e VIC.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador C-1000™ Thermal Cycler (Biorad) utilizando-se a seguinte programação:  $94^\circ\text{C}$  por 3 min; 30 ciclos de amplificação a  $94^\circ\text{C}$  por 30 s;  $60^\circ\text{C}$  por 30 s e  $72^\circ\text{C}$  por 1 min e extensão final a  $72^\circ\text{C}$  por 40 min. Os produtos das reações de PCR ( $1 \mu\text{L}$ ) foram diluídos em  $27 \mu\text{L}$  de água ultrapura autoclavada. Para a corrida no sequenciador, utilizou-se um volume final de  $10 \mu\text{L}$ . Sendo  $1 \mu\text{L}$  da reação da PCR diluída,  $0,5 \mu\text{L}$  do marcador Gene Scan 600 LIZ (Life Technologies) e  $8,5 \mu\text{L}$  de formamida (Life Technologies). Os alelos foram separados por eletroforese capilar utilizando o sequenciador 3500 XL Applied Biosystems. O tamanho dos alelos foi definido com a utilização do software Gene Mapper Versao 4.1 (Applied Biosystems).

#### *Avaliação fenotípica*

Para validar a informação molecular, foram realizadas ensaios de resistência ao míldio utilizando a metodologia de discos foliares proposta por Schwander et al. (2012) com adaptações.

Para as inoculações artificiais, esporos do míldio foram coletados na casa de vegetação da Universidade Federal de Santa Catarina/Campus Curitibanos. A terceira, quarta e quinta folhas do ápice para a base foram coletadas e tratadas com hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo), seguida de tríplice lavagem com água destilada autoclavada, sendo recortados quatro discos foliares de  $12 \text{ mm}$  de diâmetro de cada folha e colocados em placas de Petri autoclavadas sobre papel filtro esterelizado e umedecido com água

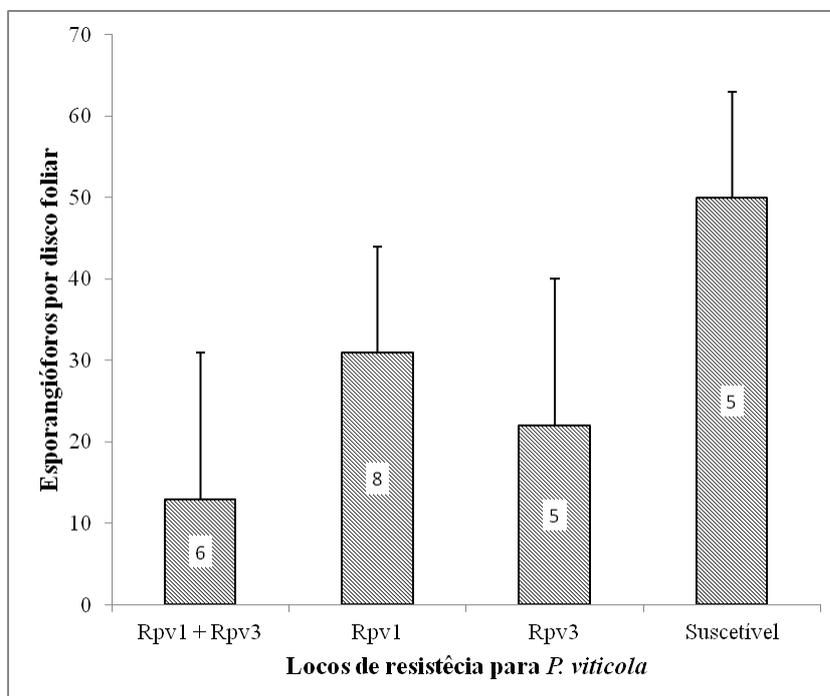
destilada autoclavada. Na parte abaxial dos discos foliares foram aplicados 30  $\mu\text{L}$  de suspensão de esporos na concentração de 50.000 esporos. $\text{mL}^{-1}$ .

Posteriormente, as placas foram seladas com parafilme e acondicionadas em câmara de germinação tipo B.O.D. Nas primeiras 10 horas os discos foram mantidos no escuro à temperatura constante de 22°C. Após o programa foi de 14 horas de luz e temperatura constante de 25°C, por um período de sete dias. No sétimo dia foi realizada avaliação da intensidade de esporulação nos discos foliares com o auxílio de uma lupa para determinar o nível de resistência de cada genótipo. A intensidade de esporulação foi quantificada através da contagem do número de esporangióforos formados. Foi realizada uma média do número de esporangióforos por cada genótipo encontrado. Na avaliação do nível de resistência ao míldio, as plantas foram divididas em quatro classes conforme a intensidade de esporangióforos (1: zero a cinco; 3: cinco a vinte; 5: vinte a cinquenta; 7: mais que cinquenta). Para cada genótipo foi calculada a média de esporangióforos dos 12 discos foliares analisados (4 discos x 3 folhas). A análise estatística foi feita com o programa Assisat 7.7 beta, sendo 24 tratamentos (plantas) x 3 repetições (folhas). Foi feito o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## Resultados e discussão

Nas avaliações moleculares foram identificadas seis plantas (25%) contendo os alelos de resistência *Rpv1* e *Rpv3* piramidados, oito plantas (33%) contendo apenas o alelo *Rpv1*, cinco plantas (21%) contendo apenas o alelo *Rpv3* e cinco plantas (21%) não apresentaram nenhum dos alelos de resistência. Duas plantas apresentaram recombinação genética para um dos marcadores ligados ao alelo *Rpv3* (Figura 2; Tabela 1).

As plantas que possuem os dois locos de resistência combinados apresentaram média de 13 esporangióforos por disco foliar, enquanto que, as plantas que possuíam apenas um dos locos de resistência registraram média de 27 esporangióforos e as plantas sem a presença de nenhum dos locos de resistência apresentaram-se altamente suscetíveis a doença, com média superior a 50 esporangióforos por disco foliar, sendo densa a esporulação do patógeno, dificultando a contagem dos mesmos (Figura 2). A produção e a densidade de esporangióforos produzidos pelas inoculações artificiais são amplamente aceitas como bons critérios para estimar a resistência aos agentes patogênicos de videiras (DAI et al., 1995; LIU et al., 2003; SCHNEE et al., 2008; SCHWANDER et al., 2012).



**Figura 2.** Nível de resistência ao míldio da videira (média de esporangióforos visualizados por disco foliar) e o desvio padrão conferido pelos locos de resistência *Rpv1* e *Rpv3*. O número dentro das barras indica a quantidade de plantas encontradas em cada genótipo.

Diferenças significativas foram observadas no número de esporangióforos em plantas contendo a mesma combinação de alelos de resistência. As plantas 15, 16, 19 e 23 apresentaram as menores médias de esporangióforos por disco foliar (dois esporangióforos) (Tabela 1), sendo as mais resistentes a doença. Isso se deve ao efeito somatório (aditivo) de resistência dos locos *Rpv1* + *Rpv3*. Entretanto, as plantas 4 e 14, mesmo apresentando os dois alelos de resistência tiveram uma maior média de esporangióforos (33,8 esporangióforos por disco foliar), sendo que neste caso, os fragmentos foram amplificados, mas os locos de resistência podem ter sofrido algum tipo de deleção no crossing-over. A planta 12 também se mostrou altamente resistente ao patógeno, porém a análise genética revelou apenas a presença do alelo de resistência *Rpv3*.

**Tabela 1.** Resultados das avaliações genéticas e fenotípicas da população experimental UFSC-2012-1.

Plantas	Avaliações					Fenotípica	
	Genética				Alelos presentes	Média ** esporangióforos	
	Marcadores*						
	Cromossomo 18	Cromossomo 12					
1	2	3	4				
1	+	-	+	+	<i>Rpv1</i> +( <i>Rpv3</i> )	26,3±5	abc
2	-	-	-	-	Ausente	>50,0 <sup>1</sup> ±0	a
3	-	-	-	-	Ausente	>50,0±0	a
4	+	+	+	+	<i>Rpv1</i> + <i>Rpv3</i>	24,3±16	abcd
5	-	-	+	+	<i>Rpv1</i>	21,0±5	abcd
7	+	+	-	-	<i>Rpv3</i>	30,3±9	ab
8	+	+	-	-	<i>Rpv3</i>	21,3±22	abcd
9	-	-	+	+	<i>Rpv1</i>	48,7±2	a
10	+	+	-	-	<i>Rpv3</i>	34,7±19	ab
11	-	-	-	-	Ausente	22,0±19	abcd
12	+	+	-	-	<i>Rpv3</i>	0,3±1	e
13	-	-	+	+	<i>Rpv1</i>	46,7±2	a
14	+	+	+	+	<i>Rpv1</i> + <i>Rpv3</i>	43,3±9	a
15	+	+	+	+	<i>Rpv1</i> + <i>Rpv3</i>	4,7±3	de
16	+	+	+	+	<i>Rpv1</i> + <i>Rpv3</i>	0,7±1	e
17	-	-	+	+	<i>Rpv1</i>	45,0±4	a
18	+	+	-	-	<i>Rpv3</i>	25,0±7	abcd
19	+	+	+	+	<i>Rpv1</i> + <i>Rpv3</i>	1,3±2	e
20	-	-	+	+	<i>Rpv1</i>	4,7±3	cde
21	-	-	+	+	<i>Rpv1</i>	45,7±4	a
22	+	-	+	+	<i>Rpv1</i> +( <i>Rpv3</i> )	8,7±4	bcde
23	+	+	+	+	<i>Rpv1</i> + <i>Rpv3</i>	1,7±1	e
24	-	-	-	-	Ausente	>50,0 <sup>1</sup> ±0	a
25	-	-	-	-	Ausente	>50,0 <sup>1</sup> ±0	a

\*Marcadores fornecidos gentilmente pelo pesquisador Rudolf Eibach do Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof/Alemanha. \*\* Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. <sup>1</sup>Esporulação densa, não sendo possível a contagem dos esporangióforos.

As plantas 1 e 22 apresentaram recombinação genética para o alelo *Rpv3*. Pela análise fenotípica foi possível observar que a planta 1 possivelmente não possui o alelo *Rpv3*, enquanto que, a planta 22, devido a baixa incidência de esporangióforos, pode apresentar o alelo *Rpv3*.

A variação fenotípica observada em plantas carregando os mesmos alelos de resistência poderia ser o resultado da interação destes alelos com outros de menor efeito que também contribuem para a resistência ao patógeno e também estejam segregando nesta população experimental.

Na literatura têm sido reportados outros alelos de menor efeito que conferem resistência ao míldio e estão relacionados com os parentais que originaram a população UFSC-2012-1 (Tabela 2; Figura 1).

Relacionados com o parental 2000-305-122: Wiedemann-Merdinoglu et al. (2006), localizou no cromossomo 18, um QTL denominado *Rpv2* também originado de *M. rotundifolia* a mesma espécie doadora do loco *Rpv1*. A variedade Regent desenvolvida pelo Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof/Alemanha possui resistência ao míldio e ao oídio da videira (ANONYMOUS 2000). Possui um complexo pedigree formado por sete diferentes espécies selvagens de *Vitis* (*V. aestivalis*, *V. berlandieri*, *V. cinerea*, *V. labrusca*, *V. lincedumii*, *V. riparia* e *V. rupestris*) e foram encontrados dois QTLs contra *P. viticola* (cromossomo 9 e 10) (FISCHER et al., 2004). Welter et al. (2007) além de identificar o loco *Rpv3* em Regent, também identificou um QTL de menor expressão no cromossomo 4 e Heerden et al. (2014) identificou um QTL no cromossomo 1 na mesma variedade. Marguerit et al. (2009) num cruzamento entre Cabernet Sauvignon (*V. vinifera*) e Gloire de Montpellier (*V. riparia*) identificou dois locos de resistência um no cromossomo 9 e outro no cromossomo 12. Sendo assim, a progênie 2000-305-122, utilizada neste trabalho possui a variedade Regent como um dos parentais, podendo desta forma, conter QTLs de menor efeito em seu genoma apresentando uma resposta fenotípica contra *P. viticola*.

Relacionados com o parental Gf.Ga 52-42: Bellin et al. (2009) avaliando indivíduos resultantes do cruzamento entre Chardonnay x Bianca encontrou QTLs de menor efeito contra *P. viticola*. Em Bianca foi identificado um QTL no cromossomo 7 e em Chardonnay identificou um possível QTL de resistência no cromossomo 5. O parental da variedade Bianca é Villard Blanc que possui em seu genoma cinco diferentes espécies de *Vitis*, (*V. aestivalis*, *V. berlandieri*, *V. cinerea*, *V. lincedumii* e *V. rupestris*). A variedade Villard Blanc é um dos parentais de Gf.Ga 52-42 podendo, desta forma, conter também o mesmo QTL no cromossomo 7. Moreira et al. (2011) reportou QTLs nos cromossomo 7, 8, 12 e 17 em *V. riparia* e também encontrou um QTL no cromossomo 7 em *M. rotundifolia*.

Além dos locos de resistência *Rpv1* e *Rpv3* avaliados nas 24 plantas outros locos de menor efeito de Regent, *M. rotundifolia*, *V. riparia* e Villard Blanc, entre outros, que até o momento não foram estudados podem estar presentes no genótipo da progênie avaliada, interferindo, desta forma, na avaliação fenotípica ao patógeno. Apenas os locos

provenientes da espécie *V. amurensis* não estão presentes no pedigree da progênie avaliada.

**Tabela 2.** Locos de resistência encontrados em espécies selvagens de *Vitis*.

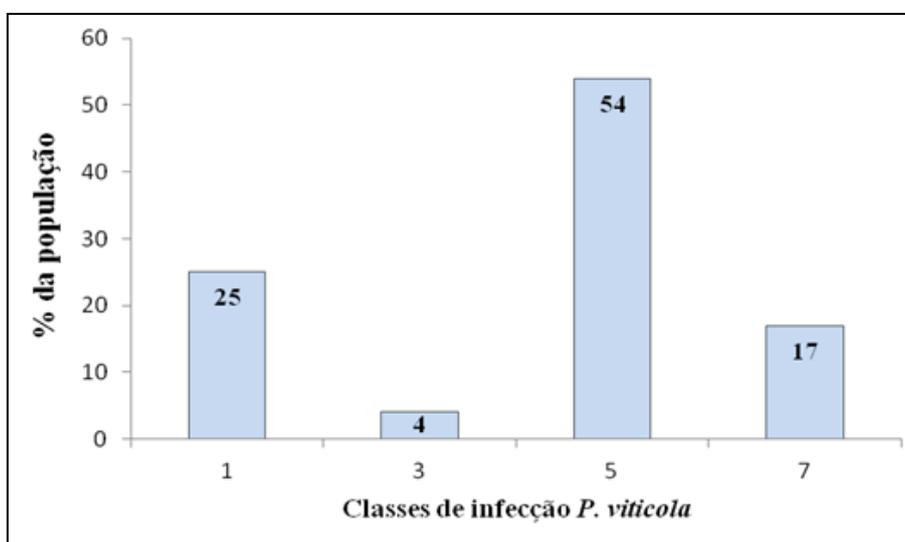
LOCOS	CROMOSSOMO	ESPÉCIE/VARIEDADE	AUTOR
<i>QTL</i>	9	Regent	Fischer et al. (2004)
<i>QTL</i>	10	Regent	Fischer et al. (2004)
<b><i>Rpv 1</i></b>	12	<i>M. rotundifolia</i>	Wiedemann-Merdinoglu et al. (2006)
<b><i>Rpv 2</i></b>	18	<i>M. rotundifolia</i>	Wiedemann-Merdinoglu et al. (2006)
<b><i>Rpv 3</i></b>	18	Regent e Villard blanc	Welter et al. (2007)
<i>QTL</i>	4	Regent	Welter et al. (2007)
<i>QTL</i>	9	<i>V. riparia</i>	Marguerit et al. (2009)
<i>QTL</i>	12	<i>V. riparia</i>	Marguerit et al. (2009)
<i>QTL</i>	7	Bianca	Bellin et al. (2009)
<i>QTL</i>	5	Chardonnay	Bellin et al. (2009)
<i>QTL</i>	7	<i>V. riparia</i>	Moreira et al. (2011)
<i>QTL</i>	8	<i>V. riparia</i>	Moreira et al. (2011)
<i>QTL</i>	12	<i>V. riparia</i>	Moreira et al. (2011)
<i>QTL</i>	17	<i>V. riparia</i>	Moreira et al. (2011)
<i>QTL</i>	7	<i>M. rotundifolia</i>	Moreira et al. (2011)
<i>QTL</i>	1	<i>V. amurensis</i>	Moreira et al. (2011)
<b><i>Rpv 8</i></b>	14	<i>V. amurensis</i>	Blasi et al. (2011)
<b><i>Rpv 10</i></b>	9	<i>V. amurensis</i>	Schwander et al. (2012)
<i>QTL</i>	5	<i>V. amurensis</i>	Schwander et al. (2012)
<b><i>Rpv 12</i></b>	14	<i>V. amurensis</i>	Venuti et al. (2013)
<i>QTL</i>	1	Regent	Heerden et al. (2014)

Com esse amplo espectro de QTLs de menor expressão que podem estar presentes nas 24 plantas avaliadas, pode haver uma variância na resistência fenotípica ao fungo, mesmo em plantas com o mesmo genótipo quanto aos locos *Rpv1* + *Rpv3*, *Rpv3*, *Rpv1* e ausência de ambos.

Sánchez Mora (2014) avaliando duas populações segregando para os alelos de resistência *Rpv1* e *Rpv3*, observou que plantas do mesmo genótipo apresentaram variabilidade na resposta ao patógeno. Esta variação pode ser devida parcialmente à metodologia empregada e em parte estar sendo influenciada pelos diferentes background genéticos em que se encontram os locos contendo os alelos de resistência. O autor ainda relata ser possível a presença de alguns QTLs de menor efeito, ou mesmo outras sequências codantes que estejam segregando nas populações estudadas e que também

participam da reação da planta ao patógeno, podendo desta forma, as plantas conter os mesmos locos de resistência e ter distintos graus de resposta ao fungo.

A avaliação do nível de resistência ao míldio com quatro classes conforme a intensidade de esporangióforos é apresentada na Figura 3. 25% das plantas da população registraram uma baixa incidência de infecção, correspondente a classe 1, representada na maioria pelas plantas que carregam os alelos *Rpv1* e *Rpv3* combinados. Na classe 3 encontrou-se 4% das plantas. Na classe 5 foram enquadradas o maior número de plantas correspondendo a 54% da população e a classe 7 foi representada por 17% das plantas, sendo todas suscetíveis, não apresentando nenhum dos alelos de resistência.



**Figura 3.** Distribuição de frequência (%) para classes de infecção de *P. viticola* em uma população de 24 indivíduos resultantes do cruzamento entre '2000-305-122' e 'Gf.Ga 52-42', classificadas em quatro classes, conforme a intensidade de esporangióforos (1: zero a cinco; 3: cinco a vinte; 5: vinte a cinquenta; 7: mais que cinquenta).

Os resultados apresentados na presente investigação estão de acordo com os obtidos por Eibach et al. (2007), que avaliando genótipos provenientes do cruzamento entre 'VHR-3082-1-42' e 'Regent', observou que as plantas contendo apenas um dos locos de resistência (*Rpv1* ou *Rpv3*) apresentaram resistência intermediária ao patógeno, enquanto que, quando estes locos estavam combinados, as plantas apresentaram resistência completa a doença. Assim também, Venuti et al. (2013) avaliando a introgressão de genes de resistência de *V. amurensis* para *V. vinifera*, encontraram que a combinação dos alelos de resistência *Rpv12* e *Rpv3* dificultaram o crescimento de *P. viticola* em comparação com as

plantas que carregavam apenas um dos alelos. Schwander et al. (2012) menciona que o efeito observado no nível de resistência ao míldio dos alelos *Rpv3* e *Rpv10* prova que estes são adequados para uso na piramidação de resistência. Similarmente, Sing et al. (2001) avaliando a combinação dos genes de resistência *xa5*, *xa13* e *xa21* em arroz contra *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* concluiu que estes em combinação são mais efetivos que quando isolados.

## Conclusões

O presente estudo demonstra que a MAS foi eficiente na piramidação dos genes de resistência ao míldio da videira *Rpv1* e *Rpv3*. Os dois genes de resistência apresentaram efeito aditivo, pois quando combinados conferiram maior resistência ao patógeno. O estudo disponibilizou materiais genéticos de grande utilidade no melhoramento da videira, que serão utilizados em novos ciclos de cruzamentos a fim de desenvolver novas variedades de videira resistentes ao míldio para mercado o brasileiro.

## Referências

ANONYMOUS. Descriptive list of varieties-Grapes. Federal Office of Plant Varieties (ed). Landbuch Verlag, Hannover, 2000.

ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E.G. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. **Fitopatologia Brasileira** **30**: 333-342, 2005.

BELLIN, D.; PERESSOTTI, E.; MERDINOGLU, D.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; ADAM-BLONDON, A.F.; CIPRIANI, G.; MORGANTE, M.; TESTOLIN, R.; DI GASPERO, G. 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** **120**: 163–176, 2009.

BLASI, P.; BLANC, S.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; PRADO, E.; RÜHL, E.H.; MESTRE, P.; · MERDINOGLU, D. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of *Rpv8*, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. **Theoretical and Applied Genetics** **123**: 43–53, 2011.

CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Volume Especial, E. 144-149, 2011.

CZERMAINSKI A. B. C.; SÔNEGO O. R. Influência das condições climáticas sobre a eficácia de fungicidas empregados para o controle do míldio em *Vitis vinifera*. **Ciência Rural** **34(1)**: 5-11, 2004.

DAI, G. H.; ANDARY, C.; MONDOLOT-COSSON, L.; BOUBALS, D. Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **46**: 177-188, 1995.

DI GASPERO, G.; CIPRIANI, G. Resistance gene analogs are candidate markers for disease-resistance genes in grape (*Vitis* spp.). **Theoretical and Applied Genetics** **106**: 163–172, 2002.

EIBACH, R.; ZYPRIAN, E.; WELTER, L. J.; TÖPFER, R. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. **Vitis** **46**: 120-124, 2007.

FISCHER, B. M.; SALAKHUTDINOV, I.; AKKURT, M. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. **Theoretical and Applied Genetics** **108**: 501–515, 2004.

GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R. Míldio da Videira. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas** **2(11)**: 22-23, 2002.

GENTA, W.; TESSMANN D. J.; ROBERTO S. R.; BATISTA VIDA, J.; COLOMBO, L. A.; SCAPIN, C. R.; RICCE, W. S.; CLOVIS, L. R. Manejo de míldio no cultivo protegido de videira de mesa 'BRS Clara'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **45**: 1388-1395, 2010.

HEERDEN, C. J.; BURGER, P.; VERMEULEN, A.; PRINS, R. Detection of downy and powdery mildew resistance QTL in a 'Regent' 3 'RedGlobe' population. **Euphytica** **200**: 281-295, 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?t=2&z=t&o=26&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1>>. Acesso em: 18 junho 2015.

LIU, S. M.; SYKES, S. R.; CLINGELEFFER, P. R. A method using leafed single-node cuttings to evaluate downy mildew resistance in grapevine. **Vitis** **42**: 173-180, 2003.

MARGUERIT, E.; BOURY, C.; MANICKI, A.; DONNART, M.; BUTTERLIN, G.; NE MORIN, A.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; MERDINOGLU, D.; OLLAT, N.; DECROOCQ, S. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. **Theoretical and Applied Genetics** **118**: 1261-1278, 2009.

MOREIRA, F. M.; MADINI A.; MARINO, R.; ZULINI, L.; STEFANINI, M.; VELASCO, R.; KOZMA, P.; GRANDO, M. S. Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (*Vitis spp.*) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. **Tree Genet Genomes** **7**: 153-167, 2011.

NAVES, R. L.; TESSMANN, D. J.; GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, R. O. **Sistema de produção de uva de mesa no Norte do Paraná: doenças e seu controle**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. (Embrapa Uva e Vinho. Sistemas de produção,

10).Disponível em:<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/MesaNorteParana/doencas.htm>>. Acesso em: 20 junho 2015.

NELSON, R.R. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. **Annual Review of Phytopathology** **16**: 359-378, 1978.

PEREIRA, V. F.; VILELA DE RESENDE, M. L.; ANDRADE MONTEIRO, A. C.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; ALBUQUERQUE REGINA M.; LOPES MEDEIROS, F. C. Produtos alternativos na proteção da videira contra o míldio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília** **45**: 25-31, 2010.

SÁNCHEZ MORA, F. D.; **Seleção assistida por marcadores moleculares na piramidação de genes de resistência ao míldio (*Plasmopara viticola*) e oídio (*Erysiphe necator*) em videira**. Santa Catarina: UFSC, 2014. 81p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2014.

SCHNEE, S.; VIRET, O.; GINDRO, K. Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **72**: 128-133, 2008.

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.

SINGH, S.; SIDHU, J. S.; HUANG, N.; VIKAL, Y.; BRAR, Z. L. D. S.; DHALIWAL, H. S.; KHUSH, G. S. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106 . **Theoretical and Applied Genetics** **102**: 1011-1015, 2001.

TAR'AN, B.; BUCHWALDT, L.; TULLU, A.; BANNIZA, S.; WARKENTIN, T.D.; VANDENBERG, A. Using molecular markers to pyramid genes for resistance to ascochyta blight and anthracnose in lentil (*Lens culinaris* Medik). **Euphytica** **134**: 223-230, 2003.

TERRAL, J.F.; TABARD, E.; BOUBY, L.; IVORRA, S.; PASTOR, T.; FIGUEIRAL, I.; PICQ, S.; CHEVANCE, J.B.; JUNG, C.; FABRE, L.; TARDY, C.; COMPAN, M.; BACILIERI, R.; LACOMBE, T.; THIS, P. 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** **105**: 443-455, 2010.

UVIBRA - União Brasileira de Vitivinicultura. Disponível em: <[http://www.uvibra.com.br/pdf/comercializacao2009a2014\\_dez.pdf](http://www.uvibra.com.br/pdf/comercializacao2009a2014_dez.pdf)>. Acesso em: 25 de junho 2015.

VENUTI, S.; COPETTI, D.; FORIA, S.; FALGINELLA, L.; HOFFMANN, S.; BELLIN, D.; CINDRIC, P.; KOZMA, P.; SCALABRIN, S.; MORGANTE, M.; TESTOLIN, R.; DI GASPERO, G Historical Introgression of the Downy Mildew Resistance Gene *Rpv12* from the Asian Species *Vitis amurensis* into Grapevine Varieties. **PLoS ONE** **8(4)**: e61228. doi:10.1371/journal.pone.0061228, 2013.

WELTER, L. J.; GÖKTÜRK-BAYDARM, N.; AKKURT, M.; MAUL, E.; EIBACH, R.; TÖPFER, R.; ZYPRIAN, E. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). **Molecular Breeding** **20**: 359-374, 2007.

WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; PRADO, E.; COSTE, P.; DUMAS, V.; BUTTERLIN, G.; BOUQUET, A.; MERDINOGLU, D. Genetic Analysis of Resistance to Downy Mildew from *Muscadinia rotundifolia*. **9th Int.Conf. Grape Genet. Breed.** Udine, Italy, 2006.