

Co-cultivo in vitro pode discriminar severidade de podridões do tronco em genótipos de videira



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Uva e Vinho
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
20**

**Co-cultivo in vitro pode discriminar severidade
de podridões do tronco em genótipos de videira**

Fábio Rossi Cavalcanti

**Embrapa Uva e Vinho
Bento Gonçalves, RS
2021**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Uva e Vinho
Rua Livramento, 515 - Caixa Postal 130
95701-008 Bento Gonçalves, RS
Fone: (0xx) 54 3455-8000
Fax: (0xx) 54 3451-2792
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Uva e Vinho

Presidente
Adeliano Cargnin

Secretário-Executivo
Edgardo Aquiles Prado Perez

Membros
João Henrique Ribeiro Figueredo, Jorge Tonietto, Klecius Ellera Gomes, Luciana Mendonça Prado, Nubia Poliana Vargas Gerhardt, Rochelle Martins Alvorcem, Viviane Maria Zanella Bello Fialho

Supervisão editorial
Klecius Ellera Gomes

Revisão de texto
Edgardo Aquiles Prado Perez

Normalização bibliográfica
Rochelle Martins Alvorcem CRB10/1810

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Edição eletrônica
Cristiane Turchet
Edgardo Aquiles Prado Perez

Foto da capa
Fábio Ribeiro dos Santos

1ª edição
Publicação digitalizada (2021)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Uva e Vinho

Co-cultivo in vitro pode discriminar severidade de podridões do tronco em genótipos de videira / por Fábio Rossi Cavalcanti. – Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2021.
36 p. : il. color. -- (Embrapa Uva e Vinho. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento online, 20).

ISSN 1981-1004

1. Cultura de tecidos. 2. Fenotipagem. 3. Micropropagação. 4. Patogenicidade. 5. Biotecnologia. 6. Grapevine trunk diseases (GTD). I. Cavalcanti, Fábio Rossi. II. Embrapa Uva e Vinho. III. Série.

CDD 634.82 (21 ed.)

© Embrapa, 2021

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Metodologia	11
Resultados e discussão.....	19
Conclusões.....	32
Referências	32

Co-cultivo in vitro pode discriminar severidade de podridões do tronco em genótipos de videira

Fábio Rossi Cavalcanti¹

Resumo – Técnica rápida para monitoramento da interação entre genótipos de videira e fungos causadores de podridões de tronco, por avaliação visual. Baseia-se em uma metodologia que possibilita a colocação dentro de um mesmo espaço físico (tubo de ensaio) uma plântula de videira micropropagada e um disco contendo micélio do patógeno desafiador. Este co-cultivo binário (apenas dois organismos: a planta e o fungo), in vitro, permite que seja estabelecido o processo biológico de doença nas condições de incubação propostas. Esta técnica traz vantagens para suporte à prospecção preliminar por variedades resistentes a doenças do tronco: a) facilidade para realização de testes em grandes lotes; b) fácil inoculação; c) ensaios extremamente rápidos; d) fácil observação de sintomas; e) fácil e precisa quantificação de sintomas; f) baixo custo; g) uso reduzido de repetições e espaço físico, dentre outras. Adicionalmente, a técnica permite a obtenção facilitada de amostras biológicas para estudos envolvendo Química e Metabolômica dos instantes iniciais das interações planta-patógeno em doenças de tronco da videira.

Termos para indexação: cultura de tecidos, fenotipagem, micropropagação, patogenicidade, biotecnologia, grapevine trunk diseases (GTD).

¹ Fábio Rossi Cavalcanti, engenheiro agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS.

In vitro co-cultivation can discriminate severity of trunk diseases in grapevine genotypes

Abstract – This bulletin suggests an in vitro approach for monitoring the interaction between grapevine genotypes and trunk pathogens by visual evaluation. The methodology enables to join a micropropagated grapevine plantlet and a mycelial disc of the challenging pathogen within a single tissue culture tube. This binary co-cultivation (the plantlet and the fungus) forces the biological process of the trunk disease to run under the standardized incubation conditions. This technique has advantages to preliminary prospecting for varieties resistant to grapevine trunk diseases (GTD): a) ease of carrying out tests in large batches; b) easy inoculation; c) fast experimental assays; d) accurate quantification of symptoms; e) low cost; f) reduced use of repetitions and physical space, among others. Additionally, the technique allows the rapid obtaining of biological samples for Chemistry and Metabolomics of the early plant-pathogen interactions regarding GTD.

Index terms: Tissue culture, plant phenotyping, plant micropropagation, pathogenicity, biotechnology, grapevine trunk diseases (GTD).

Introdução

A busca por resistência em variedades de videira contra doenças do tronco (*Grapevine Trunk Diseases* - GTD) em raízes, base da planta e parte aérea, representa um dos maiores objetivos atuais dos programas de melhoramento vegetal no mundo todo. Isso porque, além de medidas de exclusão e evasão para evitar a disseminação de patógenos de tronco da videira (ex. produção de mudas certificadas), o controle genético se apresenta como uma das principais medidas para garantia do controle de doenças, em regiões de alta incidência (Bergamin Filho et al., 2016; Grohs et al., 2016). No entanto, é comum que, em espécies perenes como a videira, o melhoramento vegetal dirigido à resistência se dê de uma forma lenta, já que envolve manipulação e cruzamentos de parentais que estejam devidamente caracterizados pelos melhoristas como candidatos promissores (Bergamin Filho et al., 2016; Gramaje et al., 2018).

Em geral, o ensaio com mudas, em casa de vegetação, é usado para levantamentos fenotípicos visando à busca por resistência genética da videira a podridões do tronco (revisado por Pouzoulet et al., 2014). Novos materiais provenientes de cruzamentos e métodos de melhoramento vegetal são fornecidos por meio de sementes, estacas enraizadas (ou não) ou obtidos de plantas micropropagadas. Essas populações são, então, submetidas a triagens baseadas em ensaios controlados em casa de vegetação ou câmaras de crescimento. Seguem-se etapas de inoculação de patógenos e monitoramento do progresso das lesões internas, geralmente limítrofes ao ponto de inoculação, para quantificação de taxas de infecção e de outros parâmetros descritivos de sensibilidade no tecido hospedeiro (Alaniz et al., 2008; Travadon et al., 2013; Billones-Baaijens et al., 2014). No entanto, tais *screenings* por resistência genética podem durar entre 10 a 36 meses para gerar informações úteis para o direcionamento de programas de melhoramento.

Alguns fatores também cooperam para que os programas de melhoramento progridam em uma velocidade relativamente lenta: i) o material candidato deve possuir todas as características agrônômicas desejáveis, não apenas relacionadas à resistência contra doenças; ii) problemas envolvendo cruzamentos podem aparecer, como poliploidia, incompatibilidade de pólen e dificuldades na regeneração de novos *seedlings*; iii) além disso, altas taxas

de heterozigose no germoplasma requerem a avaliação de um grande número de populações de *seedlings* (Sattler et al., 2016).

Recentemente, no entanto, técnicas rápidas para caracterização de genótipos de videira com indicativos (e marcadores) promissores de resistência/tolerância têm sido tentadas a fim de agilizar levantamento de informações valiosas a programas de melhoramento. Além do monitoramento da sintomatologia da interação planta-patógeno (IPP), tais técnicas permitem a obtenção de amostras para preparos analíticos envolvendo estudos de ultraestrutura e histologia da IPP, expressão de genes de defesa e caracterização metabólica (Alaniz et al., 2010; Pathrose et al., 2010; Reis et al., 2019).

Em geral, um programa de melhoramento da videira tem por objetivo selecionar características desejáveis associadas à qualidade agrônômica da planta e qualidade da uva para consumo e/ou processamento. Por exemplo, para a adaptação de espécies ao clima tropical, bancos de germoplasma incluem espécies de *Vitis* como *V. vinifera* e híbridos de *V. labrusca*, como também espécies mais tolerantes a estresses como *V. rupestris*, *V. riparia*, *V. aestivalis*, *V. caribaea*, *V. gigas*, *V. smalliana* e *V. schottleworthii*, e híbridos interespecíficos geralmente resultantes de cruzamentos entre espécies viníferas e espécies americanas. (Maia et al., 2015). Progenies derivadas de cruzamentos com esses materiais passam por estudos que evidenciam características associadas à resistência a doença (míldio e oídio), pragas (filoxera), taxa de fecundidade, compatibilidade de enxertia, vigor vegetativo, produtividade de cacho, conteúdo de açúcares, acidez e sabor (Camargo, 2008).

Com relação à busca por fontes de resistência de genótipos de videira para as podridões de tronco causadas por, por ex., *Cylindrocarpon destructans* (pé preto), *Phaeoaniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. (chocolate e doença de Petri) e fungos causadores de podridões descendentes, trabalhos envolvendo prospecção de bases de resistência vêm sendo incorporados a programas de melhoramento no mundo todo com mais intensidade a partir de meados dos anos 90 do século passado e a década seguinte, uma vez que o controle genético é uma solução óbvia para o controle de patógenos de solo, como aconteceu, por exemplo, com o controle da fusariose pela adoção do porta-enxerto 'Paulsen 1103' (Cavalcanti et al., 2013).

De fato, o uso de material com resistência de campo pode contribuir para a diminuição das perdas causadas por podridões. Na Espanha (Alaniz et al., 2010), diferentes níveis de resistência de variedades de videira foram observados contra *Cylindrocarpon liriodendri* e *C. macrodidymum*, em condições de casa-de-vegetação. De acordo com os resultados, tais patógenos induziram sintomas típicos do pé preto em todos os porta-enxertos estudados, mesmos com respostas contrastantes entre as variedades estudadas, no que tange à redução de massa de tecido radicular, descoloração e necrose (índice de doença). Com relação a potenciais fontes de resistência às podridões do tronco, um número significativo de estudos (revisados por Gramaje; Armengol, 2011) indica que os principais porta-enxertos e copas de videira são susceptíveis, a despeito de haver, em trabalhos envolvendo inoculação artificial de fungos causadores do chocolate e da doença de Petri, contrastes entre tais susceptibilidades, com destaque para o genótipo 161-49 Couderc e cruzamentos entre *V. riparia* x *V. berlandieri* (Gramaje et al., 2010). Em relatos de resistência ao pé-preto, são mencionados porta-enxertos *Vitis riparia* 039-16 e Freedom como fontes potenciais (Gubler et al., 2010; Gramaje et al., 2018).

Como acima comentado, em estações experimentais onde se realizam melhoramento genético, uma população de híbridos resultantes de cruzamentos entre progenitores geram novas cultivares de videira que podem ser indicadas para as mais diversas aplicações em vitivinicultura. Os indivíduos demonstrando respostas promissoras em variáveis agrônomicas ou de produtos são selecionados e transferidos para campos de validação, onde tais performances são avaliadas ao longo de três a quatro anos. Etapas mais avançadas no processo de seleção demandam novas triagens que podem durar de dois a três anos, já com o envolvimento de viveiristas e produtores (Maia et al., 2015). Ou seja, no processo de melhoramento, a identificação de genótipos com características desejáveis em termos de resistência a doença deve passar por etapas de avaliações em casa de vegetação e campo, antes que conclusões sejam tiradas e seleções sejam feitas (Alaniz et al., 2008; Travadon et al., 2013; Billones-Baaijens et al., 2014).

Ensaio envolvendo busca por resistência a patógenos de tronco da videira vêm sendo propostos a partir de metodologias de casa de vegetação trabalhosas e que, também, demandam dispêndio de tempo. Geralmente, esses ensaios de patogenicidade e avaliação de progresso de lesões

associadas envolvem plantio de mudas em substratos baseados em misturas de solo, turfa, vermiculita ou substratos artificiais. O material utilizado é fornecido seja a partir de propágulos que precisam enraizar (estacas), seja a partir de plântulas regeneradas por micropropagação *in vitro*, e aclimatizado. Ou seja, os tecidos-alvos do parasitismo, raízes e pé da planta, geralmente estão muito próximos ou em contato com um substrato heterogêneo e de difícil esterilização.

Paralelamente, há limitações relacionadas aos métodos de inoculação, que dependem da obtenção de tecidos destacados, ou a imposição de injúria mecânica, como inoculação do lenho da planta, a partir de punção lateral. Por exemplo, Pathrose et al. (2010) sugerem o uso de raízes recortadas de estacas enraizadas em substrato, previamente inseridas em tubos plásticos hermeticamente com água esterilizada, dentro de placas com meio de cultura, para servirem de tecido hospedeiro em estudos de parasitismo de fungo causadores de podridão do lenho. Outras técnicas de inoculação envolvem imersão de raízes obtidas do plantio de estacas em substratos de difícil esterilização em suspensões conidiais de fungos de podridão de raiz e pé de planta (Reis et al., 2019). No entanto, esse tipo de inoculação tem baixa eficiência, o que obriga que os ensaios possuam grande número de repetições, por causa de altos valores obtidos em resíduos e erros padrões conjugados com os geralmente baixos valores de graus de liberdade dos experimentos típicos de casa de vegetação com populações segregantes (Cochran; Cox, 1957).

Assim, a proposição de uma técnica rápida para seleção de genótipos de videira resistentes a patógenos de tronco, a partir de co-cultivo binário (planta/fungo) em condições *in vitro*, vem dar suporte à prospecção por genótipos que manifestem respostas gerais de resistência/tolerância a infecções causadas por patógenos do tronco da videira.

A metodologia aqui apresentada permite que o processo de doença seja acompanhado de um modo rápido, barato, prático e elucidativo. O co-cultivo patógeno-hospedeiro, na metodologia proposta, possibilita que um técnico possa monitorar o processo de parasitismo forçado a partir da adição de um disco micelial de um fungo virulento, em ambiente estéril e controlado. O intercâmbio de respostas provenientes da interação planta-patógeno (IPP) começa antes mesmo do contato micelial no pé da plântula cultivada em

tubo, sendo que o meio de cultura pode também revelar alterações ao longo do andamento do processo de parasitismo.

Pela metodologia preconizada, os ensaios podem ser feitos de um modo rápido (entre 10 a 40 dias para obtenção de evidências de tolerância/resistência) e prático (a metodologia requer uma adoção mínima de repetições), podendo ser realizada em bancadas e incubadoras de pequeno porte (com fotoperíodo adequado), sem a necessidade de muito espaço físico. A metodologia também permite uma abordagem simples para preparo de amostras e realização de ensaios analíticos adicionais de dosagem e caracterização molecular, principalmente para uso em sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) associados a detectores de massa.

Com o objetivo de evidenciar marcação fenotípica de genótipos susceptíveis e tolerantes com relação a patógenos associados a doenças de tronco da videira, foi proposto um método alternativo envolvendo co-cultivo in vitro de plantas e fungos, para avaliação de sinais/sintomas de podridões do tronco da videira, progresso de doença e, também, coleta de amostras provenientes do produto biológico das interações planta-patógeno (IPPs) para análises químicas e/ou moleculares.

Metodologia

Materiais vegetais e fúngicos e o co-cultivo binário in vitro

A obtenção de plântulas para os co-cultivos foi realizada por meio de micropropagação, no Laboratório de Propagação Vegetal (LAPRO) da Embrapa Uva e Vinho. Segmentos nodais com uma gema axilar e uma folha, de aproximadamente 01 cm de comprimento, excisados de plantas, foram cultivados em tubos de ensaio contendo 12 mL de meio “Galzy” (Murashige; Skoog, 1962) modificado, com 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ANA (ácido naftalenoacético), 2% de sacarose e 0,6% de ágar, pH 6,1, ajustado antes da autoclavagem a 1 atm e 121 °C por 20 minutos. As brotações regeneradas foram, então, propagadas in vitro em duplicatas, tubos de cultura (11,5 x 2,5 cm) com aproximadamente 5 mL de meio, e mantidas em câmara de crescimento a 23 ± 3 °C, sob fotoperíodo de 16 h com PPFD de 75 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após o

enraizamento (45 a 60 dias), plântulas foram repicadas para tubos com meio “Galzy”, sob as mesmas condições acima descritas.

Para os co-cultivos com plântulas em meio “Galzy”, dois isolados de quatro fungos causadores de podridões do tronco da videira (*Grapevine Trunk Diseases* - GTDs) foram selecionados de coleções do IFRS-Bento Gonçalves/RS e da Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial (CMIA) da Embrapa Uva e Vinho (*Fusarium*), totalizando oito linhagens:

- *Phaeomoniella chlamydospora* [TD70/2015 (NCBI: KY984090.1) e TD336/2015 (NCBI: KY984080.1)];
- *Ilyonectria* spp. [TD1110 (*I. macrodidyma*) e TD1117 (*I. liriodentri*)];
- *Neofusicoccum parvum* [TD100/2015 (NCBI: KY989973.1) e TD522/2015 (NCBI: KY989990.1)] e;
- *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis* [BRM004941 (NCBI: MG461601.1) e BRM004944 (NCBI: MG461602.1)].

No caso de *Ilyonectria* spp., embora houvesse sequências de fragmentos *Internal Transcribed Spacer* (ITS), identificação morfológica e confirmação por comparação de sequências (por ferramenta “BLAST” de alinhamento do *National Center for Biotechnology Information*, NCBI) para este patógeno, tais sequências não atingiram qualidade suficiente para serem depositadas no banco de dados do NCBI, o *Genbank*.

Para os experimentos de co-cultivo foram adotadas duas linhagens (isolados) por patógeno (acima listados), com maior e menor agressividade em termos do parasitismo intrínseco à doença. Essa abordagem buscou impor nos experimentos uma ampliação da representatividade para os atrasos de progresso de infecção porventura observados a partir do co-cultivo planta + disco micelial, conforme descrito a seguir.

Antes do sub-cultivo das linhagens no tubo contendo a plântula regenerada (co-cultivo), os fungos foram crescidos em meio BDA no escuro durante duas semanas, em incubadora regulada para 25 °C. Finalmente, discos desses cultivos (30 mm) foram, então, transferidos com pinça estéril para os tubos de cultura (11,5 x 2,5 cm) contendo meio “Galzy” e as plântulas enraizadas dos diferentes genótipos de videira a serem testados (Tabela 1), sendo dispostos a aproximadamente 20 mm de distância da plântula. Os tubos foram fechados

e lacrados com filme plástico e incubados a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h e PPFD de 75 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabela 1. Genótipos testados em cada ensaio experimental

Ensaio	(¹) Genótipos	(²) Informações sobre os cruzamentos
Ensaio 1	EV13-218	Híbridos com <i>Vitis caribeeae</i>
	548-12	Isabel (<i>Vitis labrusca</i>) x Magnólia (<i>Vitis rotundifolia</i>)
	P1103	<i>Vitis Berlandieri</i> X <i>Vitis rupestris</i>
	EV13-194	Híbridos com <i>Vitis caribeeae</i>
	IBBT481	Isabel (<i>Vitis labrusca</i>) x Bountiful (<i>Vitis rotundifolia</i>)
	548-57	Isabel (<i>Vitis labrusca</i>) x Magnólia (<i>Vitis rotundifolia</i>)
	548-15	Isabel (<i>Vitis labrusca</i>) x Magnólia (<i>Vitis rotundifolia</i>)
Ensaio 2	NC206-2	(⁴) <i>Vitis vinifera</i> x Magnólia (<i>Vitis rotundifolia</i>)
	SO4	<i>Vitis Berlandieri</i> X <i>Vitis riparia</i>
	1111-7	Seyve-Villard 18315 (híbrido de <i>V. labrusca</i>) x Magnólia (<i>V. rotundifolia</i>)
	1111-21	Seyve-Villard 18315 (híbrido de <i>V. labrusca</i>) x Magnólia (<i>V. rotundifolia</i>)
	1111-131	Seyve-Villard 18315 (híbrido de <i>V. labrusca</i>) x Magnólia (<i>V. rotundifolia</i>)
Ensaio 3	EV13-251	Híbridos com <i>Vitis caribeeae</i>
	BDMG-573	Bordô (<i>Vitis labrusca</i>) x Magnólia (<i>Vitis rotundifolia</i>)
	1111-14	Seyve-Villard 18315 (híbrido de <i>V. labrusca</i>) x Magnólia (<i>V. rotundifolia</i>)
	548-75	Isabel (<i>Vitis labrusca</i>) x Magnólia (<i>Vitis rotundifolia</i>)
	548-03	Isabel (<i>Vitis labrusca</i>) x Magnólia (<i>Vitis rotundifolia</i>)
	P1103(³)	<i>Vitis Berlandieri</i> X <i>Vitis rupestris</i>

(¹) Material vegetal multiplicado dentro do projeto “Prospecção e ajustes tecnológicos de porta-enxertos de videira para superação de estresses típicos de áreas de replantio no Sul do Brasil” (PE-VITISUL, SEG: 22.16.04.035.00.00), envolvendo cultivares comerciais (P1103, SO4), seleção introduzida dos EUA pela Embrapa (NC206) e seleções oriundas dos programas de melhoramento da Embrapa Uva e Vinho (cruzamentos 548, 1111), da Epagri (EV13) e da UFPR (IBBT, BDMG);

(²) Informações fornecidas por comunicação pessoal, (Dr. Henrique P. dos Santos, em 13/07/18 e 18/11/2020);

(³) Ensaio 3, co-cultivo de Paulsen (P1103) com *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis*;

(⁴) Cruzamento mais provável.

Esquema experimental e monitoramento da interação planta-patógeno (IPP)

Os experimentos baseados nesse método foram desenhados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial A x B, sendo o fator A os diferentes genótipos de videira candidatos à verificação de seu nível de resistência/tolerância a podridões do tronco, e o fator B, diferentes isolados (considerando a agressividade) de diferentes fungos causadores de podridões de tronco. As parcelas experimentais foram definidas como um tubo com uma plântula por repetição, estabelecendo-se três repetições por tratamento. Os controles utilizados foram: testemunha absoluta (plantas com o meio “Galzy”) e controle negativo (*mock-inoculated*, adicionados apenas com disco de BDA estéril, por tubo).

Os experimentos de co-cultivo foram conduzidos na sala climatizada do Laboratório de Interação Planta-Patógeno (LIPP) da Embrapa Uva e Vinho, ajustada para 25 ± 3 °C e separados em três ensaios diferentes (Tabela 1).

As respostas do início da IPP, a partir da inoculação com a introdução com o disco micelial (BDA) com ou sem o fungo, e o progresso das podridões (com evolução de lesões e sinais do patógeno), foram monitoradas a cada seis horas e, depois de dois ou três dias, diariamente. Nos ensaios 1, 2 e 3 (Tabela 1), o progresso da doença, até um índice máximo medido após a completa destruição do tecido da plântula modelo, cobriu entre 20-30 dias (para *N. parvum*, *Ilyonectria* e *Fusarium*) e 80 dias, no caso de *P. chlamydospora*.

Avaliação dos sinais e sintomas do parasitismo, em co-cultivo in vitro

Avaliação dos sinais do desenvolvimento fúngico

As avaliações dos sinais do crescimento do patógeno, internamente ao tubo de cultivo, na presença do hospedeiro regenerado (Tabela 1), foram feitas por obtenção de imagens digitais coloridas de cada repetição de cada tratamento, seguida pela quantificação das estruturas fúngicas por contagem de *pixels* da imagem classificada por meio do *freeware* NIH, *ImageJ* (versão 1.53a). A digitalização foi realizada seguindo o padrão: posicionamento do

tubo em pé, em fundo branco garantido por um arranjo apoiado em uma caixa de papelão forrada com folha de papel ofício em todas as faces. Distância do tubo até a câmera (20 cm). A captação das imagens para cada tubo de co-cultivo foi, assim, rigorosamente padronizada no tempo, observando-se a orientação e posicionamento dos tubos com relação à câmera e à distância focal.

Para a contagem de *pixels*, foram consideradas todas as alterações visíveis produzidas no fungo a partir da inserção do disco de BDA no tubo de co-cultivo, e a partir da IPP forçada no interior do tubo, em seção transversal. Ou seja: a) crescimento absoluto do talo micelial em qualquer lugar no interior do tubo; b) aparecimento ou não de estruturas reprodutivas (de dispersão ou sobrevivência) do patógeno, com ou sem mudanças de cores na região limítrofe à zona de colonização do fungo. Todas as contagens foram quantificadas por meio do *ImageJ*, a partir da marcação das áreas lesionadas da imagem pelo avaliador, em plano transversal. Todas as avaliações foram feitas por um único avaliador, previamente submetido a testes de validação de sua acurácia visual pelo *software* Rocket v1.0 (Ampese et al., 2017). Antes das considerações estatísticas em delineamento inteiramente casualizado (DIC), uma curva padrão foi gerada pelo avaliador, para conversão de *pixels* em cm^2 , a partir de um padrão de *grid* quadrangular, ou um quadrado padrão impresso, digitalizado no sistema de captação de imagens adotado, acima sugerido.

Após todas as avaliações, os dados foram analisados em termos de normalidade e de homocedasticidade, previamente à ANOVA e inferências de média ($P < 0,05$), conforme descrição no item 'Análises estatísticas e modelagem das curvas de progresso de IPP'.

Avaliação do progresso de lesões no tecido vegetal da plântula

Nos ensaios experimentais (1-3), obedecendo-se à periodicidade explicada em 'Esquema experimental e monitoramento da interação planta-patógeno (IPP)', foram monitorados o progresso (no tempo) e densidade de sintomas de podridões causados pelos patógenos estudados. As avaliações foram realizadas por inspeção visual por avaliador treinado e validado em eficiência visual pelo Rocket v1.0 (Ampese et al., 2017). Foram consideradas as alterações produzidas pela IPP forçada: a) mudança na cor da região limítrofe à zona de colonização do fungo; b) produção de lesões típicas

de podridão; c) necroses e tombamento etc, conforme uma escala gráfica especificamente desenvolvida e validada para o método proposto (Figura 1). Essa escala foi dividida em nove classes de doença mais o zero, cobrindo 0-100% de severidade. O avaliador utilizou as referências de níveis de severidade em cada classe da escala para atribuir as notas. Por fim, as notas de cada classe foram agrupadas, sumarizadas e submetidas à transformação angular $\omega = \arcsen(ID^{1/2})$ (Czermainski, 1999). Com ω , foram realizados testes de normalidade por Shapiro-Wilk, ANOVA, teste LSD (Fisher) e inferência por Tukey a 5% de probabilidade, conforme descrito em 'Análises estatísticas e modelagem das curvas de progresso de IPP' (Figura 2). Valores de Índice de Doença (ID%) foram definidos como a intensidade de doença (Czermainski, 1999). Áreas Abaixo da Curva de Progresso de Doença (AACPDs) foram calculadas de acordo com Campbell e Madden (1990).

Análises estatísticas e modelagem das curvas de progresso de IPP

Para as análises estatísticas, *scripts* R (R version 3.5.0 - The R Foundation, 2018) foram escritos especificamente para os dados levantados nos três ensaios experimentais da presente pesquisa, dentre eles, a AACPD e o Índice de Sensibilidade, $IS = [(AACPD \times r \times q) \times 10^4]$ (Figura 2). Valores de IS mais baixos (por patógeno testado) indicam ser o genótipo mais tolerante/resistente em co-cultivo in vitro, nas condições de incubação descritas na metodologia.

Com relação à modelagem do progresso de IPP para cada co-cultivo, considerando genótipo, fungo e linhagem de cada fungo trabalhada, foi ajustado um modelo (geralmente não linear) para representação do evento biológico específico (curvas de progresso de IPP), respeitando o delineamento experimental padrão, acima descrito. Para cada modelo não linear, foi extraída uma linearizada para efeito de cálculo da taxa de progresso das IPPs observadas experimentalmente. Os modelos adotados, bem como indicadores estatísticos, estão especificados na apresentação dos resultados (Tabelas 2, 3 e 4), para cada IPP. Para as taxas, foram considerados os *logitos*, $\ln[\omega_{(i)} \times (1 - \omega_{(i)})]$ e *gompitos*, $\{-\ln[-\ln(\omega_{(i)})]\}$. Estimadores dos parâmetros, ANOVA e demais estatísticas foram obtidos por auxílio de *software* estatístico comercial e do R, com *scripts* próprios.


```

dados <- read.table(file.choose(), header=TRUE, sep="\t", dec=",")
str(dados)
unique(dados$FAT2); dados
require(lattice)
xyplot(VARV~FAT2, groups=FAT1, data=dados, type=c("p", "smooth"))
xyplot(VARV~FAT2|FAT1, data=dados)
par(mfrow=c(1,2))
boxplot(VARV~FAT1, data=dados)
boxplot(VARV~FAT2, data=dados)
par(mfrow=c(1,1))
hist(dados$VARV)
plot(density(dados$VARV))
barras <- with(dados, tapply(VARV, FAT1, mean)); barras
bp <- barplot(barras, ylim=c(0,15))
text(bp, barras, label=round(barras, 1), pos=3)
title("Médias dos tratamentos")
box()
m0 <- aov(VARV~FAT1+FAT2+FAT1:FAT2, data=dados)
m0 <- aov(VARV~FAT1*FAT2, data=dados)
summary(m0)
class(dados$FAT1)
dados$FAT2 <- factor(dados$FAT2)
class(dados$FAT2)
m0 <- aov(VARV~FAT1*FAT2, data=dados)
summary(m0)
par(mfrow=c(2,2))
plot(m0)
layout(1)
par(mfrow=c(1,3))
qqnorm(dados$VARV); qqline(dados$VARV)
with(subset(dados, FAT2=="1"), { qqnorm(VARV); qqline(VARV) })
with(subset(dados, FAT2=="2"), { qqnorm(VARV); qqline(VARV) })
par(mfrow=c(1,1))
qqnorm(scale(dados$VARV), asp=1); qqline(scale(dados$VARV))
hist(scale(dados$VARV), freq=FALSE)
curve(dnorm(x), add=TRUE, col=2); lines(density(scale(dados$VARV)), col=3)
shapiro.test(residuals(m0))
bartlett.test(residuals(m0)~dados$FAT2)
df.residual(m0)
deviance(m0)
deviance(m0)/df.residual(m0) # quadrado médio do residuo (QMR)
require(agricolae)
Stud <- with(dados, LSD.test(VARV, FAT1,
                           group=FALSE,
                           DFerror=df.residual(m0),
                           MSerror=deviance(m0)/df.residual(m0)))
Stud
Tu <- with(dados, HSD.test(VARV, FAT1, DFerror=df.residual(m0), Error=deviance(m0)/df.residual(m0)); Tu
Tu <- with(dados, HSD.test(VARV, FAT2, DFerror=df.residual(m0), Error=deviance(m0)/df.residual(m0)); Tu

```

Figura 2. Script padrão em R composto para analisar os dados provenientes das IPPs de cada ensaio experimental de co-cultivo in vitro entre genótipos de videira e fungos causadores de podridões de tronco, fatorial $A_{(i)} \times B_{(j)}$, em DIC, três repetições por tratamento.

Nos poucos casos em que foram necessárias estimativas de parcelas perdidas, as mesmas foram calculadas pelas instruções: `(dados$ajus <- predict(m1, newdata=dados); with(dados, tapply(VARV, FAT1, mean, na.rm=TRUE)); with(dados, tapply(ajus, FAT1, mean), em ambiente R.`

Resultados e discussão

Pelo método de *screening* por resistência genética proposto, foi possível obter perfis diferenciados completos de progressos de interações planta-patógeno (IPP) em 20 a 30 dias, em genótipos de videira in vitro, mesmo em tenro estágio vegetativo. Paralelamente, foi possível acompanhar detalhadamente o desenvolvimento de lesões características (Figura 1) e a degradação de tecido em diferentes níveis de susceptibilidade, para cada fungo testado.

Para as podridões do tronco (*Grapevine Trunk Diseases* - GTD) o uso de variedades resistentes/tolerantes (R/T) de copa e porta-enxertos é considerada a estratégia mais barata, simples e efetiva para o controle da doença, em condições de vinhedo. Tais variedades não apenas reduziram as perdas com as podridões, como também demandariam menos ações curativas associadas ao controle dessas doenças (Bergamin Filho et al., 2016). Estudos (revisados por Gramaje et al., 2018) mostram que cultivares de videira possuem diferentes níveis de susceptibilidade a patógenos do tronco e, até o momento, não há identificação de resistência baseada em interação gene-a-gene promovendo um controle genético significativo para as podridões de tronco da videira. Apesar disso, um mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*) foi evidenciado e associado à condutividade hidráulica do xilema, e ao diâmetro de vasos. Os resultados do mesmo trabalho confirmaram que, na população de progênie estudada, a densidade de vasos de maior diâmetro esteve positivamente correlacionada com o nível de susceptibilidade a *P. chlamydospora* (Pouzoulet et al., 2019).

Até o momento, os programas de melhoramento de videira para seleção de genótipos R/T para as doenças de tronco convivem com escassez de informação e conhecimento de bases genéticas robustas para fontes de resistência genética. Paralelamente, custosos ensaios de fenotipagem, comumente adotados nos programas de seleção por resistência baseados em abordagens e metodologias convencionais de obtenção de mudas, inoculação artificial e melhoramento, não cooperam para acelerar a disponibilização de materiais que possam, de fato, direcionar um controle genético de doenças do tronco causadas por *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium*

spp., *Cylindrocarpon* spp e espécies de *Botryosphaeiaceae* (Gramaje et al., 2018; Reis et al., 2019).

A metodologia presentemente proposta envolve o hospedeiro cultivado in vitro, estabelecido por micropropagação vegetativa até a obtenção de células de raízes e parte aérea diferenciadas com tais tecidos estabelecidos, e células foliares com capacidade fotossintetizante. O sistema do hospedeiro, então, recebe um disco micelial com um isolado de um patógeno virulento de tronco da videira, e o processo de parasitismo pode se estabelecer a partir desse co-cultivo binário. Sinais e sintomas desse parasitismo são facilmente identificados a olho nú, bem como respostas contrastantes entre genótipos mais tolerantes e mais susceptíveis do hospedeiro (Figura 3).

A presente abordagem difere das técnicas de inoculação artificial e fenotipagem típicas de ensaios de seleção e busca por bases de resistência em genótipos de videira, até o presente momento (revisado por Gramaje et al., 2018). Tais inoculações são feitas em material (bacelos/varas) plantado para enraizamento, ou mesmo proveniente de cultura de tecidos, mas aclimatizado *ex vitro* e plantado em substrato similar ao solo (deixando as raízes invisíveis ao avaliador), em ambiente de casa de vegetação. As inoculações artificiais são usualmente feitas por punção caulinar, ou imposição de injúria lateral e exposição a suspensões conidiais, seja por injeção, pulverização ou contato com disco de ágar embebido na suspensão etc. Há metodologias baseadas em tecidos conduzidos em condições in vitro como, por exemplo, em Pathrose *et al.* (2010). No entanto, neste caso, raízes destacadas de varas enraizadas foram cultivadas em placas de Petri com meio BDA inoculado com o isolado virulento do patógeno de tronco. A turgidez do tecido radicular é mantida por imersão em um tubo com água, mas a imposição de injúria física foi incorporada ao método.

O co-cultivo in vitro aqui proposto não depende do uso de tecidos destacados (injuriados e estressados), usando base de células diferenciadas e em um regime de estresse controlado.

Ao cabo de três ensaios experimentais (Tabelas 2, 3 e 4), foram verificadas respostas discriminantes entre genótipos, dentro de co-cultivos específicos. No entanto, como esperado, foi rara uma manifestação de fenótipo de resistência e/ou tolerância completa. Alias, aqui é importante salientar o respeito que há que se ter pela inclusão dos dois conceitos de mecanismos fisiológicos

Fotos: Henrique D. D. Ziero e Aline M. Michel.

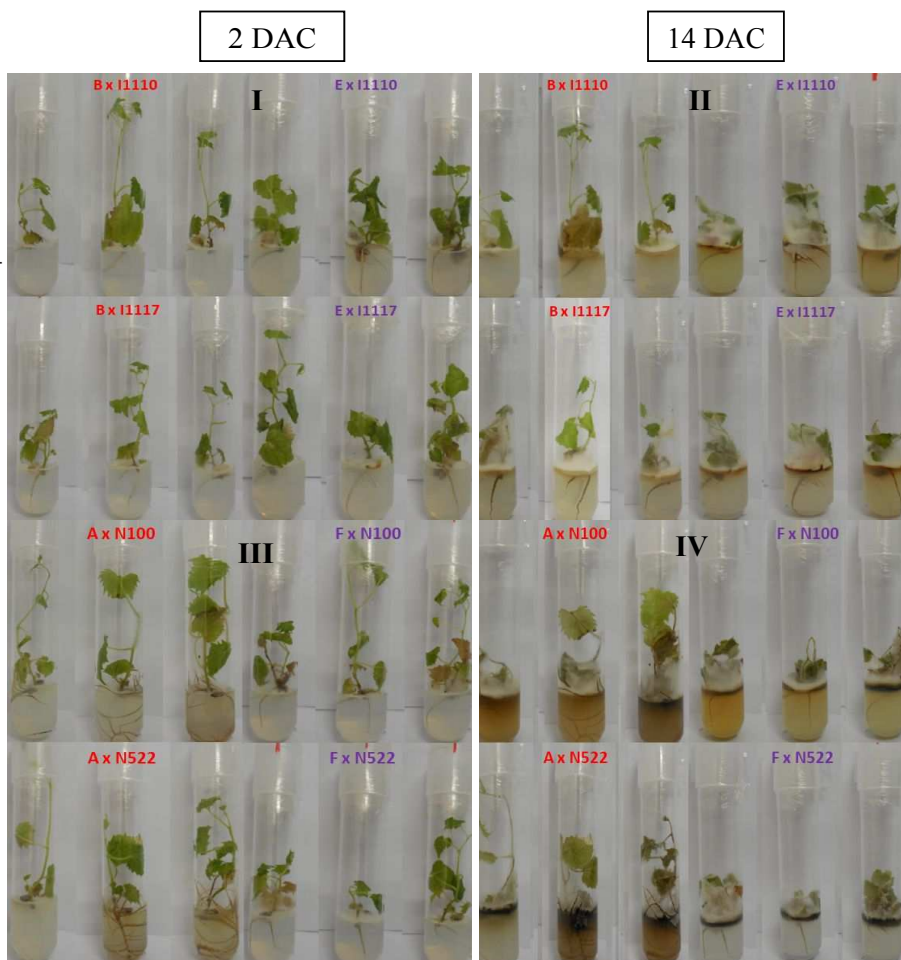


Figura 3. Aspectos visuais de dois co-cultivos envolvendo quatro genótipos [codificados como “B” (548-12), “E” (IBBT481), “A” (EV13-218) e “F” (548-57)] versus dois fungos (dois isolados por fungo) causadores de podridão do tronco da videira, (I) *Ilyonectria* sp., isolados TD1110 (I1110) e TD1117 (I1117), 2 dias após o co-cultivo (DAC); (II) *Ilyonectria* sp., isolados TD1110 (I1110) e TD1117 (I1117), 14 DAC; (III) *Neofusicoccum parvum*, isolados TD100 (N100) e TD522 (N522), 2 DAC; (IV) *Neofusicoccum parvum*, isolados TD100 (N100) e TD522 (N522), 14 DAC.

associados à defesa vegetal contra patógenos. Isso porque, de acordo com Lutts (1996), tanto o fenômeno de **resistência** associada a propriedades internas da planta que se opõem à aparição de lesões causadas por estresse (ou circundar o mecanismo de formação da lesão), quanto o da **tolerância** ou a capacidade da planta conviver com o agente estressor, caracterizariam um atraso no progresso da IPP forçada pela metodologia.

Considerando os três ensaios experimentais realizados, mesmo havendo indicações de discriminação apontadas pelas estatísticas associadas a diferentes IPPs, o que se refletiu em diferentes sintomatologias que alternaram entre **susceptível** e **altamente susceptível**, apenas três genótipos demonstraram um indicativo de R/T (Tabela 4, Figura 4).

Com os ensaios de co-cultivo in vitro, foi possível verificar, por avaliações visuais, diferentes progressos no desenvolvimento de lesões causadas pelo fungo adicionado ao ambiente *plântula*-estéril a partir da inserção de um disco micelial com a linhagem fúngica de trabalho, ao longo de 14-30 dias. Essas diferenças, perceptíveis visualmente e por abordagem estatística, foram, evidentemente, causadas por imposição fenotípica de expressão de R/T (Figura 4), considerando os diferentes níveis de agressividade entre os isolados do patógeno estudados, sobre os tecidos de um mesmo genótipo hospedeiro (Figura 5).

Outra importante observação foi a resposta em termos de **amarronzamento** no meio de cultivo (“Galzy”) e na superfície periférica dos tecidos da raiz e do colo da plântula. Por exemplo, nos estudos envolvendo *Neofusicoccum parvum*, foi possível evidenciar acúmulos de moléculas **marrons**, possivelmente compostos de natureza fenólica, no meio de co-cultivo. Essas deposições marcaram, na maioria das vezes, uma reação fenotípica de R/T (Figura 3, IV). Isso, quando comparados com genótipos sensíveis, pela metodologia proposta. Por exemplo, o genótipo EV13-218 respondeu com acúmulo de moléculas **marrons** associado ao atraso no progresso de formação de lesões quando inoculados com o *N. parvum*, independentemente de o isolado desafiador ser mais (TD522) ou menos (TD100) agressivo (Figura 3, IV e, com outros genótipos em teste, Figura 5, A e B; Figura 6). No entanto, por outro lado, também foi verificado que a deposição de moléculas **marrons** ou esteve associada à sensibilidade do genótipo ou evidente tanto em genótipos potencialmente sensíveis, como nos resistentes.

Tabela 2. Ensaio-1 (março-abril/2018) – revisto e consolidado (abril/2019): Sumário dos resultados do experimento-1 (março de 2018) para o co-cultivo genótipos de *Vitis* sp. versus patógenos do gênero *Neofusicoccum* sp. (TD100, TD522), *P. chlamydospora* (TD70, TD336), *Ilyonectria* spp. (TD110, TD117)

Função	Genótipo	Modelo ajuste PD (P < 0,05)				Taxa PD (P < 0,05)				Taxa de PS (q) – (P < 0,05)				Sintomatologia		
		AAACPD (adim.)	Taxa PD	P>Fc	r	F	P>Fc	R ²	q	F	P>Fc	R ²	IS			
<i>Neofusicoccum</i>	EV13-218	4,65 c	Gomperitz	332,45	0	0,90	0,285	217,8	2,2E-16	0,86	0,070	222,69	2,2E-16	0,86	927,7	Susceptível
	548-12	5,77 abc	Gomperitz	240,90	0	0,87	0,335	138,2	1,6E-13	0,80	0,050	102,70	8,3E-12	0,74	966,5	Susceptível
	P1103	6,91 a	Gomperitz	566,70	0	0,91	0,281	184,9	2,5E-15	0,84	0,092	92,25	2,5E-9	0,80	1786,4	Altam. Suscep.
	EV13-194	6,48 a	Gomperitz	380,55	0	0,91	0,394	211,2	3,3E-16	0,86	0,050	52,82	2,0E-8	0,60	1276,6	Altam. Suscep.
	IBBT481	4,84 bc	Gomperitz	294,14	0	0,90	0,290	291,4	0	0,89	0,121	55,42	1,9E-7	0,70	1698,4	Susceptível
	548-57	6,33 ab	Gomperitz	240,15	0	0,86	0,415	191,0	1,6E-15	0,84	0,112	83,23	6,2E-9	0,78	2942,2	Altam. Suscep.
	548-15	6,60 a	Gomperitz	317,82	0	0,88	0,392	183,9	2,8E-15	0,84	0,089	27,30	3,0E-6	0,53	2302,6	Altam. Suscep.
	EV13-218	24,5 a	Linear	56,96	1,0E-09	0,69	0,0131	-	-	-	0,0464	28,71	1,0E-05	0,488	148,9	Susceptível
	548-12	25,7 a	Linear	90,24	1,9E-09	0,79	0,0153	-	-	-	0,0486	86,13	1,6E-11	0,678	191,1	Susceptível
	P1103	34,9 a	Linear	432,11	0	0,95	0,0215	-	-	-	0,0623	136,01	1,9E-14	0,767	467,5	Altam. Suscep.
<i>P. chlamydospora</i> [®]	EV13-194	39,9 a	Linear	126,23	8,1E-11	0,84	0,0176	-	-	-	0,0461	111,38	3,9E-13	0,729	323,7	Susceptível
	IBBT481	26,6 a	Linear	50,85	2,9E-07	0,68	0,0132	-	-	-	0,0593	97,24	2,8E-12	0,701	208,2	Susceptível
	548-57	15,9 a	Linear	64,20	4,1E-08	0,72	0,0127	-	-	-	0,0538	127,51	5,2E-14	0,755	108,6	Susceptível
	548-15	24,6 a	Linear	77,36	8,1E-09	0,76	0,0135	-	-	-	0,0606	117,83	1,7E-13	0,740	201,3	Susceptível
	EV13-218	4,94 a	Gomperitz	298,41	0	0,89	0,285	128,6	4,2E-13	0,78	0,060	152,14	4,2E-14	0,81	844,7	Altam. Suscep.
	548-12	2,42 c	Gomperitz	101,35	8,1E-15	0,73	0,157	100,2	1,1E-11	0,74	0,039	70,12	8,9E-10	0,66	148,2	Susceptível
	P1103	3,44 bc	Gomperitz	76,10	4,3E-13	0,70	0,218	56,52	9,9E-9	0,61	0,059	136,47	1,8E-13	0,79	442,5	Susceptível
	EV13-194	2,41 c	Gomperitz	177,77	0	0,84	0,135	153,8	3,6E-14	0,81	0,064	163,97	1,5E-14	0,82	208,2	Susceptível
	IBBT481	4,39 ab	Gomperitz	315,45	0	0,91	0,279	263,1	0	0,88	0,065	147,31	6,6E-14	0,81	796,1	Susceptível
	548-57	3,96 ab	Gomperitz	142,21	1,1E-16	0,81	0,238	104,0	7,0E-12	0,75	0,052	29,70	4,5E-6	0,45	490,1	Susceptível
548-15	4,79 ab	Gomperitz	411,63	0	0,93	0,314	233,9	1,1E-16	0,87	0,063	126,25	5,4E-13	0,78	947,6	Altam. Suscep.	

(1) Foram utilizados dois isolados dos fungos desafiadores (patógeno) por genótipo de videira testado;
 (2) Área Abaixo da Curva de Progresso de doença (AAACPD) foi calculada a partir de dados de sete avaliações representativas de progresso de sinais e lesões, por pixelização, conversão em área lesionada (cm²) e percentual de severidade. Médias seguidas pelas mesmas letras não possuem diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey, a 5% de significância;
 (3) Taxa de progresso de doença (r) foi inferida a partir da derivada primeira sobre a linearizada do modelo ajustado sobre o fenômeno (P < 0,05);
 (4) Taxa de progresso de sinais (q) do patógeno presentes no co-cultivo foi inferida a partir da derivada primeira sobre a linearizada do modelo ajustado sobre o fenômeno (P < 0,05);
 (5) Índice de Sensibilidade – (IS): IS = [(AAACPD x r x q) x 10³]. Valores de IS mais baixos (por patógeno testado) indicam ser o genótipo mais tolerante/resistente, em co-cultivo in vitro, nas condições de incubação descritas na metodologia;
 (6) Para avaliação das lesões em co-cultivos envolvendo Pch do presente ensaio-1, foi utilizado o método de pixelização. Nos co-cultivos com Neof e Ilyo foi utilizado o método de escala gráfica + ID% (Czermski, 1999) para avaliação das lesões e montagem das CPDs.

Tabela 3. Ensaio-2 (junho-agosto/2018) – reviso e consolidado (abril/2019): Sumário dos resultados do experimento-2 (junho-agosto/2018) para o co-cultivo genótipos de *Vitis* sp. versus patógenos do gênero *Neofusicoccum* sp. (TD100, TD522), *P. chlamydospora* (TD70, TD336), *Ilyonectria* spp.(TD1110, TD1117) e *Fusarium* sp. (BRM004941, BRM004944)

Fungo	Genótipo	Modelo ajuste PD (P < 0,05)				Taxa PD (r) – (P < 0,05)				Taxa de PS (q) – (P < 0,05)				Sintomatologia		
		AAcPD (adim.)	c-Taxa PD	P>Fc	R ²	r	F	P>Fc	R ²	q	F	P>Fc	R ²			
<i>Neofusicoccum</i>	NC206-2	5,24 b	Gompertz	305,73	0	0,87	0,278	187,84	1,1E-16	0,82	0,054	87,03	1,4E-11	0,68	786,6	Susceptível
	SO4	8,10 a	Gompertz	183,39	0	0,78	0,421	148,81	4,7E-15	0,78	0,090	47,16	1,8E-7	0,61	3089,1	Altam. Suscep.
	1111-7	6,35 b	Gompertz	130,20	0	0,72	0,300	102,46	1,4E-12	0,71	0,077	59,20	2,2E-8	0,67	1466,9	Susceptível
	1111-21	8,81 a	Gompertz	283,98	0	0,85	0,433	211,27	0	0,84	0,103	58,42	1,2E-7	0,71	3929,2	Altam. Suscep.
<i>Neofusicoccum</i>	NC206-2	2,98 b	Logística	180,37	0	0,90	0,267	164,79	8,8E-16	0,80	0,044	84,40	2,1E-11	0,67	350,1	Susceptível
	SO4	3,32 b	Logística	468,11	0	0,96	0,368	228,37	0	0,85	0,047	141,78	1,0E-16	0,77	574,2	Susceptível
	1111-7	8,26 a	Logística	879,10	0	0,87	0,366	253,80	0	0,86	0,052	180,82	2,2E-16	0,81	1572,0	Altam. Suscep.
	1111-21	5,11 b	Logística	305,02	0	0,93	0,291	155,09	2,4E-15	0,79	0,046	55,77	4,2E-9	0,57	884,0	Susceptível
<i>P. chlamydospora</i>	NC206-2	6,28 a	Gompertz	334,32	0	0,92	0,148	441,51	0	0,91	0,055	124,15	7,8E-14	0,75	511,2	Susceptível
	SO4	6,99 a	Gompertz	413,68	0	0,94	0,201	407,28	0	0,91	0,056	348,49	0	0,89	786,8	Susceptível
	1111-7	7,59 a	Gompertz	291,88	0	0,90	0,154	206,67	0	0,83	0,052	69,12	3,0E-10	0,62	607,8	Susceptível
	1111-21	6,01 a	Gompertz	52,20	9,4E-12	0,64	0,211	48,79	2,0E-8	0,53	0,057	109,11	5,4E-13	0,73	722,8	Susceptível
<i>Fusarium</i>	NC206-2	6,29 b	Gompertz	187,60	0	0,85	0,191	198,02	0	0,83	0,035	112,18	3,6E-13	0,73	420,5	Susceptível
	SO4	8,66 a	Gompertz	392,02	0	0,92	0,275	96,18	3,4E-12	0,70	0,069	459,77	0	0,94	1643,2	Altam. Suscep.
	1111-7	9,11 a	Gompertz	178,07	0	0,84	0,228	161,57	1,2E-15	0,80	0,055	126,41	6,8E-12	0,81	1142,4	Altam. Suscep.
	1111-21	7,64 ab	Gompertz	723,19	0	0,96	0,216	511,34	0	0,93	0,048	233,94	4,0E-15	0,89	792,1	Susceptível

(1) Foram utilizados dois isolados dos fungos desafiadores (patógeno) por genótipo de videira testado.

(2) Área Abaixo da Curva de Progresso de doença (AACPD) foi calculada a partir de dados de oito avaliações representativas de progresso de sinais e lesões, por pixelização, conversão em área lesionada relativa (área lesionada/área total, em cm²). Médias seguidas pelas mesmas letras não possuem diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey, a 5% de significância.

(3) Taxa de progresso de doença (r) foi inferida a partir da derivada primeira sobre a linearizada do modelo ajustado sobre o fenômeno (P < 0,05).

(4) Taxa de progresso de sinais (q) do patógeno presentes no co-cultivo foi inferida a partir da derivada primeira sobre a linearizada do modelo ajustado sobre o fenômeno (P < 0,05).

(5) Índice de Sensibilidade – (IS); IS = [(AACPD x r x q) x 10³]. Valores de IS mais baixos (por patógeno testado) indicam ser o genótipo mais resistente/tolerante, em co-cultivo in vitro, nas condições de incubação descritas na metodologia.

Tabela 4. Ensaio-3 (out/2018-jan/2019): Sumário dos resultados do experimento-3 (out/2018-jan/2019) para o co-cultivo genótipos de *Vitis* sp. versus patógenos do gênero *Neofusicoccum* sp. (TD100, TD522), *P. chlamydospora* (TD70, TD336), *Ilyonectria* spp. (TD1110, TD1117) e *Fusarium* sp. (BRM004941, BRM004944)

Fungo	Genótipo	⁽¹⁾ AACPD (adim.)		Modelo ajuste PD (P < 0,05)				⁽⁵⁾ Taxa PD (r) - (P < 0,05)				⁽⁶⁾ Taxa de PS (q) - (P < 0,05)				Sintomatologia
		Modelo	F	P>Fc	R ²	r	F	P>Fc	R ²	q	F	P>Fc	R ²	P>Fc		
<i>Neofusicoccum</i>	1111-131	11,87b	104,70	E-15	0,69	0,140	28,76	E-5	0,55	0,053	42,72	E-6	0,64	880,8	Susceptível	
	13-251	14,81ab	248,00	0	0,85	0,174	67,21	E-8	0,74	0,052	50,48	E-7	0,68	1312,9	Susceptível	
	BDWG-573	19,92a	261,58	0	0,84	0,270	71,61	E-8	0,75	0,063	221,26	E-13	0,91	3388,4	Alt. Susceptível	
	1111-14	19,32a	375,31	0	0,88	0,216	58,70	E-7	0,72	0,060	75,39	E-8	0,76	2503,9	Alt. Susceptível	
	548-75	18,44ab	428,47	0	0,89	0,223	88,96	E-9	0,79	0,056	94,30	E-9	0,80	2302,8	Alt. Susceptível	
<i>P. chlamydospora</i>	548-03	16,01ab	215,29	0	0,86	0,232	59,88	E-7	0,72	0,062	87,32	E-9	0,79	2302,9	Alt. Susceptível	
	1111-131	7,90ab	107,62	E-15	0,76	0,144	31,25	E-5	0,56	0,025	51,60	E-7	0,69	284,4	Alt. Susceptível	
	13-251	5,21ab	41,24	E-9	0,61	0,143	17,79	E-4	0,42	0,024	44,22	E-6	0,65	176,8	Susceptível	
	BDWG-573	6,10ab	17,82	E-6	0,40	0,142	7,93	0,01	0,23	0,014	2,66	0,11	0,10	121,3	Susceptível	
	1111-14	11,68a	85,43	E-14	0,68	0,149	11,32	E-3	0,30	0,041	94,53	E-9	0,80	714,1	Alt. Susceptível	
<i>Ilyonectria</i>	548-75	5,36ab	105,43	E-15	0,84	0,145	20,80	E-4	0,46	0,016	14,45	E-5	0,40	124,4	Susceptível	
	548-03	2,53b	18,84	E-6	0,45	0,079	6,05	0,022	0,20	0,021	40,79	E-6	0,63	42,0	Indicação de RT	
	1111-131	11,15bc	194,26	0	0,84	0,174	53,35	E-7	0,70	0,046	35,60	E-6	0,60	892,4	Susceptível	
	13-251	8,69c	129,38	0	0,81	0,165	20,00	E-4	0,45	0,035	38,18	E-6	0,62	501,8	Indicação de RT	
	BDWG-573	14,75ab	679,12	E-16	0,95	0,195	146,49	E-11	0,86	0,040	35,34	E-6	0,60	1150,5	Susceptível	
<i>Fusarium</i>	1111-14	16,54a	421,88	0	0,90	0,187	52,63	E-7	0,69	0,040	34,24	E-6	0,59	1237,2	Susceptível	
	548-75	16,64a	301,96	0	0,89	0,253	83,25	E-9	0,78	0,050	30,93	E-5	0,56	2105,0	Alt. Susceptível	
	548-03	12,23abc	230,01	0	0,91	0,265	116,32	E-10	0,83	0,046	56,10	E-7	0,71	1490,8	Alt. Susceptível	
	1111-131	12,32ab	235,99	0	0,86	0,145	67,90	E-8	0,74	0,041	97,50	E-9	0,81	732,4	Susceptível	
	13-251	15,07a	315,35	0	0,89	0,193	40,12	E-6	0,63	0,048	50,83	E-7	0,68	1396,1	Alt. Susceptível	
<i>Fusarium</i>	BDWG-573	15,09a	288,97	0	0,89	0,244	51,36	E-7	0,69	0,055	173,87	E-12	0,88	2025,1	Alt. Susceptível	
	1111-14	12,73ab	312,73	0	0,91	0,189	45,36	E-7	0,66	0,051	136,46	E-11	0,85	1227,0	Susceptível	
	548-75	14,84ab	378,31	0	0,92	0,254	45,79	E-7	0,66	0,053	103,39	E-10	0,82	1997,8	Alt. Susceptível	
	548-03	13,28ab	81,10	E-13	0,67	0,178	20,09	E-4	0,45	0,049	36,40	E-6	0,61	1156,5	Susceptível	
	P1103*	9,13b	53,24	E-11	0,60	0,120	14,50	E-4	0,37	0,054	27,39	E-5	0,53	591,6	Indicação de RT	

(1) Foram utilizados dois isolados dos fungos desafiadores (patógeno) por genótipo de videira testado;

(2) Área Abaixo da Curva de Progresso de doença (AACPD) foi calculada a partir de dados de oito avaliações representativas de progresso de sinais e lesões, por pixelização, conversão em área lesionada relativa (área lesionada/área total, em cm²). Médias seguidas pelas mesmas letras não possuem diferenças significativas de acordo com Tukey, a 5% de significância;

(3) Taxa de progresso de doença (r) foi inferida a partir da derivada primeira sobre a linearizada do modelo ajustado sobre o fenômeno (P < 0,05);

(4) Taxa de progresso de sinais (q) do patógeno presentes no co-cultivo foi inferida a partir da derivada primeira sobre a linearizada do modelo ajustado sobre o fenômeno (P < 0,05);

(5) Índice de Sensibilidade - (IS): IS = [(AACPD x r x q) x 10⁴]. Valores de IS mais baixos (por patógeno testado) indicam ser o genótipo mais resistente, em co-cultivo in vitro, nas condições de incubação descritas na metodologia.

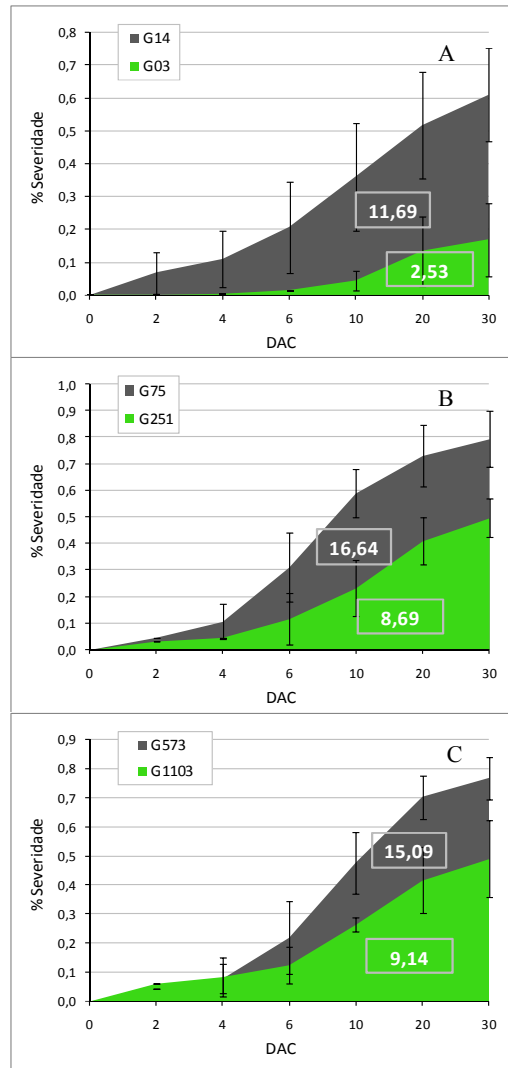


Figura 4. Progresso da interação planta-patógeno (IPP) e AACPD (adimensional, nos insetos) em co-cultivos in vitro contendo plântulas de genótipos de videira (*Vitis* sp.) que responderam com 'Indicação de R/T'. A) Isolados TD70 e TD336 de *P. chlamydospora* versus 548-03 (G03) e 1111-14 (G14); B) Isolados TD1110 e TD1117 de *Ilyonectria* spp. versus 13-251 (G251) e 548-75 (G75); e C) Isolados BRM004941 e BRM004944 de *Fusarium* sp. versus BDMG-573 (G573) e 'Paulsen 1103' (G1103). Barras verticais indicam desvio padrão considerando as médias das amostras **compostas** com o fator **Isolado**. Nas avaliações onde não há sobreposição de barras verticais, há diferença significativa ($P < 0.05$) de acordo com LSD-Fisher.

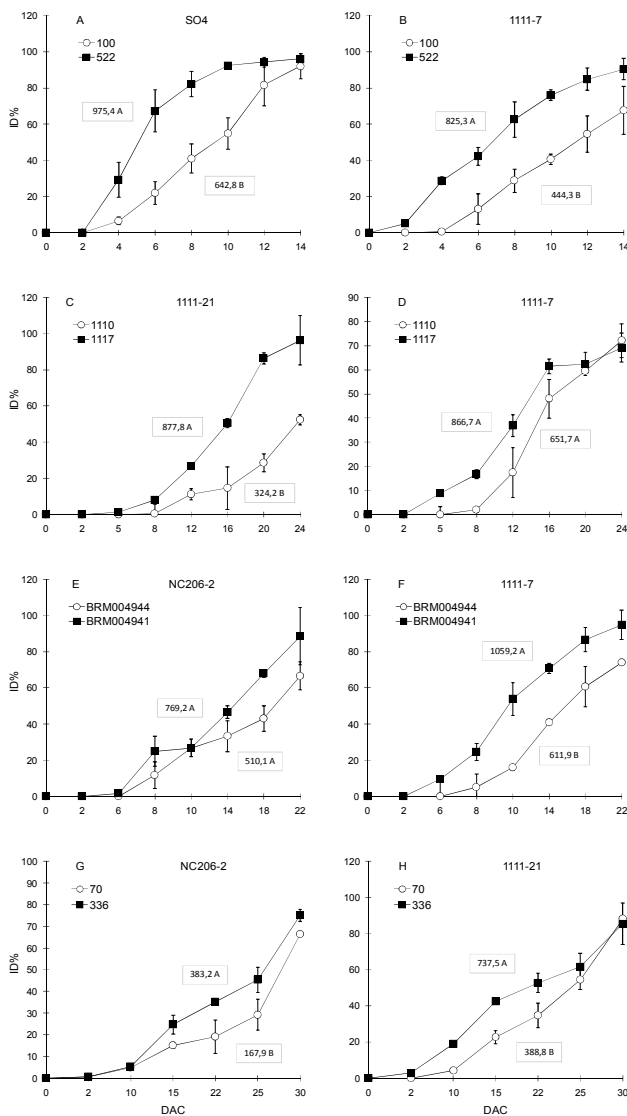


Figura 5. Curvas de Progresso de Doença (CPD) para (A e B) *N. parvum*, isolados TD100 (○-) e TD522 (■-) versus genótipos SO4 e 1111-7; (C e D) *Ilyonectria* spp., isolados TD1117 (○-) e TD1110 (■-) versus genótipos 1111-21 e 1111-7; (E e F) *Fusarium* sp., isolados BRM004941 (○-) e BRM004944 (■-) versus genótipos NC206-2 e 1111-7; (G) *P. chlamydospora*, isolados TD336 (○-) e TD70 (■-) versus genótipos NC206-2 e 1111-21. Diferentes padrões de CPD (e AACPDs, dentro dos insertos) em diferentes isolados co-cultivados, em condições in vitro. AACPDs com mesmas letras não diferem de acordo com LSD-Fisher, a 5% de significância.

Compostos fenólicos associados a respostas de **amarronzamento** em tecidos vegetais são diversas e compõem agrupamentos bastante diversificados que possuem uma função biológica essencial, como um traço adaptativo associado à evolução de organismos sésseis: a defesa química contra patógenos, herbívoros e insetos (Lattanzio et al., 2006). Tais moléculas são produtos intermediários de duas rotas bioquímicas principais dentro o metabolismo secundário vegetal: a rota do ácido chiquímico (AC) e a do acetato-malonato. A primeira abrange a produção de fenilpropanoides que são substratos para a biossíntese de flavonoides, chalconas, estilbenos, aldeídos e alcoois fenólicos monoméricos que podem se ligar formando polímeros de enrijecimento de parede celular, como a lignina. A rota do acetato-malonato pode reforçar a do AC produzindo flavonoides e taninos condensados, como pode participar da produção de polímeros de defesa estrutural constitutiva, como cutina, suberina, ceras e poliacetilenos (Cavalcanti et al., 2014; Bhatla, 2018). Essas substâncias podem se acumular em uma situação de reconhecimento compatível de uma interação planta-patógeno (IPP), podendo extravasar para o meio externo ao protoplasma vegetal (Bhattacharya et al., 2010).

Aliás, existe um evidente potencial de aplicação do co-cultivo binário *in vitro* como fonte de amostras para estudos de caracterização do perfil metabólico e de compostos polifenólicos envolvidos em IPPs associadas a podridões do tronco da videira, visando à elucidação de modelos bioquímicos de resistência e/ou tolerância a aos tipos específicos de parasitismo que caracterizam essas podridões.

De fato, estudos já evidenciaram o aumento da quantidade e na diversidade de polifenóis em IPPs envolvendo patógenos do tronco da videira. Por exemplo, Magnin-Robert et al. (2016) evidenciaram significativos aumentos de polifenóis em tecido lenhoso lesionado por fungos causadores da Esca, *P. chlamydospora*, *Phaeoacremonium* sp. e *Fomitiporia mediterranea* em processo de apoplexia e em tecidos assintomáticos, mas contaminados. Esses autores evidenciaram maiores valores de flavonoides foram observados em tecidos assintomáticos, mas contaminados com os patógenos do complexo de doença, enquanto estilbenos apareceram mais em tecidos assintomáticos. Moléculas fúngicas acumuladas puderam ser identificadas em resposta a casos de apoplexia em IPP, tais como policetídeos diversos, isômeros de meleína e hidroximeleína.

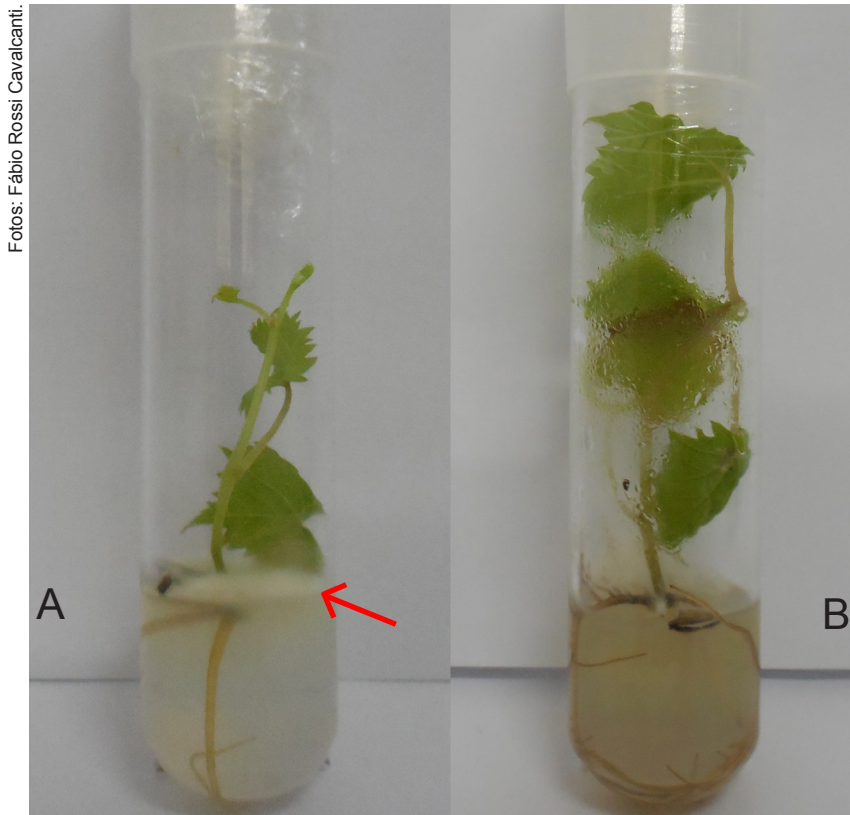


Figura 6. Detalhe de duas plântulas de videira co-cultivadas com a linhagem TD100/2015 de *N. parvum*, quatro (4) dias após co-cultivo (DAC). Genótipo 548-57 (A) e genótipo EV13-218 (B). Verifica-se onde há menor deposição de substância amarronzada/escura, o micélio cresce mais rápido (seta vermelha). A recíproca (em B) é verdadeira. Estatísticas (taxas q , AACPD e IS) para essa resposta estão apresentadas na Tabela 2.

Por outro lado, polifenóis também podem estar envolvidos em interações entre microrganismos e plantas na rizosfera, cooperando para um *pool* provável de compostos fenólicos que foram depositados no meio “Galzy”. Em fungos, polifenóis são mobilizados tanto por processos de simbiose mutualista (*Rhizobium*), seja por parasitismo. Essa região limítrofe à raiz perfaz um ecossistema dinâmico de interações entre microrganismos e a planta, e essas interações são, muitas vezes, governadas por exsudação de matrizes de polifenóis paralelamente a íons, água, radicais livres, mucilagem, enzimas etc (Bhattacharya et al., 2010).

Do ponto de vista do patógeno, intermediários metabólicos formadores do pigmento polifenólico **melanina** como a série de elementos di- e tri-hidroxi-naftalênicos e toxinas subprodutos, como a scitalona e isosclerona, podem participar de uma IPP compatível disparando o desenvolvimento de lesões associadas a um fenômeno de parasitismo. Para o fungo, a melanina serve como polímero de proteção e de robustez mecânica que, na maioria das IPPs, atua como base mecânica para a penetração de estruturas miceliais para dentro do tecido vegetal hospedeiro, bem como a supressão de suas respostas de defesa (Belozerskaya et al. 2017).

Com relação à evidência de genótipos com potencial de manifestar um fenótipo de R/T, um dos co-cultivos trabalhou com material avaliado e validado em condições de campo justamente associado ao agente causador do problema para o qual a variedade foi desenvolvida: o *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis*. O co-cultivo em questão foi entre o genótipo 'Paulsen-1103' (P1103) versus os dois isolados de *Fusarium*. Como uma ilustração, no ensaio 3, foi verificado um atraso significativo da curva de progresso da IPP em questão, considerando AACPD, taxas de progresso r e q e IS% (Tabela 4 e Figura 4C).

O *screening* para seleção de fontes de resistência a podridões do tronco proposto pela presente técnica é baseado em plantas de videira micropropagadas por técnica de cultura de tecidos (meristemas laterais). Tais plantas estão estabelecidas em uma condição de células de raízes e parte aérea diferenciadas com tecidos completamente estabelecidos, e células foliares com incipiente capacidade fotossintetizante independentemente da concentração de sacarose (mixotrófico) ao meio (Fila et al., 2006). No entanto, plantas acondicionadas em tubos de cultura podem apresentar uma condição de juvenildade e estresse tal que possa haver a ocorrência de diferenças sensíveis entre respostas de interação planta-patógeno conduzida no sistema *in vitro*, e as conduzidas em plantas aclimatizadas, mudas, ou mesmo plantas adultas (*in vivo*). Ou seja, embora haja diferenciação celular da plântula, os indivíduos não estão aclimatizados, e pode haver um descompasso entre os resultados *in vitro* e as plantas *in vivo*. Tal desvantagem não está provada, no entanto. No presente momento, testes estão sendo conduzidos para confirmação de tal hipótese. E, em caso negativo (respostas equivalentes entre interações planta-patógeno em condições *in vitro* e *in vivo*), a técnica proposta poderá assumir uma importância ainda maior no ganho de praticidade

e agilidade para a seleção de materiais promissores para o controle genético das doenças de tronco da videira.

A planta da videira pode ser acometida por vários tipos de podridões do tronco (GTD). Geralmente, as podridões se caracterizam como uma doença de **juros simples**, a qual o controle mais importante (considerando cultivos não anuais) vai estar relacionado ao manejo e à busca por resistência genética, principalmente quando se caracteriza na planta uma podridão radicular ou do colo, ou no ponto de enxertia (Cavalcanti et al., 2013). Na videira, vários são os fungos que podem causar essas doenças, e, neste trabalho, foram abordados os que têm recebido grande atenção: *P. chlamydospora* (Petri, Esca); *Ilyonectria* spp. (“pé preto”), *N. parvum* (podridões descendentes) e *Fusarium* sp. (“fusariose”). A dificuldade para o controle das GTDs, além da própria diversidade etiológica, está intimamente associada à complexidade das IPPs associadas a cada patógeno que engloba, inclusive, períodos de latência do patógeno no tecido hospedeiro (em tecidos assintomáticos), bem como o envolvimento de estresses abióticos na dinâmica de doença. Por isso, mesmo a despeito de suas possíveis limitações, métodos in vitro vêm sendo crescentemente adotados como pré-*screening* por resistência genética em videira e como métodos de obtenção de amostras para estudos sofisticados de entendimento dos processos de parasitismo (Reis et al., 2019). Métodos distintos têm sido adotados, como suspensão celular, cultura de calos, ensaios em discos foliares, folhas destacadas expandidas, ensaios in vivo abordando báculos e mudas enxertadas. (Reis et al., 2019).

Atualmente, já se tem a consciência de que cada método in vitro acima mencionado deve ser aplicado com o pressuposto de se integrar a outros métodos mais robustos para fenotipagem em condições de produção vegetal, para validação e confirmação da eficiência dos materiais selecionados (Pathrose et al., 2010; Reis et al., 2019). Recentemente, foi publicada uma abordagem envolvendo transferência de plântulas para meios com toxinas isoladas de patógenos causadores de GTDs, para efeito de estudos metabólicos (Trotel-Aziz et al., 2019). Ensaios envolvendo plântulas também já foram relatados na literatura, envolvendo inoculação com suspensão de esporos de *P. chlamydospora* (Santos et al., 2004).

Conclusões

- a) O co-cultivo in vitro força a interação binária entre fungos causadores de podridões do tronco e plântulas de videira, em condições isentas de contaminações e fatores ambientais espúrios;
- b) O contato entre *Ilyonectria* spp., *Neofusicoccum parvum*, *Phaeoconiella chlamydospora* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis* com diferentes genótipos de videira produz curvas de progresso de doença específicas para cada interação planta-patógeno (IPP) observada;
- c) Tais respostas podem subsidiar estudos preliminares envolvendo fenotipagem por resistência genética da videira a podridões do tronco, desde que as triagens sejam confirmadas em estudos *ex vitro* envolvendo modelos que apresentem tecido cortical e vascular com maior desenvolvimento, mudas e/ou plantas adultas;
- d) Por sua praticidade, o presente método pode ser implementado em consórcio entre laboratórios de Fitopatologia e Melhoramento Vegetal (ou Propagação Vegetal) minimamente equipados com microscópio, incubadora (BOD) e capela de fluxo laminar.

Referências

- ALANIZ, S.; ARMENGOL, J.; LEÓN, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. G.; ABAD-CAMPOS, P. Analysis of genetic and virulence diversity of *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum* associated with black foot disease of grapevine. **Mycological Research**, v. 113, n. 1, p. 16-23, Aug. 2008. DOI 10.1016/j.mycres.2008.07.002.
- ALANIZ, S.; GARCIA-JIMÉNEZ, J. G.; ABAD-CAMPOS, P.; ARMENGOL-FORTI, J. Susceptibility of grapevine rootstocks to *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum*. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 3, p. 305-308, 2010. DOI 10.1016/j.scienta.2010.04.009.
- AMPESE, L. C.; LOBATO, A.; CAVALCANTI, F. R. ROCKET: ferramenta para validar a detecção visual de um avaliador humano In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., 2017; ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO, 11., 2017, Bento Gonçalves. **Resumos...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2017. p. 56. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 103). Disponível em: : <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/162424/1/Doc103-Anais-15IC-2017.pdf>. Acesso em: 2 dez. 2020.
- BELOZERSKAYA, T. A.; GESSLER, N. N.; AVERYANOV, A. A. Melanin Pigments of Fungi. In: MÉRILLON, J.- M.; REMAWAT, K. G. (ed.). *Fungal Metabolites*. Singapore: Springer International Publishing, 2017. 653p. Disponível em: <https://link.springer.com/referencework/10.1007%2F978-3-319-25001-4>. Acesso em: 2 dez. 2020.

- BERGAMIN FILHO, A.; INOUE-NAGATA, A. K.; BASSANEZI, R. B.; BELASQUE JR, J.; AMORIM, L.; MACEDO, M. A.; BARBOSA, J. C.; WILLOCQUET, L.; SAVARY, S. The importance of primary inoculum and area-wide disease management to crop health and food security. **Food Security**, v. 8, p. 221-238, 2016. DOI 10.1007/s12571-015-0544-8.
- BILLONES-BAAIJENS, R.; JONES, E. E.; RIDGWAY, H. J.; JASPERS, M. V. Susceptibility of common rootstock and scion varieties of grapevines to Botryosphaeriaceae species. **Australasian Plant Pathology**, v. 43, n. 1, p. 25-31, 2014. DOI 10.1007/s13313-013-0228-9.
- BHATTACHARYA, A.; SOOD, P.; CITOVSKY, V. The roles of plant phenolics in defence and communication during Agrobacterium and Rhizobium infection. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 5, p. 705-719, Sep. 2010. DOI 10.1111/j.1364-3703.2010.00625.x.
- BHATLA, S. C. Secondary Metabolites. In: BHATLA, S. C.; LAL, M. A. **Plant physiology, development and metabolism**. Singapore: Springer Nature, 2018. 1251p. p. 1099-1166.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Wiley & Sons, 1990. 532 p.
- CZERMAINSKI, A. B. C. Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de avaliação de doenças de plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 1545-1555, 1999. DOI 10.1590/S0100-204X1999000900004.
- CAMARGO, U.A. Impacto das cultivares brasileiras de uva no mercado interno e potencial no mercado internacional. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 12., 2008, Bento Gonçalves. **Anais...**, Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. p. 37-42. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/50641/1/CAMARGO2.pdf>. Acesso em: 7 dez. 2020.
- CAVALCANTI, F. R.; BUENO, C. J.; ALMANÇA, M. A. K. **Declínio e morte de plantas de videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 82). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/859270>. Acesso em: 7 dez. 2020.
- CAVALCANTI, F. R.; PEREIRA, V. F.; RIBEIRO-JUNIOR, P. M. **Aspectos de indução de resistência em plantas de videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 88). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/106017/1/Documentos-88.pdf>. Acesso em: 7 dez. 2020.
- COCHRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental designs**. 2nd ed.. Oxford, England: John Wiley & Sons. 1957.
- FILA, G.; BADECK, F-W.; MEYER, S.; CEROVIC, Z.; GHASHGHAIE, J. Relationships between leaf conductance to CO₂ diffusion and photosynthesis in micropropagated grapevine plants, before and after *ex vitro* acclimatization. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 11, p. 2687-2695, 2006. DOI 10.1093/jxb/erl040.
- GRAMAJE, D.; ALANIZ, S.; ABAD-CAMPOS, P.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Effect of hot-water treatments in vitro on conidial germination and mycelial growth of grapevine trunk pathogens. **Annals of Applied Biology**, v. 156, n. 2, p. 231-241, March 2010. DOI 10.1111/j.1744-7348.2009.00382.x.
- GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. **Plant Disease**, v. 95, n. 9, p. 1040-1055, Sept. 2011. DOI 10.1094/PDIS-01-11-0025.

- GRAMAJE, D.; ÚRBEZ-TORRES, J. R.; SOSNOWSKI, M. R. Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. **Plant Disease**, v. 102, n. 1, p. 12-39, 2018. DOI 10.1094/PDIS-04-17-0512-FE.
- GROHS, D. S.; BOTTON, M.; GARRIDO, L. da R.; MELO, G. W. B. de. **Guia prático**: dez indicações técnicas para o plantio de mudas de videira. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2016. (Embrapa Uva e Vinho. Manuais). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/147203/1/guia-10-recomendacoes-WEB.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2020.
- GUBLER, W. D.; URBES-TORRES, J. R.; TROUILLAS, F. P.; HERCHE, R.; STRIEGLER, R.; CARTRIGHT, R. D.; KREIDDY, J.; RUPE, J. C. Grapevine trunk diseases: etiology, epidemiology and control. In: SYMPOSIUM ON ADVANCES IN VINEYARD PEST MANAGEMENT. INSTITUTE FOR CONTINENTAL CLIMATE VITICULTURE AND ENOLOGY, 2010, Osage Beach, Missouri. **Proceedings**... [S.l.: University of Missouri, 2010]. p. 7-22.
- LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V. M. T.; CARDINALI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: IMPERATO, F. (ed.). **Phytochemistry: Advances in Research**, 2006. p. 23-67,
- LUTTS, S. **Etude des mécanismes de résistance à la salinité, chez le riz (*Oryza sativa* L.)**: variation somaclonale et stratégie d'amélioration par utilisation de cultures in vitro. 1996. 350f. Tese (Doctorate) - Université Catholique de Louvain, France.
- MAGNIN-ROBERT, M.; SPAGNOLO, A.; BOULANGER, A.; JOYEUX, C.; CLÉMENT, C.; ABOU-MANSOUR, E.; FONTAINE, F. Changes in plant metabolism and accumulation of fungal metabolites in response to Esca proper and apoplexy expression in the whole grapevine. *Phytopathology*, v. 106, n. 6, p. 541-553, 2016. DOI 10.1094/PHYTO-09-15-0207-R.
- MAIA, J. D. G.; CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; ZANUS, M. C.; QUECINI, V.; FERREIRA, M. E.; RITSCHER, P. S. **Grapevine breeding programs in Brazil**. In: REYNOLDS, A. (Ed.). *Grapevine breeding programs for the wine industry*. Elsevier, 2015. p. 247-271. DOI 10.1016/C2013-0-16445-8.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962. DOI /10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- PATHROSE, B.; JONES, E. E.; JASPERS, M. V.; RIDGWAY, H. J. Development of a grapevine detached root assay for assessing pathogenicity of *Cylindrocarpon* spp. **New Zealand Plant Protection**, v. 63, p. 24-27, 2010.
- POUZOULET, J.; PIVOVAROFF, A. L.; SANTIAGO, L. S.; ROLSHAUSEN, P. E. Can vessel dimension explain tolerance toward fungal vascular wilt diseases in woody plants? Lessons from Dutch elm disease and esca disease in grapevine. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, article 253, June 2014.. DOI 10.3389/fpls.2014.00253.
- POUZOULET, J.; GUILLAUMIE, S.; CHARBOIS, R.; LAMARQUE, L.; GAMBETTA, G.A.; DELZON, S.; DELMAS, C.E.L.; OLLAT, N. Genetic basis of xylem morphology in grapevine: impact on hydraulic conductivity and resistance to *P. chlamydospora*. **Phytopatologia Mediterranea**, v. 58, n. 2, p. 395-449, 2019.(International Workshop on Grapevine trunk diseases, 11., 2019).

REIS, P.; PIERRON, R.; LARIGNON, P.; LECOMTE, P.; ABOU-MANSOUR, E.; FARINE, S.; BERTSCH, C.; JACQUES, A.; TROTEL-AZIZ, P.; REGO, C.; FONTAINE, F. Vitis methods to understand and develop strategies for diagnosis and sustainable control of grapevine trunk diseases. **Phytopathology**, v. 109, n. 6, p. 916-931, June 2019. DOI 10.1094/PHYTO-09-18-0349-RVW.

SANTOS, C.; FRAGOEIRO, S.; PHILLIPS, A. J. L. Physiological response of grapevine cultivars and a rootstock to infection with *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* isolates: an in vitro approach using plants and calluses. **Scientia Horticulturae**, v. 103, n. 2, p. 187-198, Dec. 2004. DOI 10.1016/j.scienta.2004.04.023.

SATTLER, M. C.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. The polyploidy and its key role in plant breeding. **Planta**, v. 243, p: 281-296, 2016. DOI 10.1007/s00425-015-2450-x.

TRAVADON, R.; ROLSHAUSEN, P. E.; GUBLER, W. D. CADLE-DAVIDSON, L.; BAUMGARTNER, K. Susceptibility of cultivated and wild *Vitis* spp. to wood infection by fungal trunk pathogens. **Plant Disease**, v. 97, n. 12, p. 1529-1536, Dec.2013. DOI 10.1094 / PDIS-05-13-0525-RE.

TROTEL-AZIZ, P.; ABOU-MANSOUR, E.; COURTEAUX, B.; RABENOELINA, F.; CLÉMENT, C.; FONTAINE, F.; AZIZ, A. *Bacillus subtilis* PTA-271 counteracts botryosphaeria dieback in grapevine, triggering immune responses and detoxification of fungal phytotoxins. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 25, 2019. DOI 10.3389/fpls.2019.00025.

Embrapa

Uva e Vinho



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA



CGPE