

Avaliação de uma Metodologia para Inoculação e Caracterização In Vivo da Agressividade de Fungos Associados às Doenças de Tronco em Videira



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

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
21**

**Avaliação de uma Metodologia para
Inoculação e Caracterização In Vivo da
Agressividade de Fungos Associados
às Doenças de Tronco em Videira**

*Marcus André Kurtz Almança
Jamerson Fiorentin
Daniel Santos Grohs
Henrique Pessoa dos Santos*

Embrapa Uva e Vinho
*Bento Gonçalves, RS
2021*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na: Comitê Local de Publicações da Embrapa Uva e Vinho

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

Presidente
João Caetano Fioravanzo
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
Renata Gava

Normalização bibliográfica
Rochelle Martins Alvorcem CRB10/1810

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Cristiane Turchet

Fotos da capa
Marcus André Kurtz Almança
Daniel Santos Grohs

Ilustração da capa
Fabio 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

Avaliação de uma metodologia para inoculação e caracterização in vivo da agressividade de fungos associados às doenças de tronco em videira / por Marcus André Kurts Almança...[et al.]. – Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2021.
37 p. : il. color. -- (Embrapa Uva e Vinho. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento online, 21).

Autores: Marcus André Kurts Almança, Jamerson Fiorentin, Daniel Santos Grohs, Henrique Pessoa dos Santos.
ISSN 1981-1004

1. Videira. 2. Fungos. 3. Inoculação. 4. Doenças de tronco. 5. In vivo.
I. Almança, Marcus André Kurtz. II. Embrapa Uva e Vinho. III. Série.

CDD 634.82 (21 ed.)

© Embrapa, 2021

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução.....	8
Material e Métodos	13
Resultados e Discussão	23
Conclusões.....	31
Referências	32

Avaliação de uma Metodologia para Inoculação e Caracterização In Vivo da Agressividade de Fungos Associados às Doenças de Tronco em Videira

Marcus André Kurtz Almança¹

Jamerson Fiorentin²

Daniel Santos Grohs³

Henrique Pessoa dos Santos⁴

Resumo – As Doenças de Tronco da Videira (DTV) são um dos principais problemas na viticultura mundial, restringindo produção e vida útil de plantas. No campo, o estabelecimento dessas doenças é lento, variável e cruzado (complexo de fungos), dificultando a seleção massal de genótipos resistentes. No presente trabalho, combinaram-se as técnicas de micropropagação de plantas e inoculação controlada para avaliação dos primeiros sintomas de fungos causadores de DTV. Com essa estratégia, objetivou-se uma caracterização in vivo e rápida da agressividade de diferentes isolados de fungos, empregando-se o porta-enxerto 'P1103' como planta modelo. Nos ajustes da micropropagação, visando sanidade e uniformidade de crescimento, definiu-se o padrão de plantas para a inoculação (5 a 6 folhas, 20 cm de altura e 3º ou 4º entrenó com 0,3 cm de diâmetro). Essas plantas foram inoculadas (fragmentos de meio BDA com fungos isolados) e incubadas (90 dias), avaliando-se a evolução do escurecimento interno e o reisolamento de fungos. Os resultados demonstram que essa estratégia: 1) evitou a contaminação cruzada dos fungos, permitindo uma análise independente de cada isolado; 2) garantiu uma inoculação eficiente de todos fungos causadores de sintomas internos e associados às DTVs; 3) permitiu a análise

¹ Engenheiro agrônomo, doutor em Fitotecnia com ênfase em Fitossanidade, professor do Instituto Federal do Rio Grande do Sul, Campus de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, RS.

² Graduando em Agronomia, Instituto Federal do Rio Grande do Sul, Campus de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, RS.

³ Engenheiro agrônomo, doutor em Fitotecnia, analista da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS.

⁴ Engenheiro agrônomo, doutor em Fisiologia Vegetal, pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS.

da agressividade de diferentes isolados fúngicos que são relacionados às DTVs. Considerando as condições favoráveis ao desenvolvimento vegetativo na incubação (casa de vegetação), a análise in vivo da agressividade dos fungos se aproxima das condições reais de cultivo e das interações fungo-planta que ocorrem no campo. Diante do exposto, a técnica descrita neste trabalho pode ser uma ferramenta importante tanto para caracterização dos fungos quanto para análise, em grande escala, da suscetibilidade ou resistência de genótipos de videira.

Termos para indexação: doença de Petri, podridão-descendente, pé-preto, micropropagação.

Evaluation of a Methodology for Inoculation and In Vivo Characterization of the Aggressiveness of Fungi Associated with Trunk Diseases in Grapevines

Abstract – Grapevine trunk diseases (GTD) are listed among the main problems in world viticulture, restricting production and plant life. In the field, the establishment of these diseases is slow, variable and crossed (fungal complex), making it difficult to select resistant genotypes. In the present work, the techniques of plant micropropagation and controlled inoculation were combined to evaluate the first symptoms of fungi associated with GTD. With this strategy, the objective was an in vivo and rapid characterization of the aggressiveness of different fungal isolates, using the P1103 rootstock as a model plant. In the micropropagation adjustments, aiming at the health and uniformity of growth, the standard of the plants for inoculation was defined (5 to 6 leaves, 20 cm in height, and 3rd or 4th internodes with 0.3 cm in diameter). These plants were inoculated (fragments of PDA medium with isolated fungi) and incubated (90 days), evaluating the evolution of internal darkening and re-isolation of the fungi. The results show that this strategy: 1) avoided cross contamination by fungi, allowing independent analysis of each isolate; 2) guarantee of efficient inoculation of all fungi causing internal symptoms and associated with GTD; 3) allowed the analysis of aggressiveness of different fungal isolates related to GTD. Considering the favorable conditions for vegetative development during incubation (greenhouse), the in vivo analysis of fungal aggressiveness is close to real cultivation conditions and plant-fungus interactions that occur in the field. Therefore, the methodology described in this work can be an important tool both for the characterization of fungi and for the large-scale analysis of the susceptibility or resistance of grapevine genotypes.

Index terms: Petri disease, dieback disease, black-foot disease, micropropagation.

Introdução

A vitivinicultura é uma atividade de grande importância socioeconômica no cenário agrícola brasileiro, estando presente principalmente em pequenas propriedades familiares no sul do Brasil (Protas; Camargo, 2011). A produção nacional já ultrapassou 1,4 milhão de toneladas de uva (safra 2019) e em 2020 a área plantada já atingiu 73.747 hectares, sendo 62,5% no estado do Rio Grande do Sul. Somente a região da Serra Gaúcha, que engloba vários municípios da região noroeste do estado, é responsável por 85% da produção de vinhos no país (IBGE, 2020; Instituto..., 2020). Apesar dessa relevância no cenário nacional, estas regiões vitivinícolas do sul do Brasil apresentam altos índices de precipitação pluviométrica, com registros de 1.450 a 1.850 mm/ano e uma média de 137 mm/mês, o que favorece a incidência de doenças fúngicas (Westphalen; Maluf, 2000; Alves; Tonietto, 2015). Portanto, dentre os fatores impactantes na sustentabilidade destes vinhedos tradicionais no sul do Brasil, os custos diretos e indiretos impostos pelas doenças fúngicas têm apresentado uma importância crescente. No conjunto das doenças, além das tradicionais de parte aérea (exemplo: míldio e podridões), também se destacam os fungos do complexo conhecido como Doenças de Tronco da Videira (DTVs).

As DTVs estão classificadas entre os principais problemas da viticultura mundial (Bertsch et al., 2013; De La Fuente et al., 2016; Reis et al., 2019), por restringirem drasticamente a vida útil das plantas e forçarem os agricultores a realizar o replantio, o que aumenta os custos de produção. Neste complexo de DTVs, destacam-se as seguintes doenças: o declínio de *Eutypa* (causado principalmente por *Eutypa lata*), a doença de Petri (causada principalmente por *Phaeoacremonium* spp., *Phaeomoniella chlamydospora* e *Cadophora luteo-olivaceae*), o complexo de esca (causado principalmente por *Phaeoacremonium* spp., *Phaeomoniella chlamydospora*, *Fomitiporia mediterranea* e *F. australiensis*), o cancro de *Botryosphaeria* (causada por fungos da família Botryosphaeriaceae como *Botryosphaeria* spp., *Neofusicoccum* spp. e *Lasiodiplodia* spp.) e o pé-preto (causada principalmente por *Campylocarpon* spp., *Dactylonectria* spp., *Ilyonectria* spp.). Com a incidência destas doenças, as videiras manifestam um declínio de vigor, redução de produção e morte precoce, elevando os custos de manutenção ou, em casos extremos de elevada infestação, restringindo o

uso vitícola das áreas infestadas (Munkvold et al., 1994; Gramaje; Armengol, 2011; Mondello et al., 2018; Reis et al., 2019).

As DTVs ocorrem nas principais regiões vitícolas do mundo. No sul da Itália, por exemplo, a alta incidência do complexo de esca atinge 80% dos vinhedos (Romanazzi et al., 2009). Mais recentemente, também foi relatado que a incidência das DTVs, e a consequente morte das plantas, estão aumentando nos vinhedos da China (Yan et al., 2013). Na província canadense da Colúmbia Britânica foi registrada a presença de sintomas das DTVs em até 90% das videiras (Úrbez-Torres et al., 2014). Na França, estima-se que 12% das videiras foram economicamente afetadas, devido principalmente à incidência do complexo de esca, com uma perda anual estimada em um bilhão de euros (Lorch, 2014).

No Brasil, ainda não se tem dados referente ao percentual de plantas infectadas em vinhedos. Entretanto, já se dispõe de registros sobre a ocorrência de fungos associados a DTVs em plantas sintomáticas. Nas áreas com declínio de vinhedos na Serra Gaúcha, Rusin et al. (2015) observaram que, em média, 90% das plantas com sintomas de clorose/necrose foliar, perdas de vigor e morte apresentavam a presença de, pelo menos, uma espécie de fungo causador de DTVs. Dentre eles, *P. chlamydospora* foi o isolado mais frequente, encontrado em 70,5% das plantas (Obs.: as plantas tiveram a ocorrência de mais de um fungo), seguido por *Botryosphaeria* spp. e outros gêneros relacionados à família Botryosphaeriaceae (54,9%), *Phaeoacremonium* spp. (31,4%) e *Cylindrocarpon* spp. (7,8%). Trinta isolados locais de fungos associados a DTVs foram caracterizados molecularmente, confirmando a ocorrência de gêneros e espécies, como: *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium* sp., *Fusarium* sp., *Ilyonectria macrodidyma*, *Neofusicoccum parvum* e *Botryosphaeria dothidea* (Berlatto et al., 2017). A ocorrência de isolados relacionados às doenças de tronco no Brasil também foi observada em outros trabalhos, como Correia et al. (2013), os quais observaram 32 isolados de espécies dos gêneros *Botryosphaeria*, *Campyloctenium*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, *Phaeoacremonium* e *Phaeomoniella* no Nordeste brasileiro, Silva et al. (2017) que obtiveram na mesma região 22 isolados de *Phaeoacremonium* spp. e Ferreira et al. (2017), que caracterizaram 12 isolados de *Phaeoacremonium* e *Phaeomoniella* no estado de São Paulo.

Quando se confronta a incidência destes fungos de tronco com outros fatores locais associados historicamente ao declínio de vinhedos, como o inseto *Eurhizococcus brasiliensis*, conhecido como pérola-da-terra, a relevância das DTVs tem sido maior. Em levantamento realizado por Rusin et al. (2015), destaca-se que a maioria das plantas (90%) com sintomas de declínio continham ao menos um dos fungos associados as DTVs e, apenas 27,4% das mesmas plantas tinham a presença de pérola-da-terra nas raízes.

Na análise de sintomas foliares, Zart et al. (2014) observaram clorose e necrose entre nervuras em plantas de Paulsen 1103 ('P1103'), genótipo popularmente utilizado como porta-enxerto de videira, após seis meses de cultivo em áreas infestadas naturalmente com pérola-da-terra. Entretanto, em outro trabalho do mesmo grupo, quando as plantas de 'P1103' foram cultivadas em vasos com solo esterilizado e infestado com uma média de 32 cistos/planta e por mais de 20 meses, estes sintomas de clorose e necrose foliar não apareceram (Zart, 2012). No conjunto, esses trabalhos sugerem que os agentes causais dos sintomas foliares e do declínio e morte das videiras são principalmente as DTVs, sendo que os demais fatores como, por exemplo, pérola-da-terra, podem estar atuando como coadjuvantes, debilitando as plantas ou favorecendo o ataque dos fungos de tronco. Reforçando essa hipótese, destacam-se os avanços no controle de sintomas e morte de videiras em parreirais com histórico de declínio em Santa Catarina com a implantação de drenos e camalhões nos parreirais (Dalbó et al., 2015; Dambros et al., 2016), os quais restringem as condições de umidade que favorecem os fungos de solo.

A principal forma de entrada nas plantas dos fungos das DTVs é por ferimentos, que na videira podem ocorrer com maior frequência durante a poda (seca ou em verde) ou nas etapas de produção de mudas, como enxertia e enraizamento (Gramaje; Armengol, 2011; Rolshausen et al., 2010). Após a fase inicial de infecção, são observados escurecimentos internos nos tecidos em decorrência do avanço dos fungos, podendo comprometer de modo parcial ou total o fluxo do xilema (Rolshausen et al., 2010). Diante desta forma de infecção, uma ação importante no controle das DTVs é a proteção dos ferimentos com produtos químicos ou biológicos (Halleen et al., 2010). Contudo, no Brasil, ainda não se dispõe de produtos registrados que sejam específicos para proteger ferimentos de poda (Brasil, 2020). Além da proteção dos ferimentos, durante as práticas de poda é fundamental

combinar a limpeza de tesouras de poda com hipoclorito de sódio entre plantas, principalmente na remoção das plantas contaminadas, ou partes delas, com sintomas (Agustí-Brisach et al., 2015).

Qualquer prática de manejo fitotécnico que impeça a entrada e a disseminação das DTVs é muito importante para a preservação da vida útil dos parreirais. Contudo, em áreas de replantio onde já existe um conjunto de fatores de estresse biótico, como fungos e insetos, e abiótico, como elevado teor de cobre no solo, em função do histórico de cultivo e das dificuldades de controle ambiental, os problemas no estabelecimento e na sobrevivência das plantas são maiores. De acordo com Lazzarotto et al. (2016), para recuperar o capital investido na instalação, estimado entre R\$ 40 e 50 mil/ha, e apresentar viabilidade econômica adequada, o parreiral deve ter uma vida útil, com alta produtividade, de no mínimo 15 anos. Contudo, há relatos frequentes de produtores e técnicos no Rio Grande do Sul e Santa Catarina sobre a morte antecipada de plantas e o declínio dos parreirais antes dos 10 anos após o plantio/replanteio, descapitalizando e agravando a situação econômica e financeira dos viticultores (Lazzarotto et al., 2016). Neste cenário, a adoção de porta-enxertos mais tolerantes se apresenta como uma estratégia complementar e de grande relevância para a sustentabilidade destas áreas. No sul do Brasil, o 'P1103' tem se destacado como o principal porta-enxerto, com uma área plantada de 11.368,11 ha (Mello; Machado, 2017). Uma das razões que induziram a preferência por esse porta-enxerto foi sua característica de resistência à fusariose, uma das doenças associadas aos sintomas de declínio e morte de plantas (Grigoletti Júnior; Sônego, 1993). Em contrapartida, este porta-enxerto tem apresentado suscetibilidade à maioria dos fungos causadores das DTVs, como *P. chlamydospora*, *Phaeoacremonium inflatipes* e *P. aleophilum* (Eskalen et al., 2001), *Cylindrocarpon liriodendri* e *C. macrodidymum* (Alaniz et al., 2010), *Neofusicoccum luteum*, *N. parvum* e *N. australe* (Billones-Baaijens et al., 2014) e *Campylocarpon pseudofasciculare* e *Ilyonectria macrodidyma* (Heckler, 2015).

Para o avanço na prospecção de técnicas de controle ou manejo dos fungos causadores de DTVs deve-se dispor de condições experimentais que garantam uma interação patógeno-hospedeiro controlada e se aproxime da realidade de cultivo. A inoculação de plantas utilizando fungos de doenças de tronco pode ter diferentes objetivos, tais como a observação de sintomas externos e internos, microscopia de tecido, estudos de expressão gênica, a

obtenção de plantas resistentes e estudos de virulência/agressividade (Alaniz et al., 2010; Reis et al., 2019; Cavalcanti, 2021).

A análise da agressividade e virulência de fitopatógenos é de suma importância para trabalhos futuros que visem métodos de controle, especialmente para obtenção de genótipos resistentes (Alaniz et al., 2009). Nesta linha, a diferença na virulência/agressividade tem sido observada em trabalhos com contrastes entre espécies e dentro das espécies de *Neofusicoccum* (Amponsah et al., 2011); entre isolados de *Phaeomoniella chlamydospora* e *Neofusicoccum parvum* (Laveau et al., 2009); entre espécies e isolados de *Phaeoacremonium* spp. (Silva et al., 2017) e isolados de *Ilyonectria* spp., obtidos de plantas de videira e de outros hospedeiros (Cabral et al., 2012).

As estratégias de inoculação destes fungos têm sido variadas, envolvendo calos de plantas micropropagadas, plântulas em meio de cultura (in vitro) (Cavalcanti, 2021), plantas obtidas a partir de sementes (Alaniz et al., 2009), plantas adultas (Reis et al., 2019) ou partes de plantas adultas (Liminana et al., 2009; Alaniz et al., 2010). Inicialmente, destaca-se que o uso de plantas oriundas de sementes pode ser inviável, devido a variabilidade genética, assim como o uso de plantas adultas, que são onerosas em tempo e espaço para um comparativo entre genótipos. Nas estratégias de inoculação com partes de plantas adultas, empregando estacas de sarmentos para obtenção de mudas, enxertadas ou não-enxertadas, apesar dos tratamentos prévios com fungicidas/desinfetantes, em muitos casos ocorrem contaminações bióticas que são oriundas das plantas de origem e que inviabilizam as análises (Liminana et al., 2009). Além disso, esses ensaios com estacas também demandam um tempo longo de avaliação, podendo atingir 12 meses ou mais, caso se considere os tempos de enraizamento, de inoculação e de observação dos sintomas (Alaniz et al., 2010), o que restringe o uso para seleção de genótipos resistentes em larga escala.

Esses problemas de contaminação biótica são facilmente controlados com o emprego da técnica de inoculação em cultivos in vitro, empregando calos ou plântulas (Cavalcanti, 2021). Contudo, apesar da agilidade e pequena demanda por espaço nas análises em grande escala, as condições de co-cultivo in vitro são muito distintas da realidade de cultivo da videira, favorecendo os fungos em detrimento das plantas (Reis et al., 2019). Além

disso, considerando que a principal forma de infecção natural dos fungos, associados as DTVs, é por ferimentos (Rolshausen et al., 2010), o simples co-cultivo in vitro não irá reproduzir esta condição fundamental. Alguns autores, como Diaz e Latorre (2014), consideraram esse aspecto e efetuaram a inoculação por ferimentos em co-cultivo totalmente in vitro, porém salienta-se que as videiras ainda estão em condições in vitro durante todo o processo de avaliação e os resultados podem ser distintos das condições in vivo ou de cultivo.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia para inoculação e caracterização in vivo da agressividade de fungos associados às doenças de tronco em videira por meio da associação da técnica de micropropagação da videira e inoculação controlada para avaliação dos sintomas de diferentes isolados fúngicos.

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido na Embrapa Uva e Vinho, envolvendo as ações de micropropagação e preparo das mudas de videira do genótipo 'P1103', e no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul/Campus Bento Gonçalves (IFRS-BG), onde foram ajustados os procedimentos de inoculação e análise dos sintomas. Portanto, na descrição a seguir foram destacadas essas duas partes do método e como elas se interconectam.

Produção das mudas micropropagadas

Estacas de 'P1103' foram coletadas de sarmentos de ano, em estádio lenhoso, a partir de plantas matrizes mantidas em vasos de 5,0 L em telados, no mês de julho de 2019 (plantas em dormência). Estas estacas, com 30 cm de comprimento, foram enraizadas em vasos de 3,0 L, em estufa climatizada em temperatura de 25 a 27 °C, umidade em torno de 70%, sem controle de iluminação, até obtenção das brotações. O substrato utilizado para enraizamento foi constituído por uma mistura de turfa do musgo *Sphagnum*, solo autoclavado a 130 °C por 45 min, e vermiculita expandida, de granulometria fina, na proporção 2:1:0,5. As brotações foram coletadas quando apresentavam aproximadamente 30 cm (em torno de 90 dias após

o plantio das estacas). Em torno de sete dias antes da coleta foi realizada a pulverização com fungicidas à base de captana (na dosagem de 0,0048 g de ingrediente ativo L⁻¹). Destes brotos, segmentos nodais individuais foram obtidos das porções apicais (≈10 mm) por meio de corte bisturi em seção transversa sobre placa de Petri. Imediatamente, os explantes foram imersos em álcool 70% (v/v) e agitados manualmente durante um minuto, em cabine de fluxo laminar vertical, seguido de imersão em hipoclorito de sódio 1% (v/v), contendo 0,02% (v/v) de Tween 20 e novamente agitados por 20 minutos. Posteriormente, os segmentos foram lavados três vezes sucessivamente com água estéril. Foram então inoculados em frascos de cultivo contendo 12 mL de meio MS/2, que corresponde à metade da concentração dos sais minerais empregados no MS padrão, conforme descrito por Murashige e Skoog (1962). Adicionalmente, o meio MS/2 foi suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar, 0,5 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e o pH foi ajustado para 5,8. O estabelecimento *in vitro* foi realizado ao longo de 30-45 dias em câmara de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C, 70% de umidade relativa, com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 72 μE m⁻² s⁻¹, proveniente de lâmpadas de LED. Após este período, as plantas *in vitro* foram submetidas a dois subcultivos sucessivos. Este procedimento teve por objetivo o crescimento massal do lote de explantes, dentro de um *stand clonal* uniforme quanto ao desenvolvimento vegetativo. O primeiro subcultivo foi realizado ao longo de 30-45 dias após o estabelecimento e o segundo após 30-45 dias do primeiro subcultivo.

Após 90-135 dias da introdução *in vitro*, realizou-se a etapa de enraizamento em meio MS/2, agora suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e 0,1 μg L⁻¹ de ácido α-naftalenoacético (ANA). As condições de temperatura, umidade e luminosidade empregadas nesta etapa foram as mesmas das etapas de estabelecimento e crescimento, sendo que após 30-45 dias as plântulas apresentavam o padrão ideal para etapa de aclimação (Figura 1A). Nesta fase, as plântulas foram retiradas do meio de cultivo e transferidas para copos plásticos contendo 180 mL de substrato autoclavado (Figura 1B). O substrato foi constituído apenas por turfa de *Sphagnum* autoclavada e vermiculita de granulometria fina, na proporção 9:1. Durante um período variável entre 45 a 60 dias, as plantas foram aclimatizadas em estufa plástica com controle de temperatura entre 23 e 28 °C, umidade relativa superior a 60%, e com intensidade luminosa natural média diária de

400 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Durante este período, as plantas foram suplementadas com nitrato de cálcio (1 g L^{-1}), a cada 15 dias, e regadas a cada três dias com água destilada aplicada por capilaridade em bandeja, para manutenção constante da umidade no substrato. Assim que as plantas atingiram o padrão de cinco a seis folhas, com aproximadamente 20 cm, foram consideradas rustificadas e aptas para utilização na etapa dos testes fitopatológicos (Figura 1C). Estas plantas apresentaram em média 0,3 cm de diâmetro no 3º ou 4º entrenó, o que é essencial para a realização do fermento usado na inoculação dos fungos, como detalhado na sequência.

Fotos: Daniel Santos Grohs (BME)

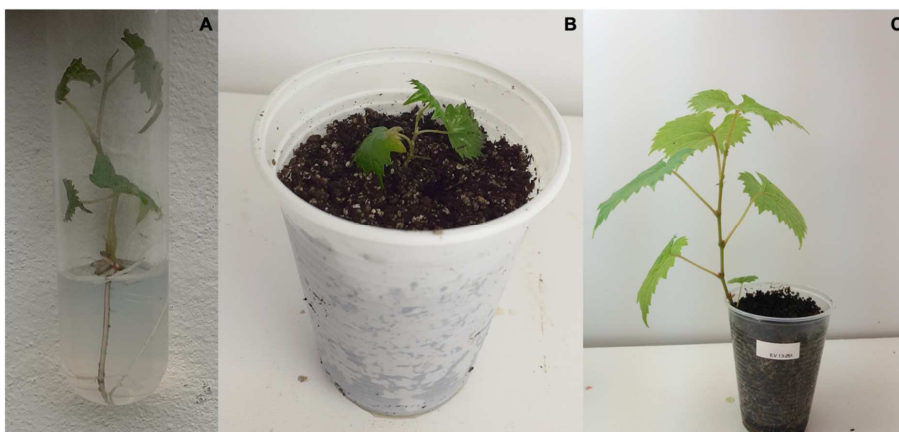


Figura 1. Preparo das plantas de 'P1103', expondo as etapas de: (A) plantas in vitro na fase da transferência para aclimação ex vitro; (B) plantas em aclimação e (C) planta com tamanho apto para os ensaios de inoculação.

Preparo de inóculo

Os fungos utilizados foram multiplicados a partir da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia do IFRS-BG. Para cada isolado fúngico, um fragmento de meio batata-dextrose-ágar (BDA) contendo estruturas dos fungos foi retirado da amostra armazenada na coleção e repicado em BDA, para recuperação do crescimento. As placas foram mantidas por 5 a 30 dias em câmara de crescimento do tipo BOD a

25 ± 1 °C, conforme a espécie fúngica (Tabela 1). Após o crescimento em culturas axênicas, os fungos foram utilizados para inoculação nas plantas.

Na Tabela 1 estão listadas as espécies e linhagens de patógenos do tronco da videira utilizados e as respectivas DTVs às quais estes fungos estão relacionados etiologicamente. Para considerar no conjunto experimental a variabilidade genética na mesma espécie, foi empregado mais de um isolado nos testes.

Tabela 1. Identificação e tempo médio de crescimento para obtenção do inóculo dos isolados utilizados em cada grupo da doença de tronco de videira (DTV) para inoculação.

Doença (DTV)	Espécie de fungo	Identificação do isolado ⁽¹⁾	Código ITS GenBank	Tempo de crescimento
Podridão descendente	<i>Botryosphaeria dothidea</i> (Bdth)	TD 208	KY989984.1	De 5 a 10 dias
	<i>Neofusicoccum parvum</i> (Npv)	TD 316	MT823469.1	
	<i>Neofusicoccum parvum</i> (Npv)	TD 100	KY989973.1	
	<i>Neofusicoccum parvum</i> (Npv)	TD 476	KY989972.1	
Doença de Petri	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (Pch)	TD 157	KY984071.1	De 20 a 30 dias
	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (Pch)	TD 336	KY984080.1	
Pé-preto	<i>Dactylonectria macrodidyma</i> (Ilyo)	TD 1110	MK421587.1	De 15 a 20 dias
	<i>Ilyonectria liriodendri</i> (Ilyo)	TD 1117	MK421588.1	

⁽¹⁾ Estes isolados estão vinculados ao código A85766B no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN).

Inoculação dos fungos e preparo das amostras para reisolamento

Para a inoculação utilizou-se um bisturi com lâmina nº 11 para realizar ferimentos longitudinais no caule das plantas, de aproximadamente 0,5 cm, retirando a casca para exposição dos vasos internos (adaptado de Diaz; Latorre, 2014). Estes ferimentos (Figura 2B) foram realizados no terceiro ou quarto entrenó de cada planta, selecionando o entrenó com comprimento mínimo de 2 cm. Após a realização dos ferimentos, foram inoculados fragmentos de meio BDA de 0,5 x 0,3 cm, contendo as hifas e esporos dos fungos. Nas plantas usadas como testemunhas também foram feitos ferimentos com bisturi e foi inoculado somente o meio BDA. Após a inoculação, os ferimentos

Ilustração: Fábio Ribeiro dos Santos

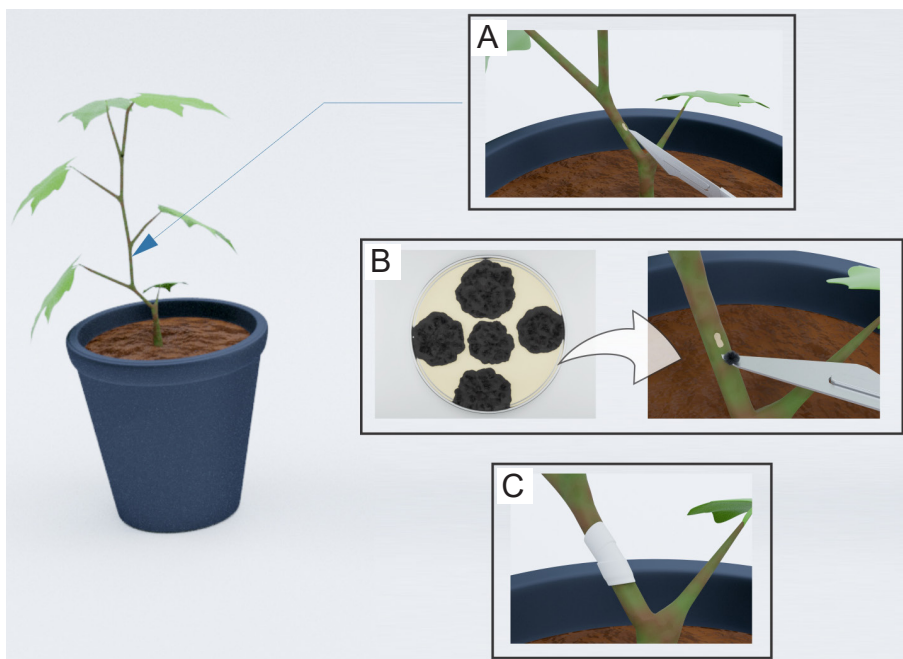


Figura 2. Representação esquemática do processo de inoculação: (A) realização do corte longitudinal para exposição do xilema; (B) inoculação do fragmento de meio de cultura BDA contendo estruturas fúngicas e (C) planta com ferimento protegido com filme plástico.

foram fechados com filme plástico para preservar a umidade e a viabilidade do inóculo (Figura 2C). Este processo foi conduzido em bancada, durando no máximo cinco minutos entre a realização do fermento e o fechamento com filme plástico. Para evitar contaminações foi utilizada uma chama próxima do local de inoculação e álcool 92% para limpeza e flambagem dos instrumentos em cada procedimento.

Após a inoculação, as plantas de 'P1103', com cinco ou seis folhas, foram acondicionadas em bandejas plásticas e mantidas em casa de vegetação com temperatura controlada (25 ± 5 °C). A irrigação foi realizada por capilaridade, mantendo-se uma lâmina de água dentro da bandeja durante o período. As plantas permaneceram em casa de vegetação durante 90 dias. Ao fim do período, as plantas foram retiradas das bandejas e cortadas na base para separação da parte aérea das raízes. Partes dos caules, padronizadas em 10 cm de comprimento de cada repetição e contendo o ponto de inoculação, foram amostradas para reisolamento (Figura 3A). Estes fragmentos foram lavados em água corrente e a desinfestação externa efetuada com a sequência álcool 70% (v/v) por 30 segundos, hipoclorito de sódio 2% (v/v) por 1 minuto e novamente álcool 70% (v/v) por 30 segundos (metodologia modificada de Almança et al., 2013). Após, em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada e com o auxílio de bisturi, foi retirada a casca para exposição do tecido interno do caule. No momento da retirada da casca foram realizadas as avaliações dos sintomas de escurecimento interno (Figura 3B).

Ensaio de validação do método de inoculação e avaliação da agressividade dos isolados fúngicos

Escurecimento interno

Delineamento experimental

Para caracterização do sintoma de escurecimento interno provocado pelos diferentes isolados de fungos DTV, empregou-se um delineamento completamente casualizado com dados desbalanceados e nove tratamentos. Foram utilizadas três repetições (plantas) por tratamento, enquanto que no tratamento testemunha (sem inoculação) foram adotadas seis repetições. Os



Figura 3. Amostras para procedimento de reisolamento fúngico, após inoculação e 90 dias de incubação. (A) Caule sem as folhas contendo o ponto de inoculação; (B) Após aberto, caule apresentando sintomas de escurecimento interno.

tratamentos corresponderam aos oito isolados descritos na Tabela 1, mais a testemunha sem a inoculação de patógenos.

Avaliações

No momento da retirada da casca para exposição do tecido interno do caule, aos 90 dias após a inoculação, foram avaliados visualmente os sintomas de escurecimento interno, como exposto na Figura 3B. De forma complementar, visando maior segurança na análise, foi realizado o registro fotográfico. Salienta-se que neste momento a amostra, já sem a casca, deve ser manuseada com muita cautela e em ambiente asséptico. Esse cuidado é

importante para evitar qualquer contaminação do tecido pois, posteriormente, o material será usado para o processo de reisolamento.

Para avaliação do escurecimento interno foi desenvolvida uma escala descritiva (Figura 4), atribuindo-se notas para os sintomas observados. A escala foi montada para a identificação da ocorrência, ou não, do sintoma de escurecimento tanto no ponto de inoculação quanto em tecidos adjacentes, baseada na metodologia de Billones-Baaijens et al. (2014). As avaliações foram realizadas sempre pelo mesmo avaliador, utilizando como comparação o aspecto de alastramento das manchas nas fotos da escala.

Reisolamento fúngico in vitro

O reisolamento fúngico foi conduzido em câmara de fluxo laminar no Laboratório de Fitopatologia do IFRS/BG. Para confirmar se o fungo inoculado estava presente e atingiu novos tecidos das plantas tratadas, além da análise do escurecimento interno, foram retirados, com bisturi, fragmentos

Fotos e detalhes: Marcus André Kurtz Almança

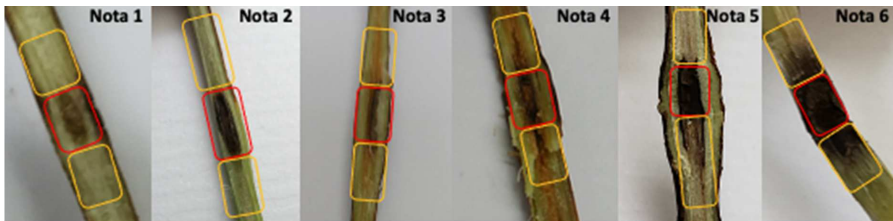


Figura 4. Escala de notas desenvolvida para avaliação do escurecimento interno em plantas: 1) escurecimento leve (amarronzado e sem enegrecimento) no ponto de inoculação (quadro vermelho) e sem nenhuma variação nos tecidos adjacentes (quadros em amarelo). Esse é o aspecto típico das plantas testemunha, sem inóculo, de 'P1103'; 2) escurecimento com enegrecimento apenas no ponto de inoculação (quadro vermelho) e sem nenhuma variação nos tecidos adjacentes (quadros amarelos); 3) escurecimento leve no ponto de inoculação (quadro vermelho) e também nos tecidos adjacentes do xilema (quadros amarelos); 4) escurecimento leve no ponto de inoculação (quadro vermelho) e escurecimento mais intenso nos tecidos adjacentes do xilema (quadros amarelos); 5) escurecimento intenso com enegrecimento no ponto de inoculação (quadro vermelho) e com início de enegrecimento nos tecidos adjacentes do xilema (quadros amarelos) e 6) escurecimento com enegrecimento intenso tanto no ponto de inoculação (quadro vermelho) quanto nos tecidos adjacentes do xilema (quadros amarelos).

do entorno do ponto de inoculação (até 1 cm de distância). Esses fragmentos foram dispostos em placas de Petri, contendo meio de cultura BDA (Figura 5A, 5B e 5C), e estas mantidas em câmara do tipo BOD com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 26 ± 1 °C.

Delineamento experimental

Na caracterização do reisolamento interno de cada fungo foi empregado um delineamento completamente casualizado. O reisolamento foi efetuado a partir de cada planta (3 plantas/tratamento, ensaio 2.4.1), retirando-se 10 subamostras que foram divididas em duas placas de Petri (cinco fragmentos/placa). Cada tratamento foi representado por um isolado fúngico (Tabela 1), totalizando oito isolados mais o grupo controle sem a presença de isolados fúngicos.

Avaliações

O crescimento dos fungos foi observado por 30 dias, sendo feita a identificação por morfologia comparativa com as características observadas em identificação prévia destes isolados (os fungos inoculados tinham reconhecida identificação – Tabela 1). Ao final deste período foi registrado o número de fragmentos que apresentavam crescimento ou não do fungo inoculado (Figura 5D), gerando o percentual de reisolamento. Este foi calculado com base no número de fragmentos com crescimento fúngico sobre o total de fragmentos.

Análises estatísticas

As variáveis “nota de escurecimento” (NE), na Etapa 1, e “percentual de reisolamento (PR), na Etapa 2, são classificadas, respectivamente, como qualitativa de escala ordinal e quantitativa contínua truncada. Os testes estatísticos foram precedidos pela verificação da normalidade a partir do teste de Shapiro-Wilk para NE ($n < 30$) e Kolmogorov-Smirnov para PR ($n > 30$). Por não ter sido atendido o pressuposto da normalidade ($p < 0,05$) ($p = 0,000211$ e $p = 0,000039$ para NE e PR, respectivamente), os dados foram submetidos a transformação, de modo que NE foi ponderado ao índice de doença (Mckinney, 1923), como Índice de Escurecimento (IE) e PR submetido a transformação

Fotos: Marcus André Kurtz-Almança

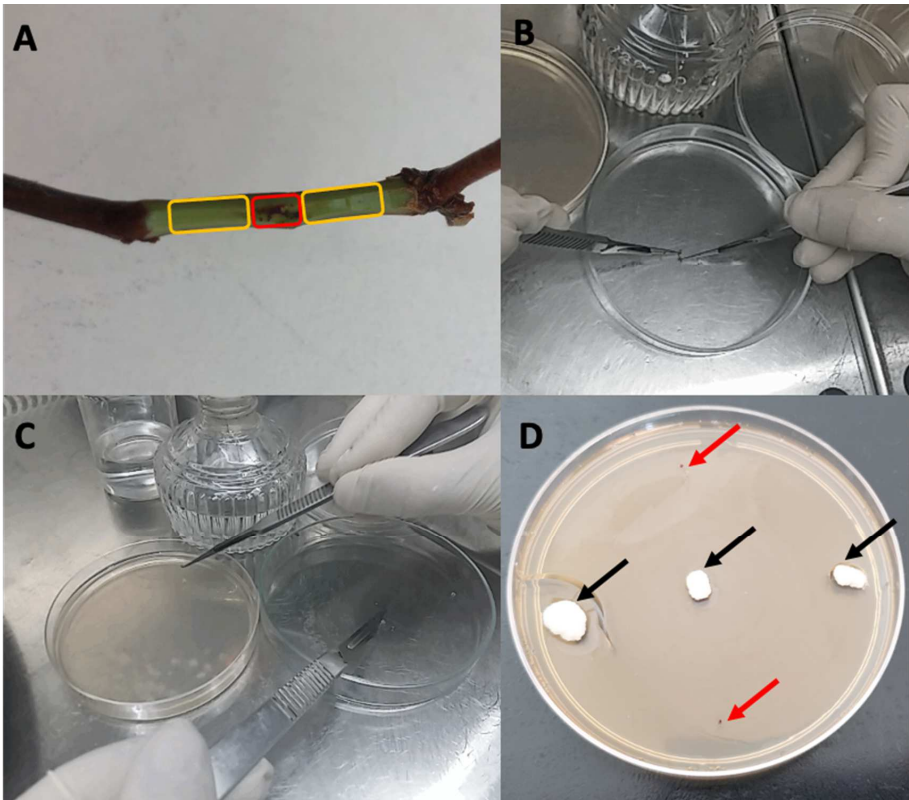


Figura 5. Procedimento de reisolamento e acompanhamento do crescimento fúngico: (A) área do caule com raspagem superficial da casca, ponto de inoculação (quadro em vermelho) e locais de retirada dos fragmentos para isolamento, 1 cm além do ponto de inoculação (quadros em amarelo); (B) retirada e corte dos fragmentos internos do caule no entorno do ponto de inoculação; (C) colocação dos fragmentos internos do caule em meio de cultura BDA e (D) contagem e registro do número de fragmentos com crescimento fúngico após o período de incubação (setas pretas indicam fragmentos com crescimento e setas vermelhas sem crescimento).

angular ($\text{arc_sen} [\text{raiz} (x/100)]$). Após reanálise, os dados ainda não apresentaram o pressuposto da normalidade, determinando-se o atendimento do critério para aplicação de prova não-paramétrica. Neste caso, o contraste entre tratamentos foi verificado através do χ^2 -teste ($p < 0,05$) e a comparação das médias através do teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes. A possibilidade de associação entre IE e PR também foi testada a partir da correlação não-paramétrica de Spearman ($p < 0,05$), utilizando-se os dados

não-transformados de PR e aplicando a média aritmética das duas placas obtidas de cada planta (n=27). Análise multivariada a partir do método dos componentes principais (PCA – Principal Component Analysis) foi aplicada, visando discriminar os grupos de isolados quanto a agressividade com base no efeito conjunto de IE e PR, em relação à testemunha. Para adequação dos valores das variáveis à PCA, os valores não-transformados de IE e PR foram previamente autoescalados para remoção da influência da ordem de grandeza das unidades de medida e, posteriormente, centralizados à média. Cada PCA integrou os ‘escores’ dos fatores com os ‘pesos’ das variáveis da qualidade. O gráfico bidimensional da PCA foi constituído por duas componentes principais (PC1 e PC2) que representam distribuição espacial das combinações lineares entre as variáveis originais. Neste caso, é possível identificar possíveis agrupamentos presentes nos dados a partir da disposição das amostras em PC1 e PC2, bem como, a participação das variáveis (‘pesos’) no padrão observado. Para o contraste de grupos independentes na espacialização da PCA, foram ajustadas barras de desvio padrão múltiplo ($\pm\sigma$). Ao se contrastar os grupos, aqueles que não se sobrepueram vertical ou horizontalmente foram considerados distintos. Os testes estatísticos foram realizados a partir do software SPSS v.21 (IBM, 2012). Para a análise multivariada foi utilizado o software ChemoStat (Helfer et al., 2015).

Resultados e Discussão

A presente metodologia foi desenvolvida e ajustada com base em pesquisas e resultados preexistentes na literatura, principalmente com o foco no método de inoculação, para análise da agressividade de isolados e a reação de cultivares de videira aos fungos causadores de DTVs (Alaniz et al., 2009; Alaniz et al., 2010; Billones-Baaijens et al., 2014; Gramaje et al., 2016). Dentre os ajustes, destaca-se a combinação do preparo de mudas por micropropagação com a inoculação controlada das plantas com fungos causadores de DTVs. Com o preparo das mudas por micropropagação, foi possível a seleção de plantas com similaridade de crescimento (altura de 20 cm) e desenvolvimento (5 a 6 folhas) para a etapa de inoculação (Figura 1C). Além disso, como esse processo de multiplicação in vitro exige assepsia, evita-se a contaminação cruzada com outros fungos de doença de tronco que possam contaminar as amostras. Basicamente, com a incorporação da

multiplicação *in vitro*, os resultados do reisolamento de fungos associados às DTVs foram mais confiáveis, pois fungos que normalmente estariam presentes no material vegetativo antes da inoculação, como em trabalhos com multiplicação vegetativa convencional e sem o uso da cultura de tecidos, foram excluídos do processo adotado (Liminana et al., 2009). Isso fica evidente nas plantas-testemunha, as quais apresentaram pouco escurecimento no ponto de inoculação (Figura 4 - Nota 1; Figuras 6A), porém não foi registrada a presença de fungos causadores de DTVs nas análises de reisolamentos (Figura 6B). A ocorrência do sintoma de escurecimento nas plantas testemunha provém da oxidação dos tecidos que sofreram o dano da perfuração, sem a inoculação, conforme já observado por Billones-Baaijens et al. (2014). Portanto, isso reforça a importância das análises conjuntas do escurecimento e do reisolamento na caracterização dos sintomas das DTVs.

Outro ponto importante no emprego da multiplicação *in vitro* é o menor tempo necessário para obtenção das plantas com tamanho adequado para inoculação. Neste trabalho, para se dispor de plantas com o tamanho-padrão (20 cm, 5 a 6 folhas e com um diâmetro do caule mínimo de 0,3 cm no ponto de inoculação) foram necessários, em média, 150 dias. Desta forma, considerando mais 90 dias para avaliação dos sintomas pós-inoculação, atinge-se um total de 240 dias para caracterização de um genótipo (isolado fúngico ou videira). Em trabalho realizado por Alaniz et al. (2010), utilizando estacas enraizadas de oito meses, o tempo médio para se realizar a avaliação foi de 12 meses, somando enraizamento e processo de inoculação/avaliação. Billones-Baaijens et al. (2014), utilizando estacas de um ano, conduziram a avaliação durante o período de enraizamento (seis meses) e obtiveram sucesso na inoculação e no aparecimento de sintomas de escurecimento interno, diferenciando as plantas inoculadas e não-inoculadas com isolados de *Neofusicoccum* spp. Contudo, trabalhos utilizando estacas oriundas de plantas adultas, que foi a estratégia destes trabalhos anteriores, podem apresentar problemas de contaminação oriunda do campo, impactando diretamente no processo final de avaliação e gerando falsas interpretações. Em outro trabalho, Alaniz et al. (2009) utilizaram plantas com três a quatro folhas, obtidas a partir de sementes e um período de dois meses para avaliação, porém os autores não especificaram o tempo para obtenção das plantas para inoculação. Dependendo do enfoque da análise, cabe também salientar que espécies perenes, como a videira, são altamente heterozigotas

(Aradhya et al., 2003) e, portanto, as plantas derivadas de semente representam populações segregantes, indivíduos geneticamente distintos, e impactam diretamente as respostas de resistência aos fungos.

Na análise externa das plantas controle e inoculadas, destaca-se inicialmente que não foram observadas diferenças em sintomas foliares que são associados às DTVs. No final do período de avaliação foram observados apenas sintomas de senescência em função do ciclo da planta, o que é reforçado pela observação dos sintomas mais evidentes nas folhas mais velhas, na parte inferior da planta (Figura 6). Billones-Baaijens et al. (2014) também não observaram sintomas externos em plantas inoculadas e testemunhas, devido ao curto período entre a inoculação e a avaliação dos sintomas internos nas plantas. Para exemplificar a importância do tempo na indução dos sintomas foliares pelas DTVs, Mondello et al. (2018) relatam que, em plantas a campo, a maior frequência dos sintomas da doença de Petri ocorre entre um e sete anos pós-plantio, enquanto os sintomas de esca aparecem somente a partir dos oito anos.

Na análise interna dos tecidos, salienta-se que, para todos os isolados, houve escurecimento interno dos vasos do xilema além do ponto de infecção. Observa-se que o escurecimento ocasionado pelos fungos relacionados a cada doença foi significativamente superior à testemunha e que não houve diferença entre os fungos/isolados dentro de cada doença (Figura 7A). De modo geral, os fungos relacionados à podridão-descendente apresentaram o maior índice de escurecimento (91%). Por outro lado, o isolado de doença de Petri, Pch 336, apresentou o menor valor (67%). Já os fungos relacionados ao pé-preto e o isolado de doença de Petri, Pch 157, apresentaram índices variando entre 80 e 90%. Billones-Baaijens et al. (2014) também observaram escurecimento interno semelhante em videiras quando inocularam isolados de *Neofusicoccum* spp. De forma geral, não foi observada diferença de agressividade entre os isolados nos grupos de doença, com exceção da doença de Petri.

Trabalhando com duas espécies de *Cylindrocarpon*, inoculadas pela técnica de imersão de raízes, Alaniz et al. (2010) verificaram que estes fungos também ocasionaram sintomas distintos de escurecimento interno em 'P1103', quando comparadas com a testemunha. Gramaje et al. (2016), utilizando a técnica de imersão de raízes de estacas enraizada em inóculo

Fotos: Marcus André Kurtz-Almança

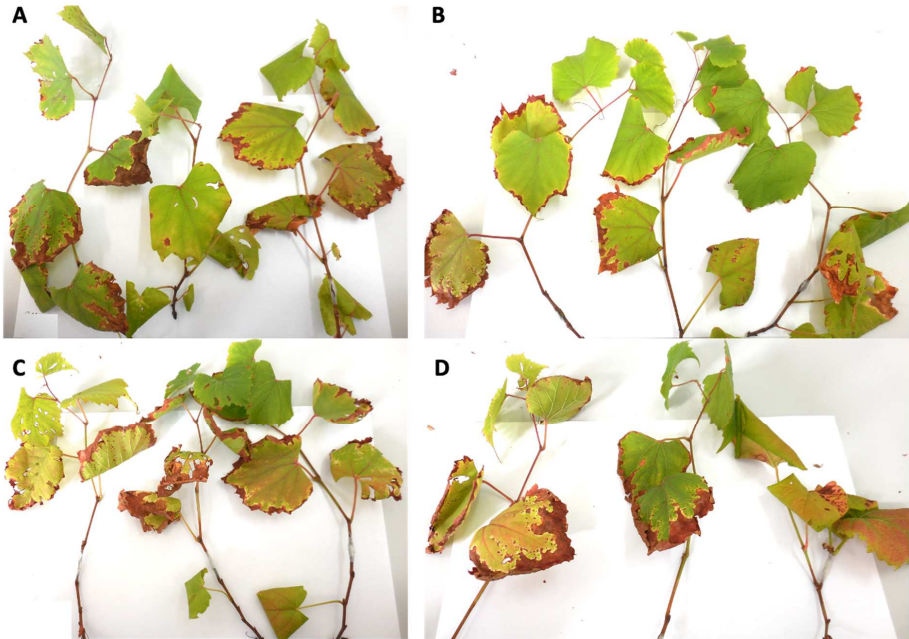


Figura 6. Aspecto foliar de plantas de 'P1103' testemunha (sem inóculo, (A)) e de plantas do mesmo genótipo com os isolados de Npv 100 (podridão-descendente, (B)), de Pch 157 (doença de Petri, (C)) ou Ilyo 1110 (pé-preto, (D)). Todas imagens tiradas aos 90 dias após inoculação.

de fungos relacionados ao pé-preto e a técnica de fermento e inoculação a vácuo de estacas, de 1 ano enraizadas, com fungos relacionados a doença de Petri, observaram escurecimento interno pelas duas técnicas de inoculação em 'P1103' e aparência distinta de plantas-testemunha (não-inoculadas).

No presente estudo, todos os fungos foram inoculados no caule, inclusive os fungos relacionados ao pé-preto, que também podem infectar as videiras pelas raízes. Entretanto, cabe salientar que todos estes fungos de madeira podem infectar as videiras por fermentos ocasionados nos tecidos tanto de raízes quanto de tronco (Halleen et al., 2003). Em função disso, alguns autores defendem em seus trabalhos a hipótese de que as infecções na base do tronco tendem a ser mais importantes do que nas raízes. Probst et al. (2012), por exemplo, utilizaram a inoculação de *Cylindrocarpon* spp. por fermento na

base do caule de videiras para avaliar a evolução da doença do pé-preto e atingiram níveis de reisolamento próximos a 100% para alguns tratamentos. Isto equivale à estratégia da metodologia proposta neste trabalho, no que se refere à posição da planta onde foi realizada a inoculação.

A partir das análises de reisolamento, pode-se confirmar o êxito no processo de inoculação dos fungos DTVs. De maneira geral, o percentual médio de reisolamento, considerando todos os fungos testados, foi de 63%, variando de 13% (isolado Pch 336) a 87% (isolado Npv 316) (Figura 7B). Houve diferença significativa no percentual de reisolamento de todos os fungos relacionados à podridão-descendente e pé-preto, comparado com a testemunha. A exceção ficou por conta da doença de Petri, onde o isolado Pch336 não se diferenciou da testemunha. Isso demonstra uma possível falta de patogenicidade deste isolado nesta cultivar específica, porém este teste deve ser repetido em outras cultivares para comprovação ou não da patogenicidade. Aqui também vale destacar a diferença significativa entre isolados vinculados à podridão-descendente, onde os isolados de *Neofusicocum parvum* diferiram do isolado de *Botryosphaeria dothidea*, sendo os primeiros com maior percentual de reisolamento. No caso de doença de Petri, também foi observada diferença entre isolados, de modo que Pch 157 apresentou maior percentual de reisolamento que Pch 336.

Portanto, evidencia-se uma possível diferença de agressividade entre as espécies nesta cultivar específica (Figura 7B), o que corrobora estudos de outros autores. Martínez-Diz et al (2019), em trabalho com isolados de *P. chlamydospora* inoculados em estacas de um ano, observaram uma variação no percentual de reisolamento de 100 a 33,3%, conforme a cultivar inoculada. Alaniz et al. (2010) utilizaram o procedimento de inoculação por imersão, avaliação dos sintomas e reisolamento nas raízes, obtendo reisolamento das espécies de *Cylindrocarpon* inoculadas. Gramaje et al. (2016), em teste utilizando isolados de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp., observaram que apenas um isolado de *Phaeoacremonium viticola* não se diferenciou da testemunha. Úrbez-Torres; Gubler (2009), testando a virulência de isolados de fungos da família Botryosphaeriaceae, classificaram isolados de *N. parvum* como altamente virulentos, enquanto que isolados de *B. dothidea* foram classificados como medianamente virulentos.

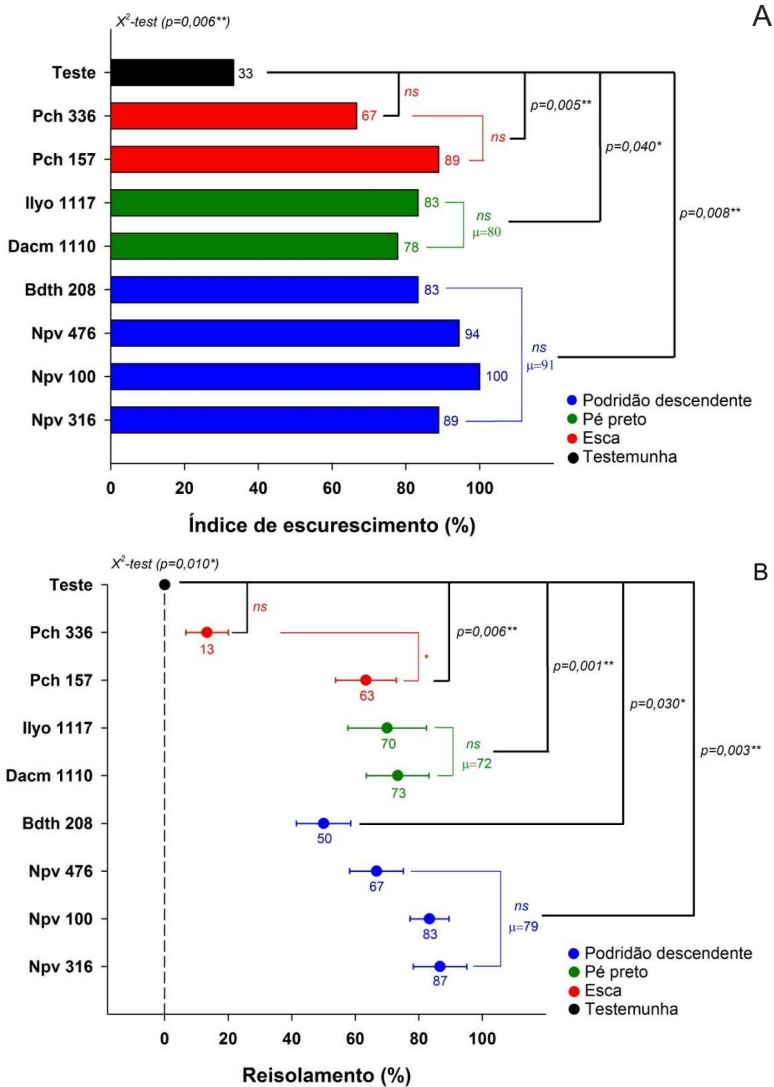
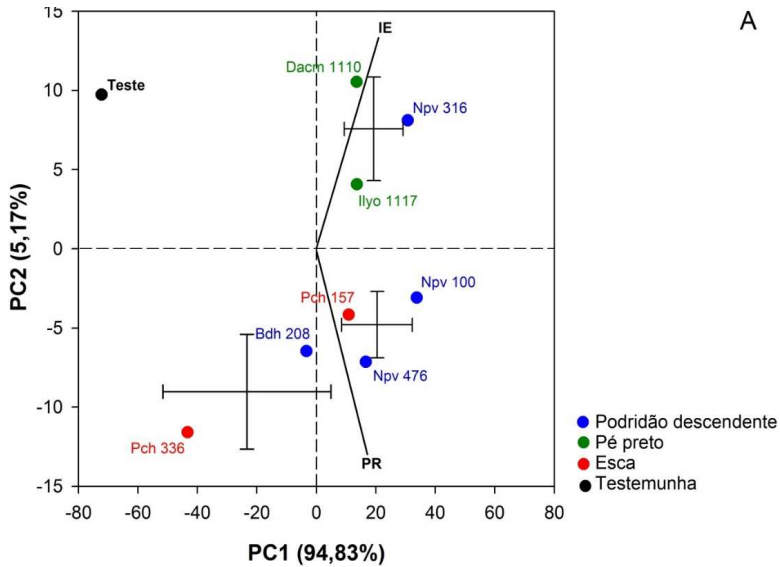


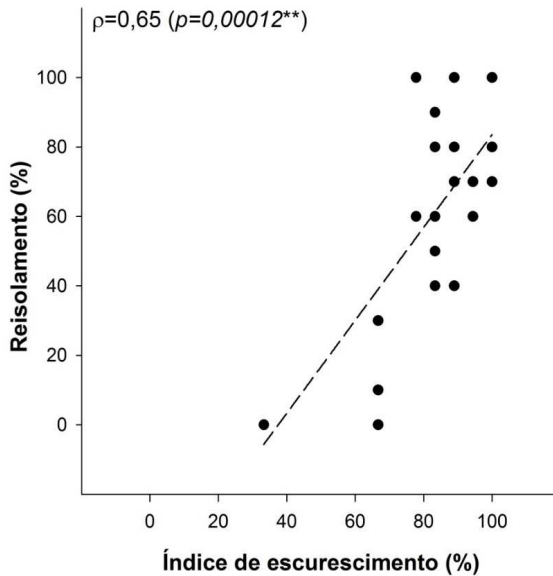
Figura 7. (A) Índice de escurecimento interno, baseado em notas atribuídas utilizando escala diagramática, em plantas da cultivar 'P1103' inoculadas com oito isolados de fungos relacionados a doenças de tronco de videira (Npv316, Npv100, Npv476, Bth208, Dacm1110, llyo1117, Pch157, Pch336) mais a testemunha e (B) Percentual de reisolamento dos oito isolados de fungos relacionados a doenças de tronco de videira em plantas de 'P1103' mais a testemunha. Em A e B, * e ns: Contraste significativo e não-significativo pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), respectivamente. Em B: barras horizontais sobre a média representam seu desvio padrão.

Na determinação de quais grupos de isolados foram mais agressivos, visando formar classes com base em PCA (*Principal Component Analysis*) observa-se no gráfico de escores que 100% da variância total dos dados foi explicada pelos componentes PC1 e PC2 (Figura 8A). A PC1 foi a principal responsável pela separação entre os isolados mais agressivos e a testemunha, descrevendo 94,83% da variância, sendo formados três grupos conforme a agressividade. No detalhamento, o grupo formado pelos isolados Pch 157, Npv 476 e Npv 100 se distribuíram homoganeamente no lado positivo da PC1 e negativo à PC2, em quadrante oposto à testemunha (Figura 8A). Ou seja, no peso do conjunto das duas variáveis, estes isolados causaram a maior agressividade nas plantas. Por outro lado, o grupo constituído pelos isolados Dacm 1110, Ilyo 1117 e Npv 316 teve maior influência no escurecimento, em relação à testemunha. Já nos isolados Pch 336 e Bdh 208 o percentual de reisolamento teve o maior peso, em comparação com a testemunha. Este resultado demonstra que o uso combinado das duas variáveis consideradas neste trabalho foi suficiente para a classificação da agressividade de isolados com relação ao genótipo 'P1103'. Em termos práticos, a maior agressividade observada para os isolados de *P. chlamydospora* e *N. parvum* é de extrema importância para a vitivinicultura sul-brasileira. Conforme observado por Rusin et al. (2015), estes fungos são isolados com muita frequência em vinhedos da Serra Gaúcha, o que os qualifica como fatores bióticos importantes nos sintomas de declínio de plantas nesta região tradicional de cultivo.

Esta classificação da agressividade de isolados se tornaria mais relevante com o aumento do número de genótipos de videira a ser contrastados, possibilitando adotar nos testes os isolados com maior relevância de dano. Além disso, os dados também demonstram a importância da utilização de mais de um isolado por espécie de fungo, principalmente em trabalhos iniciais de prospecção de resistência em diferentes cultivares de videira. Isto fica evidente quando se percebe a similaridade entre os resultados obtidos neste trabalho e os observados por Laveau et al. (2009), os quais também destacam diferenças de agressividade entre isolados de *Phaeoconiella chlamydospora* e entre isolados *Neofusicoccum parvum*. Amponsah et al. (2011) também expõem diferenças na agressividade entre espécies de fungos que causam podridão descendente, onde *N. luteum* e *N. australe* foram mais agressivos que um isolado de *N. parvum*. Portanto, diante desta variabilidade



A



B

Figura 8. (A) Gráfico de escores resultante da PCA formado pelos oito isolados fúngicos associados ao gráfico de pesos das variáveis IE e PR; (B) associação entre percentual de reisolamento e índice de escurecimento. Em A: Barras múltiplas de desvio padrão não sobrepostas indicam discriminação entre grupos de isolados. Em B: **Correlação significativa pelo teste de Spearman ($p<0,01$).

de agressividade entre espécies e dentro de espécies fúngicas, evidencia-se a importância de testes iniciais com isolados.

No conjunto dos resultados, destaca-se uma variação similar dos isolados fúngicos quanto ao índice de escurecimento e o percentual de reisolamento (Figuras 7A e 7B), ou seja, estas duas variáveis se prestam para os estudos de agressividade de isolados fúngicos relacionados a DTV's. Na análise de correlação Spearman, obteve-se uma associação altamente significativa e positiva entre estas variáveis, mas com força moderada ($\rho=0,65$) (Figura 8B). Portanto, quanto maior o índice de escurecimento, maior foi o percentual de reisolamento. Dessa forma, a escala para avaliação de escurecimento interno desenvolvida nesse trabalho tem possibilidade de utilização em trabalhos futuros para análise inicial de da resposta de um grupo maior genótipos com relação aos fungos causadores de DTV's.

Conclusões

Observa-se que a estratégia de aliar inoculação de isolados em plantas micropropagadas possibilita: 1) obter uma inoculação eficiente de todos fungos que são causadores de sintomas internos associados às DTVs; 2) verificar a agressividade de diferentes isolados fúngicos que são relacionados às DTVs e 3) evitar a contaminação cruzada destes fungos, permitindo uma análise independente de cada isolado.

Comparada com as técnicas atualmente disponíveis, a presente metodologia de inoculação de mudas enraizadas, previamente micropropagadas, agregou uniformidade no padrão de plantas enraizadas antes do processo de inoculação e, com isso, aportou maior sensibilidade à identificação dos sintomas induzidos pelas inoculações. A técnica também proporciona redução de tempo, tanto no preparo do material vegetativo quanto nas avaliações, e menor demanda por espaço para caracterização dos efeitos de fungos associados às DTVs.

Outro ponto importante dessa metodologia é que as condições pós-inoculação permitem a análise in vivo da agressividade dos fungos, pois as plantas são mantidas em ambiente favorável ao seu desenvolvimento vegetativo, isto se aproxima mais das condições reais de cultivo do que o método de análise in vitro. Nesta aproximação das condições reais, buscou-

se: (1) restringir o favorecimento dos fungos em detrimento das plantas, conforme observado por Reis et al. (2019) e (2) associar o cultivo em vasos com a técnica de inoculação por fermento, idealizada inicialmente in vitro por Diaz e Latorre (2014), não comprometendo a obtenção dos resultados relativos a agressividade/virulência dos isolados. Por fim, considerando a garantia de inoculação e a análise de agressividade de cada isolado de fungo em condições in vivo, esta técnica ainda poderia possibilitar uma perspectiva futura de emprego na caracterização, em grande escala, da suscetibilidade ou resistência de diferentes genótipos em programas de melhoramento da videira.

Referências

- AGUSTÍ-BRISACH, C.; LEÓN, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Detection of grapevine fungal trunk pathogens on pruning shears and evaluation of their potential for spread of infection. **Plant Disease**, v. 99, n. 7, p. 976-981, July 2015. DOI 10.1094/PDIS-12-14-1283-RE.
- ALANIZ, S.; ARMENGOL, J.; LEÓN, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; 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, 2009. DOI 10.1016/j.mycres.2008.07.002. Epub 2008 Jul 11.
- ALANIZ, S.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ABAD-CAMPOS, P.; ARMENGOL, J. Susceptibility of grapevine rootstocks to *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum*. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 3, p. 305–308, June 2010. DOI 10.1016/j.scienta.2010.04.009.
- ALMANÇA, M. A. K.; ABREU, C. M. de; SCOPEL, F. B.; BENEDETTI, M.; HALLEEN, F.; CAVALCANTI, F. R. **Evidências morfológicas da ocorrência de *Phaeomonilia chlamydospora* em videiras no estado do Rio Grande do Sul**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013. 5p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 134). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/84833/1/Comunicado-Tecnico-134.pdf>. Acesso em: 30 set. 2021.
- ALVES, M. E. B.; TONIETTO, J. **Condições meteorológicas e sua influência na safra vitícola de 2015 em regiões produtoras de vinhos finos do sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2015. 16p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 173). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/130800/1/Comunicado-Tecnico-173.pdf>. Acesso em: 30 set. 2021.
- AMPONSAH, N. T.; JONES, E. E.; RIDGWAY, H. J.; JASPERS, M. V. Identification, potential inoculum sources and pathogenicity of botryosphaeriaceous species associated with grapevine dieback disease in New Zealand. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, n. 3, p. 467-482, Nov. 2011. DOI 10.1007/s10658-011-9823-1.
- ARADHYA, M. K.; DANGL, G. S.; PRINS, B. H.; BOURSQUOT, J. M.; WALKER, M. A.; MEREDITH, C. P.; SIMON, C. J. Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L. **Genetic Research**, v. 81, n. 3, p. 179-192, June 2003. DOI 10.1017/s0016672303006177.

BERLATTO, J. T.; ALMANÇA, M. A. K.; LOESER, B. G.; TORMENTE, F. V.; CAVALCANTI, F. R. Phylogenetic characterization of grapevine trunk pathogens isolated from vineyards in southern Brazil. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON GRAPEVINE TRUNK DISEASES, 10., 2017, Reims, Fr. **Book of abstracts...** Reims, FR: ICGTD, poster session 1., PO.15, 4 a 7 July 2017. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1078052>. Acesso em: 30 set. 2021.

BERTSCH, C.; RAMÍREZ-SUERO, M.; MAGNIN-ROBERT, M.; LARIGNON, P.; CHONG, J.; ABOU-MANSOUR, E.; SPAGNOLO, A.; CLEMENT, C.; FONTAINE, F. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. **Plant Pathology**, v. 62, n. 2, p. 243-265, April 2013. DOI 10.1111/j.1365-3059.2012.02674.x.

BILLONES-BAAIJENS, R.; JONES, E.; JASPERS, M.; RIDGWAY, H. 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.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários - AGROFIT**. 2003. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 10 abr. 2020.

CABRAL, A.; REGO, C.; CROUS, P.W.; OLIVEIRA, H. Virulence and cross-infection potential of *Ilyonectria* spp. to grapevine. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 51, n. 2, p. 340-354, Aug. 2012. Disponível em: <https://oajournals.fupress.net/index.php/pm/article/view/5489>. Acesso em: 30 set. 2021.

CAVALCANTI, F. **Co-cultivo in vitro pode discriminar severidade de podridões do tronco em genótipos de videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2021. 36p. (Embrapa Uva e Vinho. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 20). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/223002/1/BolPesqDes-20-O.pdf>. Acesso em: 30 set. 2021.

CORREIA, K. C.; CÂMARA, M. P. S.; BARBOSA, M. A. G.; SALES JR., R.; AGUSTÍ-BRISACH, C.; GRAMAJE, D.; LEÓN, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ABAD-CAMPOS, P.; ARMENGOL, J.; MICHEREFF, S. J. Fungal trunk pathogens associated with table grape decline in Northeastern Brazil. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 52, n. 2, p. 380-387, 2013. DOI <https://www.jstor.org/stable/42685415>.

DALBÓ, M. A.; MENEZES-NETTO, A. C.; ARIOLI, C. J.; ANDRADE, E. R. Avanços no controle do declínio da videira. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 14., 2015, Fraiburgo. **Anais...** Caçador: Epagri, p. 10-13. 2015.

DAMBROS, R. N.; DALBÓ, M. A.; ARIOLI, C. J.; VEIGA, M. da. Control of grapevine decline with the use of drains and ridges. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, n. 2, p. 84-90, 2016. DOI 10.1590/0100-29452016448.

DE LA FUENTE, M.; FONTAINE, F.; GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J.; SMART, R.; NAGY, Z. A.; BORGIO, M.; REGO, C.; CORIO-COSTET, M. C. Grapevine **Trunk Diseases**. A review. Paris, Fr: OIV Publications, 2016. Disponível em: <http://www.oiv.int/public/medias/4650/trunk-diseases-oiv-2016.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2020.

DIAZ, G. A.; LATORRE, B. A. Infection caused by *Phaeoconiella chlamydospora* associated with Esca-like symptoms in grapevine in Chile. **Plant Disease**, v. 98, n. 3, p. 351-360, March 2014. DOI 10.1094/PDIS-12-12-1180-RE.

ESKALEN, A.; GUBLER, W. D.; KHAN, A. Rootstock susceptibility to *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 40 (Supplement), p. 433-438, 2001. DOI <https://www.jstor.org/stable/44981653>.

FERREIRA, A. B. M.; LEITE, L. G.; HARAKAVA, R.; PADOVANI, C. R.; BUENO, C. J. Incidência da doença de Petri na videira 'Niágara Rosada' no estado de São Paulo – Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 2, p. 124-131, 2017. DOI 10.1590/0100-5405/2154.

GRAMAJE-PÉREZ, 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-PÉREZ, D.; ALANIZ-FERRO, S. M.; ABAD-CAMPOS, M. P.; GARCÍA-Jiménez, J.; ARMENGOL-FORTI, J. Evaluation of grapevine rootstocks against soilborne pathogens associated with trunk diseases. **Acta horticulturae**, v. 1136, p. 245-250, 2016. DOI 10.17660/ActaHortic.2016.1136.34.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Fusariose da videira: resistência de cultivares, sintomas e controle**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1993. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 18). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/87070/1/fusariose.pdf>. Acesso em: 30 set. 2021.

HALLEEN, F.; CROUS, R. W.; PETRINI, O. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. **Australasian Plant Pathology**, v. 32, n. 1, p. 47-52, 2003. DOI 10.1071/AP02062.

HALLEEN, F.; FOURIE, P. H.; LOMBARD, P. J. Protection of grapevine pruning wounds against *Eutypa lata* by biological and chemical methods. **South African Journal of Enology and Viticulture**. v. 31, n. 2, p. 125-132, 2010. DOI 10.21548/31-2-1409 .

HECKLER, L. I. **Reação de porta-enxertos à doença pé-preto e controle biológico de *Campylocarpon pseudofasciculare* em videira**. 2015. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Santa Maria. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/5151>. Acesso em: 24 abril 2020.

HELPER, G. A.; BOCK, F. C.; MARDER, L.; FURTADO, J. C.; COSTA, A. B. de; FERRÃO, M. F. Chemostat: um software gratuito para análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 475-579, 2015.

IBM. **IBM SPSS Statistics for Windows**. , Armonk, NY: IBM Corp, Version 21.0, Released 2012..

INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. **Regiões Produtoras**. Ibravin, 2020.

IBGE. LSPA - **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Edições 2020. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistemico-da-producao-agricola?=&t=resultados>. Acesso em: 10 abril 2020.

LAVEAU, C.; LETOUZE, A.; LOUVET, G.; BASTIEN, S.; GUÉRIN-DUBRANA, L. Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 48, n.1, p. 32–46, May 2009. DOI 10.14601/Phytopathol_Mediterr-2873 .

LAZZAROTTO, J. J.; TAFFAREL, J. C.; MONTEIRO, R. **Caracterização e análise de aspectos sociais, tecnológicos e econômico-financeiros da viticultura gaúcha e catarinense**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2016. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 97). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/144833/1/Doc97.pdf>. Acesso em: 30 set. 2021.

LIMINANA J.-M.; PACREAU, G.; BOREAU, F.; MENARD, E.; DAVID, S.; HIMON-NET, C.; FERMAUD, M.; GOUOULY, J. –P.; LECOMTE, P.; DUMOT, V. Inner necrosis in grapevine

rootstock mother plants in the Cognac area (Charentes, France). **Phytopathologia Mediterranea**, v. 48, n. 1, p. 92–100, 2009. Doi 10.14601/Phytopathol_Mediterr-2878 .

LORCH, W. **Fatal wood disease affects 12 percent of French vineyards**. Wine-Searcher, online, 15 oct. 2014. Disponível em: <https://www.winesearcher.com/m/2014/10/fatal-wood-diseases-affect-12-percent-of-french-vineyards>. Acesso em: 5 Feb. 2020.

MARTÍNEZ-DIZ, M. DEL P.; DÍAZ-LOSADA, E.; BARAJAS, E.; RUANO-ROSA, D.; ANDRÉS-SODUPE, M.; GRAMAJE, D. Screening of Spanish *Vitis vinifera* germplasm for resistance to *Phaeoemoniella chlamydospora*. **Scientia Horticulturae**, v. 246, n. 27, p. 104-109, Feb. 2019. DOI 10.1016/j.scienta.2018.10.049.

McKINNEY, H. H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 31, n. 9, p.827-840, Nov. 1926. Disponível em: <https://naldc.nal.usda.gov/download/IND43967086/PDF>. Acesso em: 30 set. 2021.

MELLO, L. M. R. de; MACHADO, C. A. E. (ed.). **Cadastro Vitícola do Rio Grande do Sul: 2013 a 2015**. 2017. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/cadastro-viticola/rs-2013-2015/dados/obracompleta.html> Acesso em: 1 dez. 2020.

MONDELLO, V.; SONGY, A.; BATTISTON, E.; PINTO, C.; COPPIN, C.; TROTEL-AZIZ, P.; CLEMENT, C.; MUGNAI, L.; FONTAINE, F. Grapevine trunk diseases: A review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. **Plant Disease**, v.;102, n.;7, p.;1189-1217, July 2018. DOI 10.1094/PDIS-08-17-1181-FE.

MUNKVOLD, P.; DUTHIE, J. A. MAROIS, J. J. Reductions in yield and vegetative growth of grapevines due to *Eutypa* dieback. **Phytopathology**, vol. 84, n. 2, p.186-192, Feb. 1994. DOI 10.1094/Phyto-84-186.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-479, July 1962. DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

PROBST, C. M.; JONES, E. E.; RIDGWAY, H. J.; JASPERS, M. V. Cylindrocarpum black foot in nurseries-two factors that can increase infection. **Australasian Plant Pathology**, v. 41, n. 2, p. 157-163, 2012. DOI 10.1007/s13313-011-0103-5.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. Vitivinicultura brasileira: panorama setorial em 2010. Brasília, DF: SEBRAE; Bento Gonçalves: IBRAVIN, Embrapa Uva e Vinho, 2011. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/58339/1/PROTAS-panoramavitivinicultura2010.pdf>. Acesso em: 30 set. 2021.

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/PHTO-09-18-0349-RVW.

ROLSHAUSEN, P. E.; ÚRBEZ-TORRES, J. R.; ROONEY-LATHAM, S.; ESKALEN, A.; SMITH, R. J.; GUBLER, W. D. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 61, n. 1, p. 113-119, March 2010. DOI <https://www.ajevonline.org/content/61/1/113>.

ROMANAZZI, G.; MUROLO, S.; PIZZICHINI, L.; NARDI, S. Esca in young and mature vineyards, and molecular diagnosis of the associated fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, n. 2, p. 277-290, May 2009. DOI 10.1007/s10658-009-9481-8.

- RUSIN, C.; OLIVEIRA, M. R.; DEUS, C. N. S. de; NONDILLO, A.; ALMANÇA, M. A. K. Presença de fungos relacionados a doenças de tronco e de pérola-da-terra em plantas de videira com sintoma de declínio In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 15., 2015, Fraiburgo. **Anais...** Caçador: Epagri, v. 2, p.108, 2015.
- SILVA, M. A. da; CORREIA, K. C.; BARBOSA, M. A. G.; CÂMARA, M. P. S.; GRAMAJE, D.; MICHEREFF, S. J. Characterization of *Phaeoacremonium* isolates associated with Petri disease of table grape in Northeastern Brazil, with description of *Phaeoacremonium nordesticola* sp. nov. **European Journal of Plant Pathology**, v. 149, p. 695-709, 2017. DOI 10.1007/s10658-017-1219-4.
- SÔNEGO, O. R. **Avaliação de porta-enxertos de videira frente a fusariose, em condições de campo**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1998. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 28). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/25998/1/ComT28.pdf>. Acesso em: 30 set. 2021.
- ÚRBEZ-TORRES, J. R.; GUBLER, W. D. Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species isolated from grapevine cankers in California. **Plant Disease**, v. 93, n. 6, p. 584-592, June 2009. DOI 10.1094/PDIS-93-6-0584.
- ÚRBEZ-TORRES, R.; HAAG, P.; BOWEN, P.; O'GORMAN, T. Grapevine trunk diseases in British Columbia: Incidence and characterization of the fungal pathogens associated with esca and Petri diseases of grapevine. **Plant Disease**, v.;98, n.;4, p.;469-482, April 2014. DOI 10.1094/PDIS-05-13-0523-RE.
- WESTPHALEN, S. L.; MALUF, J. R. T. **Caracterização das áreas bioclimáticas para o cultivo de *Vitis vinifera* L.:** regiões da Serra do Nordeste e Planalto do Estado do Rio Grande do Sul. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2000. 98 p.
- YAN, J.; XIE, Y.; ZHANG, W.; WANG, Y.; LIU, J.-K. J.; HYDE, K. D.; SEEM, R. C.; ZHANG, G. -Z.; ZHONG-YUE,W.; YAO, S. -W.; BAI, X. -J.; DISSANAYAKE, A. J.; PENG, Y.; LI, X. -H. Species of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in China. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 221-236, July 2013. DOI 10.1007/s13225-013-0251-8.
- ZART, M. **Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica do ataque da pérola-da-terra, *Eurhizococcus brasiliensis* (WILLE, 1922) (HEMIPTERA: MARGA-RODIDAE), em videiras**. 2012. 98 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, June 2012.
- ZART, M.; CÉSARO, A. D.; SANTOS, H. P. dos; SOUZA, P. V. D. de. Caracterização morfo-fisiológica de plantas de videira atacadas por pérola-da-terra. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 3, p. 1187-1200, maio/jun. 2014. DOI 10.5433/1679-0359.2014v35n3p1187.

Embrapa

Uva e Vinho



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA



CGPE