

Camila Bitencourt

**Ocorrência de oósporos de *Plasmopara viticola*, agente causal do míldio da videira na mesorregião serrana de Santa Catarina**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Leocir José Welter

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Maria Oliveira Pierre Castro.

Curitiba, SC  
2019

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

Bitencourt, Camila

Ocorrência de oósporos de *Plasmopara viticola*, agente causal do míldio da videira na mesorregião serrana de Santa Catarina / Camila Bitencourt ; orientador, Leocir José Welter, coorientador, Patrícia Maria Oliveira Pierre Castro, 2019.

84 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos, Programa de Pós Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais, Curitibanos, 2019.

Inclui referências.

1. Ecossistemas Agrícolas e Naturais. 2. Oomiceto. 3. Oósporo. 4. Resistência. 5. *Vitis* spp.. I. Welter, Leocir José . II. Oliveira Pierre Castro, Patrícia Maria . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais. IV. Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CAMPUS DE CURITIBANOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOSISTEMAS AGRÍCOLAS E**  
**NATURAIS - PPGEAN**

## **Termo de aprovação**

**Ocorrência de oósporos de *Plasmopara viticola*, agente causal do míldio da videira na mesorregião serrana de Santa Catarina.**

**Por**

**CAMILA BITENCOURT**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências, área de concentração Ciências Agrárias, no Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina, pela Comissão formada pelos membros:

---

Dr. Leocir José Welter – Universidade Federal de Santa Catarina  
(UFSC)  
Presidente e orientador

---

Dr. Rubens Onofre Nodari – Universidade Federal de Santa Catarina  
(UFSC)  
Membro interno

---

Dr. Felipe Augusto Moretti Ferreira Pinto – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri)  
Membro externo

Curitibanos, 26 de fevereiro de 2019.

Aos meus pais Adair e Irene que sempre foram a minha fonte de amor e inspiração, dedico.





## AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as bênçãos concebidas;

Ao Prof. Dr. Leocir José Welter e a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Maria Oliveira Pierre Castro, pela orientação, ensinamentos, motivação, paciência e pela amizade. Obrigada por acreditarem em mim, vocês são fonte de inspiração;

Ao Sr. Acir Maciel e a Sr<sup>ª</sup>. Vilma Fontana Maciel, por permitir a realização do estudo em sua propriedade, localizada em Curitiba/SC;

À Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), em especial ao Dr. Felipe Augusto Moretti Ferreira Pinto, por permitir que o estudo fosse realizado na unidade experimental de São Joaquim/SC, e por auxiliar no desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus queridos pais Adair Paiva Bitencourt e Irene Schulka Bossy, e as minhas irmãs Iriany Bossy e Carolina Bitencourt, por todo amor e por não medirem esforços para a concretização desta etapa, amo vocês;

Ao meu companheiro Leonardo Francisco Back, por todo apoio, parceria, amor, paciência e pela compreensão nos momentos de minha ausência, você é único;

À minha filha Maria Luiza Back, mesmo tão pequena, obrigada por todo amor, por ser a minha motivação diária, você é a minha vida;

Aos membros do Núcleo de Estudos da Uva e do Vinho (NEUVIN - Curitiba/SC), em especial a Beatriz Ribeiro Gomes, Andriele Caroline Morais e ao Cristian Valdenir Mecabô, obrigada pelos momentos de descontração, pela amizade e por toda ajuda durante este período;

À Jhennifer M. Dias, por auxiliar nas incansáveis buscas pelos oósporos;

Ao Edison Cardona Medina, doutorando do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela disponibilidade e ajuda;

Aos técnicos do laboratório Gabriel F. G. Olivo, Renata A. Schmidt, Aline C. da Silva e Flávia Krechmer, por toda ajuda e amizade durante este período, vocês são os melhores;

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais, e também aos colegas e amigos, em especial a Melina I. Bonatto, Luciane T. Stanck, Bruna H. Ricardo, Cristina Belincanta, Aline Bireahls, Valdeir P. Lima, Pedro H. da Silva Medrado e Fábio Sampaio, obrigada por vivenciarem este período ao meu lado e pela amizade;

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em especial aos professores Dr. Lírio Luiz Dal' Vesco, Dr<sup>a</sup> Adriana Terumi Itako, Dr. Paulo C. P. Fermino Junior, Dr<sup>a</sup>. Glória R. Botelho e ao Dr. Cristian Soldi que contribuíram para a execução deste trabalho;

Ao programa de Bolsas Universitárias de Santa Catarina UNIEDU/FUMDES, pela concessão da bolsa.

Muito obrigada.

“O importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo mundo vê”.

(Arthur Schopenhauer)

## RESUMO

O *Plasmopara viticola*, agente etiológico do míldio da videira, é um parasita obrigatório, pseudofungo heterotático e se encontra dentro da classe dos oomicetos. O ciclo reprodutivo do patógeno consiste das fases assexuada, por meio da produção clonal de esporângios que liberam zoósporos. E também da fase sexuada, por meio da formação da estrutura de resistência do patógeno, conhecido como oósporo. Os oósporos são formados no outono e liberados no ambiente durante o inverno. Em condições favoráveis, estes germinam produzindo o macroesporângio e após os zoósporos. No Brasil, não há estudo científico comprovando a formação de oósporos de *P. viticola*. No entanto, as regiões de altitude de Santa Catarina apresentam os fatores essenciais para a ocorrência desta etapa no ciclo, como o agente causador da doença, o ambiente favorável e o hospedeiro suscetível. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi buscar evidências da reprodução sexuada do *P. viticola* na mesorregião serrana de Santa Catarina. Para as diferentes metodologias, folhas da cv. 'Cabernet Sauvignon' naturalmente infectadas com o míldio da videira foram coletadas no início do outono em um vinhedo comercial no município de Curitiba/SC e na Estação Experimental da Epagri de São Joaquim (EESJ). Os dados climáticos foram obtidos através das estações meteorológicas próximas aos locais da coleta. Os tecidos vegetais utilizados para a identificação e caracterização dos oósporos de *P. viticola* foram avaliados na microscopia de luz de campo claro (discos foliares e cortes histológicos) e também na microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras para a análise de viabilidade e germinação dos oósporos foram armazenadas a campo, durante o outono e o inverno, próximo aos locais de coleta. As avaliações ocorreram nos meses de setembro, outubro e novembro, onde em cada mês foi avaliada uma amostra. Oósporos de *P. viticola* foram identificados nos dois locais de estudo. Os esporos sexuais apresentaram o formato arredondado, a parede espessa e o diâmetro característico. O diâmetro dos oósporos variou de 20,00 a 49,15 µm, sendo o tamanho médio para o município de Curitiba de 31,61 µm e para o município de São Joaquim de 22,20 µm. Os corantes azul de toluidina e eosina Y contribuíram para a visualização da estrutura sexual do *P. viticola* no tecido do hospedeiro. Nas secções transversais, foi possível observar que os oósporos são formados na parte central do mesófilo, entre o parênquima paliçádico e o parênquima esponjoso. A MEV permitiu identificar pela primeira vez as principais características morfológicas externas do oósporo de *P. viticola*. O corante tetrazólio possibilitou a avaliação do percentual de viabilidade

dos oósporos. Não houve diferença significativa na viabilidade dos oósporos entre os diferentes meses para os diferentes locais. No entanto, os oósporos viáveis apresentaram diferença significativa quando comparados com oósporos inviáveis. O processo de germinação dos oósporos e a formação do macroesporângio não ocorreram nas condições laboratoriais utilizadas no presente estudo. No entanto, a análise dos dados climáticos dos dois locais demonstram que as variáveis climáticas foram adequadas para o processo de maturação e germinação dos oósporos em condições naturais. Este é o primeiro estudo científico que comprova a formação de oósporos de *P. viticola* no Brasil. Deste modo, conclui-se que a mesorregião serrana de Santa Catarina apresenta os fatores essenciais para a formação e maturação dos oósporos de *P. viticola*. Estudos futuros são necessários para comprovar a germinação dos oósporos, e a formação dos zoósporos provenientes dos esporos sexuais. A comprovação da reprodução sexuada de *P. viticola* irá alterar o paradigma do manejo do míldio da videira.

**Palavras-chave:** Oomiceto. Oósporo. Resistência. Melhoramento. *Vitis* spp.



## ABSTRACT

The *Plasmopara viticola*, an etiological agent from the downy mildew, is an obligate parasite, heterothallic pseudofungi and is inside the oomycetes class. The pathogen reproductive cycle consists of asexual phases, by means of clonal production of sporangia which release zoospores. Also of sexual phase, by means of the formation of the structure of resistance of pathogen, known as oospore. The oospores are formed in the fall and released on the environment during the winter. In favorable conditions, they germinate producing a macrosporangio and later the zoospores. In Brazil, there is no scientific study to prove the formation of oospore of *P. viticola*. However, the altitude regions of Santa Catarina present the essential factors for the occurrence of this stage in the cycle, as the causing agent of the illness, the favorable environment and the susceptible host. On this, the aim of the present work has been to find evidences of occurrence of the sexual reproduction on the *P. viticola* in the mountain mesoregion of Santa Catarina. For the different methodologies, leaves of the cv. "Cabernet Sauvignon" naturally infected by the vine mildew were collected at the beginning of the fall in a commercial vineyard in the city of Curitiba/SC and in the Estação Experimental da Epagri of São Joaquim (EESJ). The climate data were obtained through the meteorological stations near the places of collection. The vegetal tissues used for the identification and characterization of the oospores of *P. viticola* were evaluated in the microscopy of light field (foliar discs and histological cuts) and also in the scanning electron microscopy (SEM). The samples for the analyses of the viability of the germination of the oospores were stored on the field, during the fall and winter, near the places of collection. The evaluations occurred in the months of September, October, November and December, and in each month a sample was evaluated. Oospores of *P. viticola* were identified in two of the places studied. The sexual oospores present a circle shape, a thick wall and a characteristic diameter. The diameter of the oospores varied from 20,00 to 49,15  $\mu\text{m}$ , being the medium size for the city of Curitiba 31,61  $\mu\text{m}$  and for the city of São Joaquim 22,20  $\mu\text{m}$ . The blue staining of toluidine and eosin Y contributed to the visualization of the sexual structure of the *P. viticola* in the host tissue. In the cross sections it was possible to observe that the oospores are formed in the central of the mesophyll, between the palisade parenchyma and the spongy parenchyma. The SEM permitted the identification by the first time of the external morphological characteristics of the oospores of *P. viticola*. The tetrazolium coloring made it possible the evaluation of the percentage of the viability of the

oospores. There was no significant difference in the viability of the oospores between the different months for the different sites. However, viable oospores had a significant difference when compared to non-viable oospores. There was no significant difference in the viability of the oospores between the different months for the different sites. However, viable oospores had a significant difference when compared to non-viable oospores. The process of germination of the oospores and the formation of the macrosporangio did not occur in lab conditions used in this study. However, the climatic data analyses of the two places show that the climatic variables were adequate for the process of maturation and germination of the oospores in natural conditions. This is the first scientific study that proves the formation of the oospores of *P. viticola* in Brazil. On this, it is concluded that the mountain mesoregion of Santa Catarina features essential factors for the formation and maturation of the oospores of *P. viticola*. Further studies are necessary to prove the germination of the oospores, and the formation of oospores coming from sexual spores. The proof of the sexual reproduction of the *P. viticola* will alter the paradigm of the management of the downy mildew of the vine.

**Keywords:** Breeding. Oomycete. Oospore. Resistance. *Vitis* spp.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo reprodutivo do <i>P. viticola</i> , agente etiológico do míldio da videira. ....	34
Figura 2 - Local da coleta do material vegetal para a identificação dos oósporos.....	39
Figura 3 - Valores diários de precipitação (mm), temperatura média (°C), temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C) e umidade relativa do ar (%) nos meses de março e abril de 2017 no município de Curitiba – Santa Catarina.....	44
Figura 4 Valores diários de precipitação (mm), temperatura média (°C), temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C) e umidade relativa do ar (%) nos meses de março e abril de 2018 no município de São Joaquim – Santa Catarina.....	45
Figura 5 - Discos foliares da cv. ‘Cabernet Sauvignon’ com os sintomas típicos da doença do míldio da videira em estágio avançado (seta), após o processo de fixação e clarificação.....	46
Figura 6 - Oósporos de <i>P. viticola</i> encontrados em discos foliares da cv. ‘Cabernet Sauvignon’.....	47
Figura 7 – Percentual dos oósporos com diferentes diâmetros encontrados em discos foliares da cv. ‘Cabernet Sauvignon’.....	49
Figura 8 - Secções transversais de folhas da cv. ‘Cabernet Sauvignon’ coradas com Eosina Y com a presença de oósporos.....	50
Figura 9 - Secções transversais de folhas da cv. ‘Cabernet Sauvignon’ coradas com Azul de toluidina com a presença de oósporos..	52
Figura 10 - Oósporos de <i>P. viticola</i> encontrados na mesorregião serrana de Santa Catarina visualizados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
Figura 11 - Valores diários de precipitação (mm), temperatura média (°C), temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C) e umidade relativa do ar (%) nos meses de abril a novembro de 2018 no município de Curitiba – Santa Catarina.....	55
Figura 12 - Valores diários de precipitação (mm), temperatura média (°C), temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C) e umidade relativa do ar (%) nos meses de abril a novembro de 2018 no município de São Joaquim – Santa Catarina.....	55
Figura 13 - Viabilidade dos oósporos de <i>P. viticola</i> provenientes de folhas da cv. ‘Cabernet Sauvignon’. As avaliações foram realizadas	

após as amostras serem mantidas a 36°C por 24 horas, depois da adição do corante tetrazólio (0,1%).	56
Figura 14 - A-B. Oósporos de <i>P. viticola</i> com grandes glóbulos em sua composição. Estes não coloriram e foram considerados inviáveis/anormais.	57
Figura 15 - Oósporos de <i>P. viticola</i> após 14 dias de incubação em Ágar-água (1%), e sob a temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas.	58

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Percentual de viabilidade dos oósporos de *P. viticola* ao longo do tempo em 2018, encontrados em folhas da cv. 'Cabernet Sauvignon' para os municípios de Curitibanos/SC e São Joaquim/SC..57



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem  
μL – Microlitros  
μm – Micrômetro  
BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio  
CBS – Curitibaanos  
CCA – Centro de Ciências Agrárias  
CIRAM – Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina  
cv – Cultivar  
dai – Dias após a inoculação  
EESJ – Estação Experimental da Epagri de São Joaquim  
Epagri – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A  
INMET – Instituto Nacional de Meteorologia  
LCME – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica  
LFDGV – Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal  
m – metros  
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura  
min – Minutos  
mL – Mililitro  
mm – Milímetros  
°C – graus Celsius  
°GL – grau Gay Lussac  
pH – Potencial Hidrogeniônico  
spp – espécie  
TCT – 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
1.1	OBJETIVOS .....	29
1.1.1	Objetivo geral .....	29
1.1.2	Objetivos específicos .....	29
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>30</b>
2.1	CULTURA DA VIDEIRA.....	30
2.1.1	Importância econômica e social da viticultura .....	31
2.2	O MÍLDIO DA VIDEIRA .....	32
2.2.1	Agente etiológico: <i>Plasmopara viticola</i> .....	33
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
3.1	FORMAÇÃO DOS OÓSPOROS DE <i>P. viticola</i> .....	38
3.1.1	Coleta dos dados climáticos.....	38
3.2.1	Coleta do material vegetal para a identificação dos oósporos de <i>P. viticola</i> .....	38
3.2	MICROSCOPIA DE LUZ DE CAMPO CLARO .....	40
3.2.1	Identificação e caracterização morfológica dos oósporos de <i>P. viticola</i> .....	40
3.2.2	Distribuição dos oósporos de <i>P. viticola</i> no tecido vegetal.....	40
3.2.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	41
3.3	VIABILIDADE E GERMINAÇÃO DOS OÓSPOROS DE <i>P. viticola</i> .....	42
3.3.1	Coleta do material para a avaliação da viabilidade e germinação dos oósporos.....	42
3.3.2	Viabilidade e germinação dos oósporos de <i>P. viticola</i> .....	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
4.1	FORMAÇÃO DOS OÓSPOROS DE <i>P. viticola</i> .....	44
4.1.1	Dados climáticos no período da coleta das folhas.....	44
4.1.2	Microscopia de luz de campo claro.....	45
4.1.3	Distribuição dos oósporos de <i>P. viticola</i> no tecido vegetal.....	50
4.1.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	52
4.2	VIABILIDADE E GERMINAÇÃO DOS OÓSPOROS DE <i>P. viticola</i> .....	54
4.2.1	Dados climáticos.....	54
4.2.2	Viabilidade dos oósporos de <i>P. viticola</i> .....	56
<b>5</b>	<b>DISCUSSÕES</b> .....	<b>59</b>
5.1	FORMAÇÃO DOS OÓSPOROS DE <i>P. viticola</i> .....	59
5.1.1	Dados climáticos no período inicial do outono .....	59
5.1.2	Microscopia de luz de campo claro.....	62

<b>5.1.3</b>	<b>Distribuição dos oósporos de <i>P. viticola</i> no tecido vegetal</b>	<b>64</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....</b>	<b>66</b>
<b>5.2</b>	<b>VIABILIDADE E GERMINAÇÃO DOS OÓSPOROS DE <i>P. viticola</i> .....</b>	<b>68</b>
<b>5.3</b>	<b>IMPLICAÇÕES DA FORMAÇÃO DOS OÓSPOROS.....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Estudos demonstram que as videiras produzidas nas regiões de altitude de Santa Catarina apresentam características particulares em relação as demais regiões vitícolas no Brasil. A produção de vinhos finos nestas regiões é realizada por meio de cultivares europeias (*Vitis vinifera* L.), tais como: Merlot, Cabernet Sauvignon e Sauvignon Blanc. Estas cultivares em condições de temperatura e umidade adequadas apresentam maior suscetibilidade a doenças quando comparadas às cultivares americanas (*V. labrusca*), resultando em maiores custos de produção e grandes perdas econômicas (ELLIS, 2008; GIOVANNINI, 2014; TOFFOLATTI et al., 2018).

O míldio da videira é a principal doença que acomete a cultura da videira na região sul do Brasil. A doença pode ser encontrada em praticamente todas as regiões vitícolas do mundo, e ocorre de modo mais severo nas regiões que apresentam as condições climáticas favoráveis para o seu desenvolvimento, com preferência em locais de temperatura de 17 a 22°C, com alta umidade relativa do ar e elevada precipitação na primavera e no verão (GESSLER; PERTOT; PERAZZOLLI, 2011). Todas as cvs. europeias são suscetíveis ao míldio da videira. O seu agente etiológico é o pseudofungo *P. viticola*, um parasita obrigatório que se encontra dentro da classe dos oomicetos. O ciclo reprodutivo do patógeno está dividido em duas fases - a fase assexuada por meio da produção de esporângios que liberam zoósporos. E a fase sexuada, que formam as estruturas especializadas de resistência do patógeno, conhecidos como oósporos (AMORIM; REZENDE, FILHO, 2011). Os esporos sexuais são formados no outono através do processo de plasmogamia, cariogamia e meiose. No inverno estes são liberados no ambiente. Em condições favoráveis, os oósporos germinam produzindo os macroesporângios que contém zoósporos. Através da chuva e do vento, estes zoósporos são dispersos no ambiente, parasitando os órgãos vegetativos da videira e ocasionando as infecções primárias.

Apesar do *P. viticola* ter sido estudado desde a sua introdução nos vinhedos europeus na década de 80, alguns aspectos básicos da sua biologia reprodutiva permanecem desconhecidos. No Brasil, os pesquisadores Cirne, Sonégam e Grigoletti Junior (1988) relataram a presença de oósporos de *P. viticola* na região da Serra Gaúcha. No entanto, o trabalho foi publicado como “pesquisa em andamento” e nenhum trabalho científico foi publicado confirmando se realmente a estrutura era formada nas condições climáticas do local. A literatura mais recente sugere que a reprodução do patógeno no Brasil é realizada por

meio da intensa produção de micélios (reprodução assexuada) e que a reprodução sexuada no estado de São Paulo tem pouca influência no ciclo de vida do patógeno (AMORIM; SPÓSITO; KUNIYUKI, 2016; CAMARGO, 2017).

A formação dos oósporos de *P. viticola* ocorre em regiões de clima temperado, no período do outono. As regiões de altitude elevada (acima de 900 m) no sul do Brasil, como por exemplo, os municípios de Curitiba/SC e de São Joaquim/SC, são conhecidas pelas suas baixas temperaturas, apresentando condições semelhantes às ideais já conhecidas para a formação de oósporos (LEHOCZKY, 1956; GRÜNZEL, 1961; WONG; BURR; WILCOX, 2001; GOBBIN et al., 2006). Segundo a classificação de Koppen, a mesorregião serrana de Santa Catarina apresenta o clima do tipo Cfb subtropical úmido, com verões amenos com temperatura máxima média de 22,0°C e mínima média de 12,4°C (EMBRAPA, 2012).

Além das condições climáticas, o *P. viticola* é considerado um oomiceto heterotálico. Isto significa que o patógeno apresenta o micélio autoestéril e necessita da união de dois talos compatíveis (A1 e A2) para a formação do oósporo. Levando em consideração estas informações, levantou-se a hipótese de que nas condições climáticas da mesorregião serrana do estado de Santa Catarina a estrutura sexual do míldio da videira seja formada, uma vez que, a região apresenta os fatores essenciais para a ocorrência desta etapa no ciclo do patógeno: i) o agente causal da doença; ii) as condições ambientais favoráveis e; iii) o hospedeiro suscetível. Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho foi buscar evidências da ocorrência da reprodução sexuada do *P. viticola* na mesorregião serrana de Santa Catarina.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Buscar evidências da ocorrência da reprodução sexuada do *P. viticola* na mesorregião serrana de Santa Catarina.

### 1.1.2 Objetivos específicos

(i) Identificar a formação de oósporos de *P. viticola* durante o outono, em folhas da cv. ‘Cabernet Sauvignon’, nos municípios de Curitiba/SC e São Joaquim/SC;

(ii) Analisar por meio de técnicas histológicas a distribuição dos oósporos no tecido vegetal;

(iii) Caracterizar a morfologia do oósporo de *P. viticola* através da microscopia eletrônica de varredura (MEV);

(iv) Avaliar a viabilidade e germinação dos oósporos de *P. viticola* durante o ciclo vegetativo e reprodutivo da cultura da videira.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CULTURA DA Videira

A videira (*Vitis* spp.) é considerada uma das frutas de domesticação mais antigas que se tem conhecimento. Por meio de registros fósseis das suas folhas, foi identificado que esta cultura surgiu na região da Groelândia no início do período terciário há milhões de anos antes do surgimento do homem (ALVARENGA et al., 1991). A cultura é pertencente à classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Rhamnales, família Vitaceae e ao gênero *Vitis* (BARBIERI; STEEMPT, 2008). Este gênero é formado por aproximadamente 70 espécies distribuídas ao longo do continente americano (30 espécies; ex. *V. labrusca*), asiático (40 espécies; ex. *V. amurensis*) e europeu (uma espécie; *Vitis vinifera*) (TÖPFER et al., 2011).

A videira é classificada como angiosperma eudicotiledônea, planta perene, lenhosa, caducifólia e sarmentosa. Atinge até sete metros de altura, apresenta folhas verdes, grandes e palmadas e possui gavinhas como órgãos de sustentação (GIOVANNINI, 2014). O ciclo da cultura varia em função da cultivar, do clima, solo e os diversos tratamentos culturais. De maneira geral, o início da brotação é influenciado pelo aumento da temperatura, iniciando o processo no final do inverno e/ou início da primavera (DELOIRE et al., 2005). A floração e frutificação ocorrem nos meses de novembro a março na região sul e o ano todo na região do nordeste (GIOVANNINI, 2014). A produção dos frutos tem início a partir do terceiro ano após o plantio, passando por vários estágios de desenvolvimento até chegar a sua produção final. O estágio final marcado pela queda das folhas e pelo repouso vegetativo é influenciado pela redução da temperatura e ocorre nos meses do inverno (BUSATO et al., 2013).

Mundialmente, as cultivares de *V. vinifera* apresentam grande importância econômica e são utilizadas principalmente para o consumo *in natura* ou são processados em sucos, vinhos e espumantes. Entre as diferentes uvas utilizadas para a elaboração de vinho, a cultivar ‘Cabernet Sauvignon’ se destaca como uma das mais produzidas a nível mundial. Originária de Bordeaux na França, o surgimento desta cultivar é o resultado do cruzamento espontâneo da Cabernet Franc com a Sauvignon Blanc (BOWERS; MEREDITH, 1997). Atualmente, a Cabernet Sauvignon é uma das cvs. viníferas que apresenta maior área de cultivo em Santa Catarina. Este fato pode estar relacionado à questão cultural e também aos diversos estudos realizados com a cultivar, onde demonstram

que esta apresenta um bom potencial para cultivo e produção de vinhos em diferentes locais do estado catarinense (FALCÃO et al., 2010; BORGHEZAN et al., 2011; BRIGHENTI et al., 2013).

### **2.1.1 Importância econômica e social da viticultura**

As regiões produtoras de uva no Brasil são caracterizadas pelas diferentes condições edafoclimáticas, sendo regiões de clima temperado, subtropical e tropical (GIOVANNINI, 2014). Nestas regiões a produção de uvas é destinada ao consumo *in natura* e também para o processamento (vinhos, sucos e derivados) (CARVALHO; TREICHEL; BELING, 2016). Destes produtos processados, podem ser obtidos subprodutos com alto valor agregado para a indústria química, cosmética e farmacêutica. Estes subprodutos apresentam propriedades antioxidantes que servem para combater radicais livres e prevenir as doenças degenerativas (BALASUNDRAM et al., 2006). Além disso, possuem alto teor de fibras e de flavonoides, podendo ser utilizados em alimentos de confeitaria e suplementos vitamínicos (LOPES, 2013).

Aproximadamente 30.000 famílias brasileiras tem a produção vitícola como a principal fonte de renda na propriedade (ZANUS, 2015). No ano de 2018, o Brasil produziu cerca de 1.451.136 mil toneladas de uvas em 73.067 hectares de área plantada (LSPA, 2018). Esta produção está concentrada principalmente nos estados do Rio Grande do Sul (822.689 mil toneladas), Pernambuco (314.668 mil toneladas), São Paulo (128.327 mil toneladas), Santa Catarina (61.256 mil toneladas), Paraná (54.000 mil toneladas) e Bahia (46.128 mil toneladas) (LSPA, 2018). Na safra de 2017, a produção nacional de uvas destinadas ao processamento foi de 818.783 milhões de quilos, representando 48,74% da produção nacional e os 51,26% restantes foram destinados ao consumo *in natura* (KIST et al., 2018).

No ranking nacional, o estado de Santa Catarina é o quarto maior produtor de uva, com produção de 61.256 mil toneladas em uma área total de 4.257 hectares (KIST et al., 2018). O estado apresenta diferentes regiões de cultivo como o Vale do Rio do Peixe, Planalto Catarinense, Vale do Rio Tijucas e Litoral Sul (PROTAS; CAMARGO, 2010). As regiões vitícolas de altitude no Planalto Catarinense apresentam algumas características climáticas particulares, como altitude superior a 900 m e latitude de 28° S e longitude 49° O, contribuindo para o cultivo de videiras europeias (*V. vinifera*) para a produção de vinhos finos e espumantes (PROTAS; CAMARGO, 2010; BORGHEZAN, et al., 2011). A atividade vitivinícola tem contribuído com às pequenas empresas a se desenvolver

e tem contribuído para que os pequenos agricultores produzam vinhos e sucos, bem como desenvolvam atividades econômicas ligadas ao turismo e à gastronomia, promovendo a geração de emprego e renda extra na propriedade.

## 2.2 O MÍLDIO DA VIDEIRA

O ciclo da videira pode ser comprometido por diversos fatores, entre os principais estão as doenças que são ocasionadas por diferentes grupos de microrganismos como as bactérias, fungos e vírus (GIOVANNINI, 2014; CAETANO et al., 2017). O míldio da videira se destaca como uma das principais doenças da cultura apresentando ampla distribuição e ocorrendo em praticamente todas as regiões vitícolas do mundo (AMORIM; SPÓSITO; KUNIYUKI, 2016). A doença ocorre de modo mais severo nas regiões que apresentam as condições climáticas favoráveis para o seu desenvolvimento, com preferência nos locais com temperatura de 17 a 22°C, com alta umidade relativa do ar, e que apresentem o acúmulo de neblina e ocorrência de orvalho (AGRIOS, 2005).

O míldio ataca todos os órgãos verdes da planta. O sintoma inicial ocorre na face adaxial das folhas por meio de pequenas manchas de coloração verde-clara, conhecidas como “manchas de óleo” (GESSLER; PERTOT; PERAZZOLLI, 2011). No início da infecção esta mancha é pequena, tem bordas indefinidas e é facilmente visualizada quando a folha é colocada contra a luz (AMORIM; SPÓSITO; KUNIYUKI, 2016). Em condições de alta umidade, na face abaxial correspondente ao local da mancha, surge uma eflorescência densa e esbranquiçada (denominada de mofo-branco), formadas por estruturas reprodutivas assexuadas do patógeno (AGRIOS, 2005). Com o desenvolvimento da doença estas lesões tornam-se amareladas e escuras quando necrosadas (AMORIM; REZENDE, FILHO, 2011). Em ataques mais severos, os ramos novos da planta são recobertos pela eflorescência, paralisando o desenvolvimento destas partes vegetais. Nas inflorescências, a doença deixa-as com aspecto de gancho e provoca a sua morte. Nas bagas novas o patógeno desenvolve a eflorescência esbranquiçada, já as bagas mais desenvolvidas se tornam escuras e moles soltando-se facilmente do cacho (GESSLER; PERTOT; PERAZZOLLI, 2011).

De maneira geral, a ocorrência do míldio nos parreirais reduz a capacidade fotossintética da planta prejudicando o desenvolvimento vegetativo e a produção dos frutos do ano seguinte. Caso medidas de controle não sejam adotadas, a doença pode ocasionar cerca de 50 - 75%

de perda na cultura (AMORIM; SPÓSITO; KUNIYUKI, 2016). Estudos analisando um cenário futuro de mudanças climáticas indicam que o míldio da videira continuará tendo grande importância em relação às demais doenças da cultura, ocorrendo em Santa Catarina com maior pressão (severidade) nos meses de outubro a maio (ANGELOTTI et al., 2017).

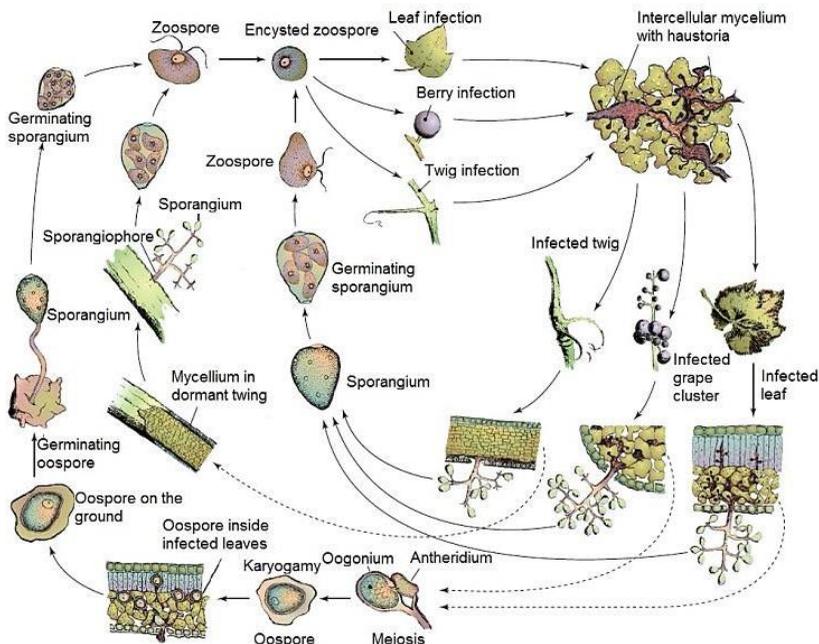
Esta doença é considerada policíclica, isto significa que várias gerações do patógeno ocorrem em um mesmo ciclo, fazendo com que a quantidade de inóculos produzidos ao final de cada ciclo de vida do patógeno seja amplificado, proporcionando ao agente causador da doença altos índices de infecção caso medidas de controle não sejam adotadas (VALE et al., 2004). O controle da doença em sua maioria é realizado pelo emprego de fungicidas e uso de cultivares resistentes. Além de elevar significativamente os custos da produção, o uso dos fungicidas causam riscos ao meio ambiente e a saúde humana (PERES; MOREIRA, 2003).

O método mais moderno de manejo da doença é por meio da utilização de sistemas de previsão, pois determinam a época ideal de controle e também o número e a frequência de aplicações. No entanto, estes estudos baseiam-se na biologia reprodutiva do patógeno, nas condições climáticas e no estágio fenológico da videira (GESSLER; PERTOT; PERAZZOLLI, 2011). Portanto, o conhecimento do patógeno é fundamental para que o modelo funcione adequadamente.

### **2.2.1 Agente etiológico: *Plasmopara viticola***

O agente causal do míldio da videira é o *Plasmopara viticola* (Berk. & Curlis) Berl & de Toni. Este pseudofungo é um parasita obrigatório, da classe dos oomicetos e da família Peronosporaceae (GESSLER; PERTOT; PERAZZOLLI, 2011). Originário da América do Norte, o patógeno provocou enormes prejuízos quando introduzido no continente europeu. O ciclo reprodutivo do *P. viticola* é dividido nas fases sexuada e assexuada (AGRIOS, 2005) (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo reprodutivo do *P. viticola*, agente etiológico do míldio da videira.



(Fonte: Adaptado de AGRIOS, 2005).

A reprodução assexuada ocorre quando os esporangióforos liberam os esporângios, e estes alcançam o tecido verde da planta (GESSLER; PERTOT; PERAZZOLLI, 2011). Inicialmente, os esporângios se destacam dos esporangióforos e são disseminados pelo vento. Quando ocorre do esporângio cair sobre a folha úmida do hospedeiro ele germina liberando os zoósporos. Os zoósporos são biflagelados e na presença de um filme de água “nadam”, e se fixam no entorno dos estômatos. Depois de encistado, os zoósporos liberam um tubo germinativo que penetram a folha via estômato (AMORIM; SPÓSITO; KUNIYUKI, 2016). O tubo germinativo dá origem a um micélio, que se desenvolve intercelularmente emitindo haustórios para o interior das células. Nesta etapa o patógeno retira os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento e reprodução, colonizando intensamente os tecidos foliares (AGRIOS, 2005). Como consequência, surgem os primeiros sintomas externos conhecidos como “manchas de óleo” (AMORIM; SPÓSITO; KUNIYUKI, 2016). Os esporangióforos

são ramificados e tem o comprimento médio de 140 – 250  $\mu\text{m}$ , os esporângios apresentam-se na forma hialina e ovalada. Cada esporângio contém de um a dez zoósporos biflagelados e unicelulares (TRIGIANO; WINDHAM; WINDHAM, 2010).

Nas regiões de clima temperado o ciclo sexual ocorre no período do outono (GESSLER; PERTOT; PERAZZOLLI, 2011; GOBBIN et al., 2006). Os pesquisadores Wong, Burr, Wilcox (2001) confirmaram que o *P. viticola* é heterotálico e apresenta dois tipos de acasalamento (A1 e A2). Isto significa que o patógeno possui micélio autoestéril e necessita da participação de dois talos compatíveis para que ocorra a formação do oósporo.

O oósporo é formado por meio do processo de plasmogamia (fusão celular), seguido de cariogamia (fusão nuclear) e divisão meiótica. Inicialmente, o anterídio entra em contato com o oogônio. Após o contato (plasmogamia), o anterídio produz o tubo de fertilização que penetra na superfície do oogônio. Um núcleo do anterídio migra para o oogônio, fundindo-se com o núcleo do oogônio (cariogamia). Estes se dividem por meiose e formam o esporo sexual, denominado de oósporo (AMORIM; SPÓSITO; KUNIYUKI, 2016). Cada oogônio produz um oósporo, que apresenta uma parede espessa, de 20 a 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e atua como estrutura de resistência do patógeno, permitindo a sobrevivência destes nas condições adversas do ambiente (VERCESI et al., 1999).

No inverno, com a decomposição do tecido do hospedeiro os oósporos são liberados para o ambiente (AMORIM; SPÓSITO; KUNIYUKI, 2016). Sob condições ambientais inadequadas, estas estruturas hibernam nos resíduos da planta ou no solo (ELLIS, 2008; ROSSI et al., 2008). Após o período de maturação completa, na primavera com condições favoráveis (temperatura acima de 10°C e precipitação acima de 10 mm) os oósporos germinam e produzem um tubo germinativo, que atua como um esporangióforo no ciclo formando um macroesporângio assexuado que contém os zoósporos. Estes zoósporos são dispersos pelo vento e pela chuva, parasitando os órgãos vegetativos da videira e causando as infecções primárias (VERCESI et al., 1999; AMORIM; REZENDE, FILHO, 2011).

Em condições naturais, a germinação dos oósporos acontece de forma intermitente, podendo, em casos extremos, ocorrer apenas no ano seguinte após a sua formação (KENNELLY et al., 2007; ROSSI et al., 2008). Desta forma, as infecções ocasionadas pela doença na fase sexual podem ocorrer em diferentes períodos do ciclo cultura, uma vez que os oósporos não germinam ao mesmo tempo (GESSLER; PERTOT; PERAZZOLLI, 2011). Apesar do *P. viticola* ter sido estudado desde a sua

introdução nos vinhedos europeus na década de 80, alguns aspectos básicos da sua biologia continuam desconhecidos (WONG; BURR; WILCOX, 2001). Estudos realizados em diferentes países da Europa (França, Suíça, Grécia, Itália e Alemanha) demonstraram que os esporos sexuais constituem a maior fonte de inóculo durante todo o ciclo vegetativo da videira (GOBBIN et al., 2006; GESSLER; PERTOT; PERAZZOLLI, 2011).

No Brasil, a estrutura sexuada do *P. viticola* foi relatada na região da Serra Gaúcha (CIRNE; SONEGAM; GRIGOLETTI JUNIOR, 1988). No entanto, estes resultados foram publicados como “pesquisa em andamento” e com “resultados provisórios, sujeitos a confirmação”, onde não foram publicados na literatura científica. A literatura mais recente sugere que a reprodução do patógeno no Brasil é realizada por meio da intensa produção de micélios (reprodução assexuada) (AMORIM; SPÓSITO; KUNIYUKI, 2016). Camargo (2017) também relata que a reprodução sexuada do patógeno tem pouca influência no ciclo de vida do patógeno no estado de São Paulo.

As regiões vitícolas da mesorregião serrana de Santa Catarina apresentam o clima segundo a classificação de Köppen do tipo Cfb subtropical úmido, com verões amenos, precipitação média anual em torno de 1.480 mm, temperatura máxima média de 22,0°C e mínima média de 12,4°C (EMBRAPA, 2012). Estas condições climáticas são semelhantes às condições descritas como ideais para a ocorrência da reprodução sexuada e consequente formação de oósporos (LEHOCZKY, 1956; GRÜNZEL, 1961; WONG; BURR; WILCOX, 2001).

A reprodução sexuada no ciclo de vida do *P. viticola* pode contribuir para o aumento da variabilidade genética do patógeno e pode explicar o rápido avanço da doença nos vinhedos (GOBBIN et al., 2006). Pode também contribuir para que o patógeno apresente um maior potencial evolutivo, oferecendo um maior risco de superar os principais genes de resistência ou outros métodos de controle (MCDONALD; LINDE, 2002). Sendo assim, a identificação correta da biologia reprodutiva e das condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento do patógeno são estudos importantes para o manejo e o uso eficiente do recurso genético (CAMARGO JÚNIOR, 2008). Estes estudos podem colaborar com o desenvolvimento de novas cultivares de videira com resistência duradoura a doença. Uma vez que, a resistência de uma cultivar depende tanto do genótipo presente na planta como do patógeno, sendo ambos afetados por fatores ambientais. Além disso, estes estudos também são fundamentais no desenvolvimento de métodos de manejo da doença, tais como na elaboração de modelos de previsão da doença para

promover um controle químico mais eficiente, diminuindo os danos que são ocasionados ao ambiente e a saúde humana devido ao manejo inadequado. Por consequência, os resultados deste estudo irão fortalecer a atividade vitícola em Santa Catarina, contribuindo assim para a geração de renda e fixação do homem ao campo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 FORMAÇÃO DOS OÓSPOROS DE *P. viticola*

##### 3.1.1 Coleta dos dados climáticos

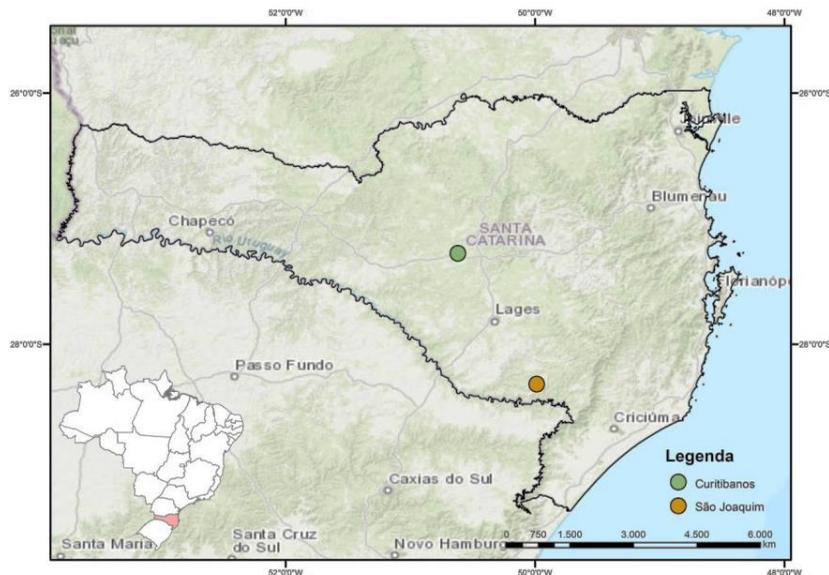
Os dados meteorológicos do município de Curitiba/SC foram coletados em duas estações meteorológicas: 1) a estação meteorológica Curitiba - A860, instalada no Aeroporto Lauro Antônio da Costa – Curitiba/SC. A estação fica a 4,0 km de distância do vinhedo comercial do qual foram coletadas as folhas para a identificação e caracterização dos oósporos; 2) UFSC Curitiba – 1026, que está localizada na Área Experimental Agropecuária da UFSC, onde foram depositadas as amostras para os estudos de viabilidade e germinação dos oósporos (AGRICULTURA CONSERVACIONISTA, 2018). Os dados meteorológicos do município de São Joaquim/SC foram originários da estação São Joaquim - A815, localizado dentro da Estação Experimental da Epagri de São Joaquim (EESJ) (INMET, 2018).

A estações: Curitiba - A860 e São Joaquim - A815 são pertencentes ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), enquanto que a estação UFSC Curitiba – 1026 é pertencente ao Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina (CIRAM/EPAGRI). As variáveis climáticas avaliadas nos dois locais foram: temperatura mínima (°C), temperatura média (°C), temperatura máxima (°C), precipitação (mm) e umidade relativa do ar (%).

##### 3.2.1 Coleta do material vegetal para a identificação dos oósporos de *P. viticola*

O estudo foi realizado na mesorregião serrana de Santa Catarina (Figura 2). No município de Curitiba a coleta das folhas foi realizada em um vinhedo comercial (27°16' 15.7" S e 50°37' 54.5" W e altitude de 987 m) no dia 27 de abril de 2017. O vinhedo foi implantado em 2007, com uma área de aproximadamente sete hectares. No município de São Joaquim a coleta das folhas foi realizada no dia 11 de abril de 2018 na Estação Experimental da Epagri de São Joaquim (EESJ) ("28°16' 28.0" S e 49°55'53.1"W e altitude de 1415 m).

Figura 2 - Local da coleta do material vegetal para a identificação dos oósporos. O ponto verde representa o município de Curitiba/SC. O vinhedo está localizado a uma latitude de  $27^{\circ}16'15.7''$  S e a uma longitude de  $50^{\circ}37'54.5''$  W estando a uma altitude de 987 m. O ponto laranja representa o município de São Joaquim/SC. O vinhedo localiza-se a uma latitude de  $28^{\circ}16'28.0''$  S e a uma longitude de  $49^{\circ}55'53.1''$  W, estando a uma altitude de 1415 m.



(Fonte: Heloisa Inês Dias Fuck, 2018)

Nos dois locais foram realizadas coletas de folhas da cv. ‘Cabernet Sauvignon’, contendo os sintomas típicos da doença do míldio da videira em estágio avançado. Os vinhedos foram naturalmente infectados pela doença. Por ser comercial, o vinhedo localizado em Curitiba foi submetido ao tratamento químico para o controle da doença, sendo realizado cerca de sete aplicações com produtos comerciais que apresentam os princípios ativos de: Acilalanina, Azoxistrobilina, Difenconazol, Famoxadona, Mancozebe, Metalaxil-M, Metiram, Oxicloreto de Cobre e Piraclorobina.

Após a coleta, as amostras foram levadas ao Laboratório de Biotecnologia e Genética Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitiba. Para a preservação das amostras, as folhas foram fixadas em solução fixadora de glutaraldeído 2,5%, em

tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2) pelo período de 12 horas. Posteriormente, o material foi desidratado em série crescente de álcool etílico (20, 30, 40, 50, 60 e 70° GL) (RUZIN, 1999). Para facilitar a visualização das amostras, as folhas foram clarificadas por meio do uso do hipoclorito de sódio (3%) e etanol (96%) (LEHOCZKY, 1956). Por fim, foram armazenadas em recipientes contendo álcool 70° GL em temperatura ambiente, até que as análises fossem realizadas.

## 3.2 MICROSCOPIA DE LUZ DE CAMPO CLARO

### 3.2.1 Identificação e caracterização morfológica dos oósporos de *P. viticola*

Uma análise prévia foi realizada no material coletado e as estruturas observadas foram comparadas com os resultados de pesquisas científicas realizadas com oósporos de *P. viticola* e de outros oomicetos. Após a análise prévia, foram confeccionados três discos foliares/folha de 20 folhas contendo lesões do míldio da videira, totalizando 60 discos foliares/local. Em seguida os discos foram dispostos sobre uma lâmina, adicionado uma gota de água destilada e posicionada uma lamínula. Os discos foram examinados com o auxílio do microscópio luz de epifluorescência Olympus BX-60. Dos discos contendo as estruturas sexuadas foram capturadas imagens (x 200) e medido aleatoriamente o diâmetro de dez oósporos. Após a mensuração dos oósporos, os discos utilizados foram armazenados em recipiente contendo álcool 70° GL em temperatura ambiente.

As médias dos diâmetros dos oósporos foi avaliada por meio do Teste t de Student a 5% de probabilidade, utilizando o software R.

### 3.2.2 Distribuição dos oósporos de *P. viticola* no tecido vegetal

Para avaliar a distribuição dos oósporos no interior do tecido vegetal, foi adaptada a metodologia descrita por Kortekamp (2005). Após a identificação da estrutura sexuada, foram selecionados quatro discos foliares/local que se apresentavam ricos em oósporos. Inicialmente o material foi desidratado em uma série etílica crescente até álcool 96° GL. Após, as amostras foram submersas pelo período de 12 horas em solução de pré-infiltração e em seguida três horas em solução de infiltração. Foram montados os blocos de historesina (hidroxietil metacrilato) com as amostras. Após a secagem, os blocos foram seccionados em cortes de cinco µm de espessura com o auxílio do micrótomo rotativo CUT 4055,

localizado no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genético Vegetal (LFDGV) do Centro de Ciências Agrárias (CCA/UFSC). As secções foram distendidas sobre lâminas de vidro contendo uma gota de água destilada. As lâminas foram secadas em uma chapa aquecedora (52°C) por aproximadamente 2 min. Com o intuito de observar os oósporos no tecido vegetal, as mesmas foram coradas com azul de toluidina (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964) e também com o corante Eosina Y (KORTEKAMP, 2005).

A distribuição dos oósporos no tecido vegetal foi avaliada por meio do método de varredura. Para as diferentes análises as imagens foram capturadas no microscópio de luz de epifluorescência Olympus BX-60 acoplado com câmera digital Olympus DP73 e analisadas através do software Olympus cellSens®.

### **3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A MEV foi utilizada para a análise mais detalhada da morfologia dos oósporos. A análise foi realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina/Florianópolis. Foram previamente selecionados quatro discos ricos em oósporos de cada coleta/local, totalizando oito amostras. Os discos foliares com oósporos foram imersos em nitrogênio líquido e quebrados (fraturados) pela técnica de criofratura (CASTRO, 2002). Posteriormente, foram submetidos a uma desidratação crescente (80, 90, 100 %) por três vezes, permanecendo 10 min em cada concentração. As amostras foram levadas para o aparelho de secagem ao ponto crítico. Após a secagem, as amostras foram montadas no suporte porta-amostras do MEV (“stubs”), utilizando uma fita de carbono dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio. Para aumentar a condutividade da superfície da amostra, o material foi recoberto com uma fina camada de ouro. Após a metalização, as amostras foram analisadas e imagens foram digitalizadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV.

### 3.3 VIABILIDADE E GERMINAÇÃO DOS OÓSPOROS DE *P. viticola*

#### 3.3.1 Coleta do material para a avaliação da viabilidade e germinação dos oósporos

Para determinar a viabilidade e germinação dos oósporos ao longo do tempo foram coletadas em cada local 80 folhas da cv. ‘Cabernet Sauvignon’ naturalmente infectadas com o míldio da videira. As coletas ocorreram em abril de 2018, nos municípios de Curitiba/SC e de São Joaquim/SC. Com o auxílio de um microscópio estereoscópio Leica EZ, foram recortadas as regiões da folha com lesões ocasionadas pelo míldio. Estes fragmentos de folhas foram divididos em quatro sacolas porosas de nylon (20 x 20 cm), que foram vedadas em suas extremidades. Com o intuito de manter as condições climáticas naturais para avaliar a viabilidade dos oósporos, as sacolas contendo os fragmentos das folhas foram colocadas a campo e armazenadas em contato com o solo, na Área Experimental Agropecuária (UFSC/CBS) e na Estação Experimental de São Joaquim (EESJ) – Epagri. As avaliações ocorreram nos meses de setembro, outubro e novembro. Em cada mês foi retirado uma amostra do campo e levado ao laboratório de Biotecnologia e Genética Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC/CBS) para a determinação da viabilidade e germinação dos oósporos.

#### 3.3.2 Viabilidade e germinação dos oósporos de *P. viticola*

Da amostra retirada do campo foi feita uma suspensão aquosa seguindo as metodologias propostas por Van der Gaag et al. (1993) e Beakes et al. (1986). Para a liberação dos oósporos, o tecido vegetal foi triturado com o auxílio de um mixer comercial em 150 mL de água destilada. Após, a amostra foi levada ao banho ultrassônico por 10 min e agitada por uma hora em agitador magnético sob temperatura ambiente. A solução foi então filtrada. A filtração foi realizada três vezes com peneiras de diferentes tamanhos, sendo 0,3 mm, 75µm e 20µm, respectivamente. O resíduo restante na parte superior da peneira de 20µm foi retirado com o auxílio de uma pipeta de pauster e adicionado a um tubo falcon, totalizando 50 mL.

Para avaliar a viabilidade dos oósporos foram retirados 7,5 mL da suspensão aquosa e adicionados em um novo tubo falcon (15 mL). Na suspensão foi adicionado o corante Tetrazólio na concentração de 0,1%, na proporção de 1:1, totalizando 15 mL. A amostra foi envolta com papel alumínio e incubada a 36° C por 24 horas. Após este período, foi realizada

a adição de 150  $\mu\text{L}$  da suspensão sobre a lâmina. Foram avaliados 100 oósporos/suspensão. Os oósporos foram quantificados através da análise de varredura em microscopia de luz de campo claro.

A determinação do percentual de viabilidade dos oósporos foi feita de acordo com a sua coloração. Três classes foram consideradas, sendo: intenso: oósporos totalmente vermelhos sendo considerados viáveis; intermediário: oósporos parcialmente corados de vermelho (alaranjado) também considerados viáveis e; incolores: oósporos não corados sendo considerados inviáveis (HOLZHAUSEN; PORSCHE; SCHUBERT, 2017).

Conforme metodologia proposta por Vercesi et al. (2010), para avaliar a germinação dos oósporos foi utilizada a suspensão aquosa previamente estabelecida. Foram adicionados 5 $\mu\text{L}$  da amostra com oósporos em placas de Petri contendo Agar-água (1%). Foram confeccionadas dez placas de Petri. As amostras foram incubadas em BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) com fotoperíodo de 12 horas a 20°C por 14 dias. Diariamente, as amostras foram umedecidas com água destilada e avaliadas. Com o auxílio do microscópio estereoscópio Leica EZ foi avaliada a formação de macroesporângio. Para as diferentes análises, foram capturadas imagens no microscópio de luz de epifluorescência Olympus BX-60 acoplado com câmera digital Olympus DP73.

O percentual de viabilidade dos oósporos nos diferentes meses e nos diferentes locais foi avaliado por meio da análise de variância múltipla e teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software R.

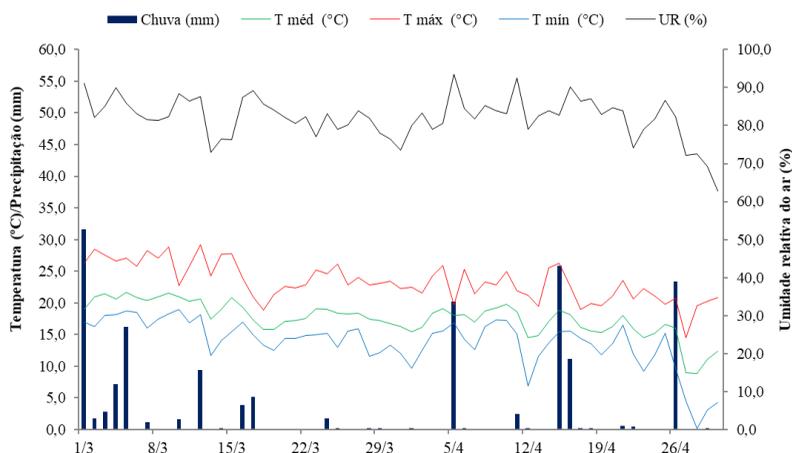
## 4 RESULTADOS

### 4.1 FORMAÇÃO DOS OÓSPOROS DE *P. viticola*

#### 4.1.1 Dados climáticos no período da coleta das folhas

Nas Figuras 3 e 4 estão as variáveis climáticas dos municípios de Curitiba e de São Joaquim, durante os meses de março e abril de 2017 e 2018 (início do outono), respectivamente. No município de Curitiba a temperatura média no mês de março foi de 18,9°C, a temperatura média das máximas foi de 24,9°C e a temperatura média das mínimas foi de 15,4°C. No mesmo período ocorreram 83,4 mm de chuva e a umidade relativa do ar foi de 82,4%. No mês de abril a temperatura média no local foi de 15,6°C, a temperatura média das máximas foi de 21°C e temperatura média das mínimas foi de 11,8°C. A precipitação média no local foi de 85,2 mm e a umidade relativa do ar ficou em 79%.

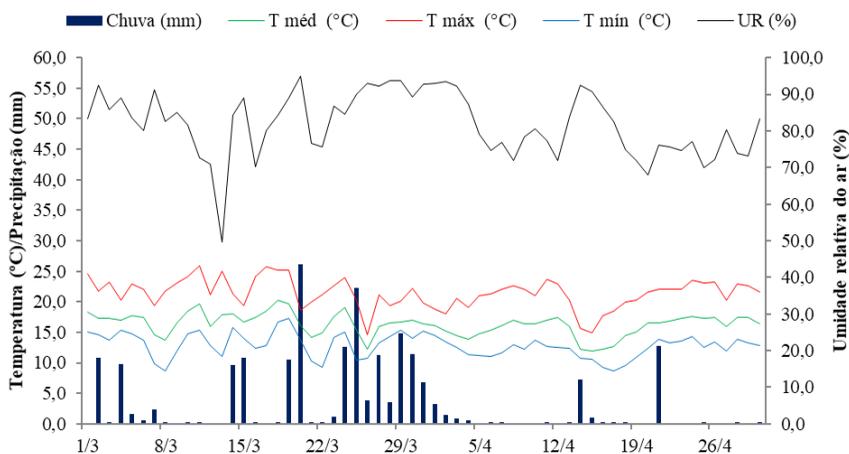
Figura 3 - Valores diários de precipitação (mm), temperatura média (°C), temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C) e umidade relativa do ar (%) nos meses de março e abril de 2017 no município de Curitiba – Santa Catarina.



(Fonte: Elaborado pelo autor, 2019. Adaptado de Agricultura Conservacionista – Estação: Curitiba - A860).

No município de São Joaquim a temperatura média durante o mês de março foi de 16,9°C. A temperatura média das máximas para o período experimental foi de 21,9°C e a temperatura média das mínimas foi de 13,4°C. No mesmo período ocorreram 171,6 mm de chuva e a umidade relativa do ar ficou em torno de 84,1%. As mesmas variáveis foram avaliadas no mês de abril, onde a temperatura média do local foi de 15,2°C. A temperatura média das máximas foi de 20,2°C e a temperatura média das mínimas ficou em 11,8°C. Ocorreram no mês de abril 29 mm de chuva e a umidade relativa do ar média foi de 76,9% (Figura 4).

Figura 4 Valores diários de precipitação (mm), temperatura média (°C), temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C) e umidade relativa do ar (%) nos meses de março e abril de 2018 no município de São Joaquim – Santa Catarina.

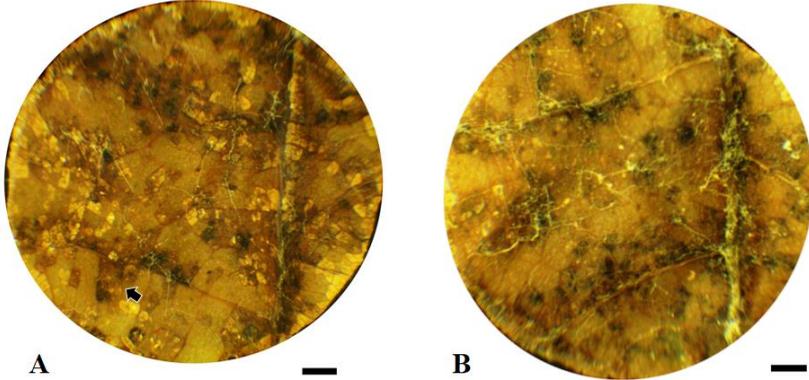


(Fonte: Elaborado pelo autor, 2019. Adaptado de INMET – Estação: São Joaquim- A815)

#### 4.1.2 Microscopia de luz de campo claro

Os discos coletados para a identificação dos oósporos de *P. viticola* apresentavam-se amarelados e com os sintomas típicos da doença do míldio da videira em estágio avançado, mesmo após o processo de fixação e clarificação. Externamente nenhum esporo sexual foi observado, apenas os sintomas da doença e as estruturas assexuadas do patógeno (Figura 5).

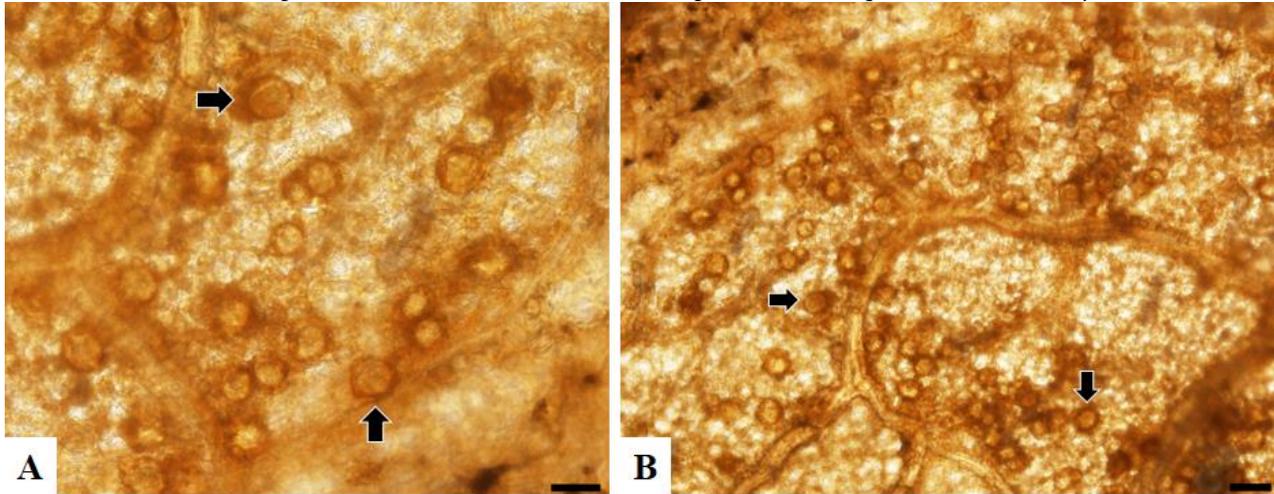
Figura 5 - Discos foliares da cv. ‘Cabernet Sauvignon’ com os sintomas típicos da doença do míldio da videira em estágio avançado (seta), após o processo de fixação e clarificação. A. Face adaxial do disco foliar. B. Face abaxial do disco foliar. (Barra=1000 $\mu$ m).



(Fonte: Elaborado pelo autor, 2019)

Através da microscopia de luz de campo claro foi possível identificar a presença dos oósporos de *P. viticola* nos discos foliares da cv. ‘Cabernet Sauvignon’ para os dois locais estudados. Os esporos sexuais foram encontrados de forma mais abundante nas regiões centrais das lesões oriundas do míldio da videira ou próximo das nervuras da folha. As regiões do tecido que apresentam a estrutura sexuada exibem uma coloração “marrom-claro”, e nestas regiões, raramente foram visualizadas as estruturas assexuadas do patógeno (Figura 6).

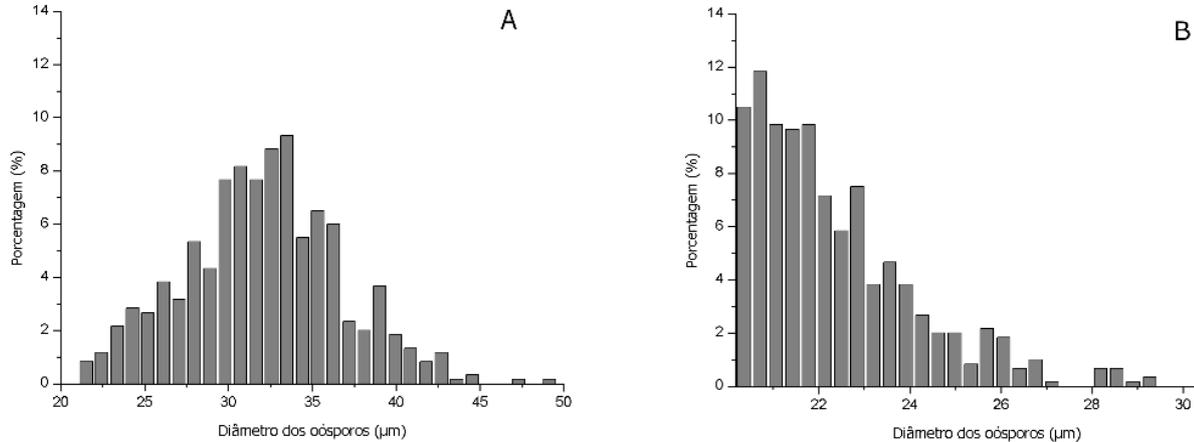
Figura 6 - Oósporos de *P. viticola* encontrados em discos foliares da cv. 'Cabernet Sauvignon'. A. Região central da lesão oriundas do míldio da videira com oósporos (setas), encontrados no município de Curitiba/SC (Barra=20 $\mu$ m). B. Disco foliar rico em oósporos (setas), encontrados no município de São Joaquim/SC (Barra=10 $\mu$ m).



(Fonte: Elaborado pelo autor, 2019)

No estudo foram realizadas as medições do diâmetro de 600 oósporos de cada local. No município de Curitiba o diâmetro dos oósporos variou de 20,06 a 49,15  $\mu\text{m}$ , sendo o tamanho médio dos oósporos para o local de 31,61  $\mu\text{m}$  (Figura 7A). No município de São Joaquim o diâmetro médio dos oósporos foi de 22,20  $\mu\text{m}$ , variando entre 20,00 a 31,04  $\mu\text{m}$  (Figura 7B). Segundo o teste t de Student, as médias do diâmetro dos oósporos do município de Curitiba e de São Joaquim apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Figura 7 – Percentual dos oósporos com diferentes diâmetros encontrados em discos foliares da cv. ‘Cabernet Sauvignon’. A. Medições referentes ao município de Curitiba/PR. B. Resultados referentes ao município de São Joaquim/SC.



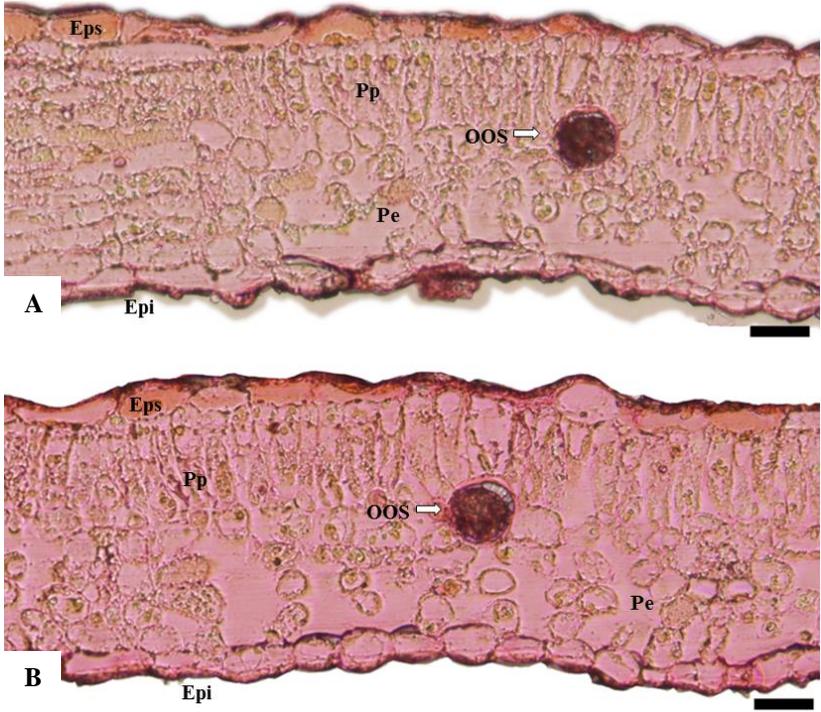
(Fonte: Elaborado pelo autor, 2019)

### 4.1.3 Distribuição dos oósporos de *P. viticola* no tecido vegetal

Nas Figuras 8 e 9, além dos oósporos também são observados a epiderme superior protegida pela cutícula, o parênquima paliçádico com uma camada de células alongadas, o parênquima esponjoso sendo formado por três a cinco camadas de células arredondadas e/ou elipsoidais e com grandes espaços intercelulares entre si. Somente na epiderme inferior da folha foi possível visualizar a presença dos estômatos. Os estômatos apresentam a sua morfologia característica, com duas células-guarda típicas ao redor do poro.

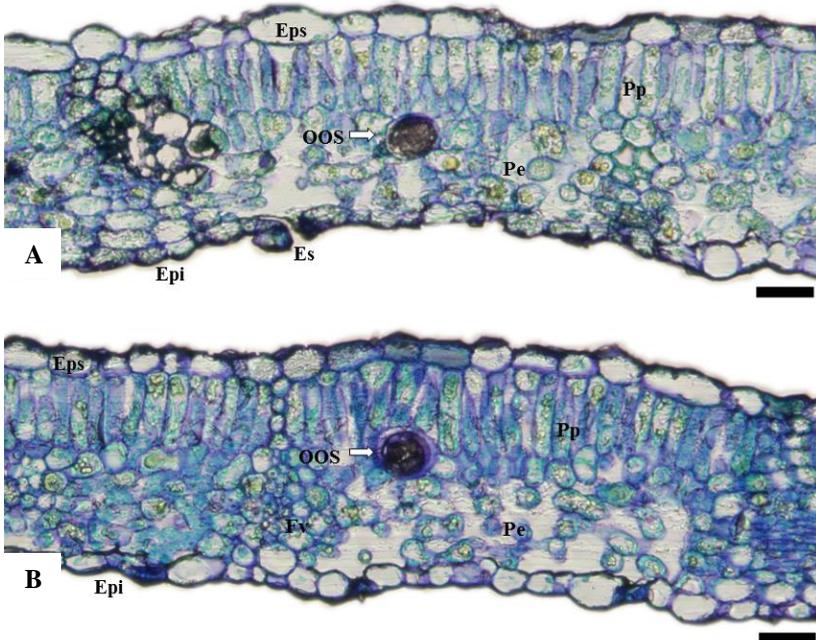
A presença de oósporos de *P. viticola* também foi observada nas secções transversais do tecido foliar da cv. 'Cabernet Sauvignon' para os dois locais estudados. Os oósporos estão localizados na parte central do mesófilo, entre o parênquima paliçádico e o parênquima esponjoso, apresentando o tamanho e formato característicos da sua estrutura, conforme relatado na literatura por Dick (1995) e Vercesi et al. (1999).

Figura 8 - Secções transversais de folhas da cv. 'Cabernet Sauvignon' coradas com Eosina Y com a presença de oósporos. A. Secção transversal da folha coletada no município de Curitibanos/SC. B. Secção transversal de folha coletada no município de São Joaquim/SC. Eps: Epiderme superior. Pp: Parênquima paliçádico. OOS: Oósporo. Pe: Parênquima esponjoso. Epi: Epiderme inferior. (Barra=20µm).



(Fonte: Elaborado pelo autor, 2019)

Figura 9 - Secções transversais de folhas da cv. ‘Cabernet Sauvignon’ coradas com Azul de toluidina com a presença de oósporos. A. Secção transversal de folha coletada no município de Curitiba/SC. B. Secção transversal de folha coletada no município de São Joaquim/SC. Eps: Epiderme superior. Pp: Parênquima paliçádico. OOS: Oósporo. Fv: Feixe vascular. Pe: Parênquima esponjoso. Es: Estômato. Epi: Epiderme inferior. (Barra = 20µm).



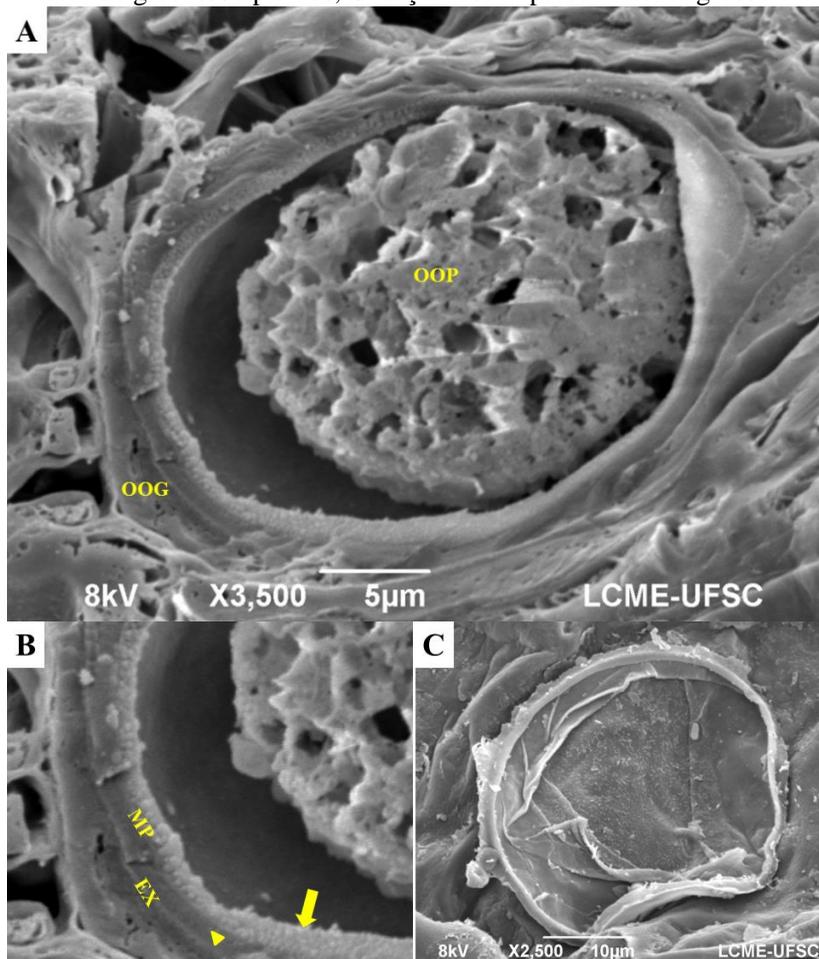
(Fonte: Elaborado pelo autor, 2019)

#### 4.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A MEV permitiu descrever as principais características morfológicas externas do oósporo de *P. viticola*. Na Figura 10 é possível visualizar a parede do oósporo dividida em duas camadas principais, sendo uma camada externa fina e uma camada interna espessa. O oósporo também apresenta uma camada de glóbulos lipídicos. Entre a camada lipídica e a camada interna espessa é observada uma membrana plasmática fina circundando toda a oosfera (Figura 10B). Por fim, na região

central do oósporo encontra-se o ooplasto (Figura 10A). Além disso, no estudo também foi possível observar oósporos colapsados (Figura 10C).

Figura 10 - Oósporos de *P. viticola* encontrados na mesorregião serrana de Santa Catarina visualizados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A. Oósporo no interior do oogônio. B. Detalhe da figura 10A, para visualização das principais camadas do oósporo. C. Oósporo de *P. viticola* colapsado. OOP: Ooplasto; OOG: Parede do oogônio; MP: Membrana plasmática; EX: Parede externa fina; Seta: camada de glóbulos lipídicos; Cabeça da seta: parede interna grossa.



(Fonte: Elaborado pelo autor, 2019)

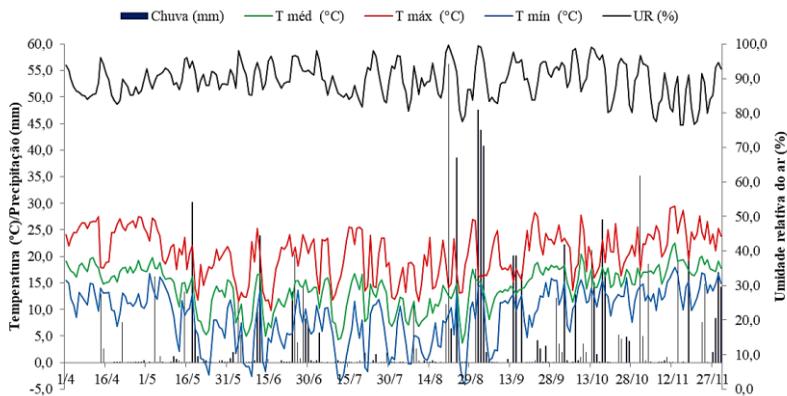
## 4.2 VIABILIDADE E GERMINAÇÃO DOS OÓSPOROS DE *P. viticola*

### 4.2.1 Dados climáticos

Nas Figuras 11 e 12 estão as variáveis climáticas para os municípios de Curitiba e de São Joaquim, durante o período experimental no ano de 2018. No município de Curitiba a temperatura média no mês de abril foi de 17,3°C. Nos meses de maio a agosto, a temperatura média sofreu reduções para 13,6°C, 11,2°C, 12,1°C e 10,5°C, respectivamente. No mês de setembro (mês da retirada da primeira amostra) a temperatura média foi de 14,7°C, aumentando para 16,5°C e 18,2°C no mês de outubro e novembro, respectivamente. Ao contrário da temperatura, os índices pluviométricos apresentaram um aumento em seu volume ao longo do tempo. Durante o período experimental, choveu 25,4 mm no mês de abril, 74,2 mm no mês de maio, 123,8 mm em junho, 15,8 mm em julho, 129,4 mm em agosto, 216,6 mm em setembro, 184,2 mm em outubro e 131,0 mm no mês de novembro.

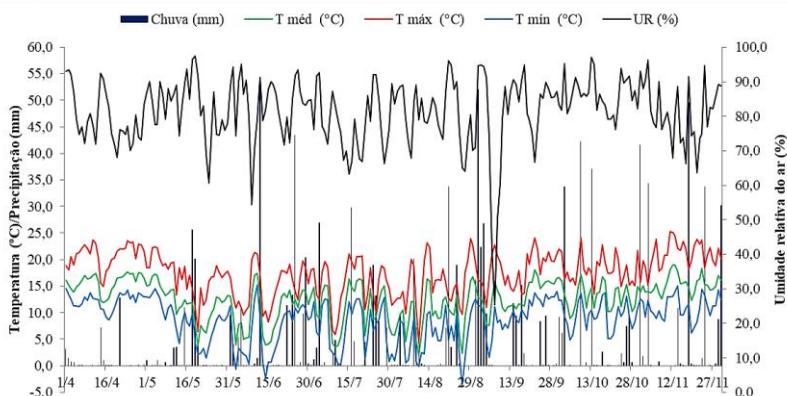
No município de São Joaquim, a temperatura média em abril foi de 15,2°C, 11,5°C em maio, 9,8°C em junho, 11,2°C em julho e 10°C no mês de agosto. Durante a primavera, a temperatura média foi de 12,8°C no mês de setembro, 13,1°C no mês de outubro e 14,9°C no mês de novembro. No mês de abril choveu 29 mm, 73,8 mm em maio, 186,2 mm em junho, 127,2 mm em julho e 123,8 mm em agosto. O índice pluviométrico no mês de setembro foi de 169,6 mm, 195,0 mm em outubro e 174,4 mm em novembro.

Figura 11 - Valores diários de precipitação (mm), temperatura média (°C), temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C) e umidade relativa do ar (%) nos meses de abril a novembro de 2018 no município de Curitibaanos – Santa Catarina.



(Fonte: Elaborado pelo autor, 2019. Adaptado de Agricultura Conservacionista – Estação: UFSC Curitibaanos – 1026)

Figura 12 - Valores diários de precipitação (mm), temperatura média (°C), temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C) e umidade relativa do ar (%) nos meses de abril a novembro de 2018 no município de São Joaquim – Santa Catarina.

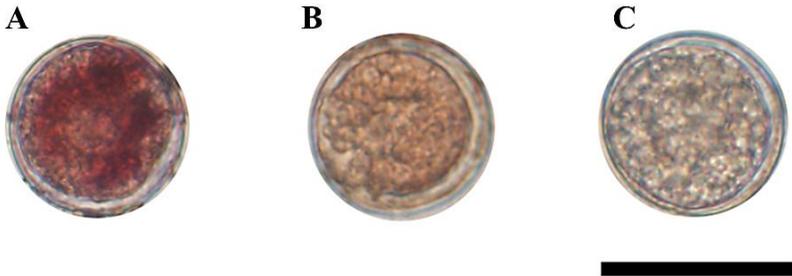


(Fonte: Elaborado pelo autor, 2019. Adaptado de INMET – Estação: São Joaquim- A815)

#### 4.2.2 Viabilidade dos oósporos de *P. viticola*

A utilização do corante tetrazólio possibilitou a avaliação do percentual de viabilidade dos oósporos ao longo do tempo nos municípios de Curitiba e de São Joaquim (Tabela 1). Foram considerados viáveis os oósporos corados de vermelho intenso (Figura 13A) e os parcialmente corados (Figura 13B), enquanto que os oósporos não corados (Figura 13C) foram considerados inviáveis.

Figura 13 - Viabilidade dos oósporos de *P. viticola* provenientes de folhas da cv. 'Cabernet Sauvignon'. As avaliações foram realizadas após as amostras serem mantidas a 36°C por 24 horas, depois da adição do corante tetrazólio (0,1%). A. Intenso: oósporo corado de vermelho, considerado viável. B. Intermediário: oósporo parcialmente corado de vermelho (alaranjado), considerado viável. C. Incolor: oósporo não corado, considerado inviável. (Barra=50µm).



(Fonte: Elaborado pelo autor, 2019)

No município de Curitiba a maior viabilidade foi observada em setembro com 81% dos oósporos viáveis. A viabilidade sofreu uma leve redução para 79% e 73% de viabilidade, nos meses de outubro e novembro, respectivamente. No município de São Joaquim, no mês de setembro, 69% dos oósporos apresentaram-se viáveis. No mês de outubro houve uma redução para 67%. O maior percentual de viabilidade para o local foi observado no mês de novembro com 76% dos oósporos viáveis.

Não houve diferença estatisticamente significativa na viabilidade dos oósporos entre os diferentes meses para os diferentes locais. No entanto, os oósporos viáveis apresentaram diferença significativa quando comparados com oósporos inviáveis (Tabela 1).

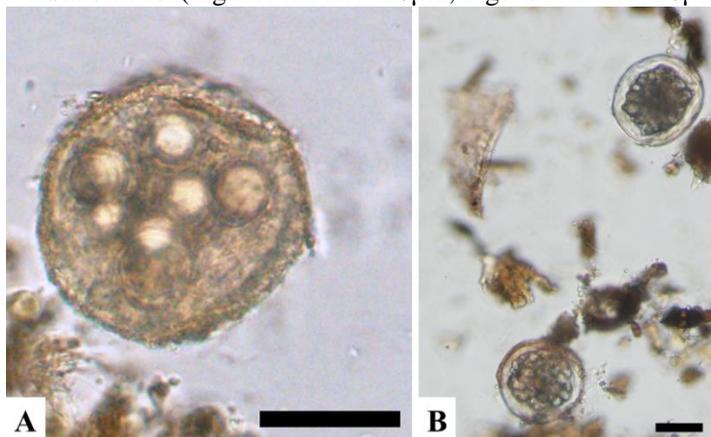
Tabela 1 - Percentual de viabilidade dos oósporos de *P. viticola* ao longo do tempo em 2018, encontrados em folhas da cv. ‘Cabernet Sauvignon’ para os municípios de Curitiba/SC e São Joaquim/SC.

Coloração/mês	Percentual de viabilidade dos oósporos (%)					
	Curitiba/SC			São Joaquim/SC		
	Intenso	Intermediário	Incolor	Viável	Intermediário	Incolor
<b>Set</b>	43 Aa	38 Aa	19 Ab	30 Aa	39 Aa	31 Ab
<b>Out</b>	41 Aa	38 Aa	21 Ab	23 Aa	44 Aa	34 Ab
<b>Nov</b>	36 Aa	37 Aa	27 Ab	37 Aa	39 Aa	24 Ab

Letras iguais maiúscula na coluna e minúscula na linha não possui significância estatística pelo teste de Tukey (5%). CV1: 0,70%; CV2: 16%

Os oósporos viáveis avaliados apresentaram o formato arredondado e uma parede espessa conforme o padrão morfológico esperado. Os oósporos inviáveis não apresentaram mudança em sua coloração (incolores) após o período de 24 horas. Também foi observado que oósporos inviáveis apresentaram em seu interior numerosas estruturas globulares de diferentes dimensões, camada interna muito espessa e bastante homogênea (Figura 14).

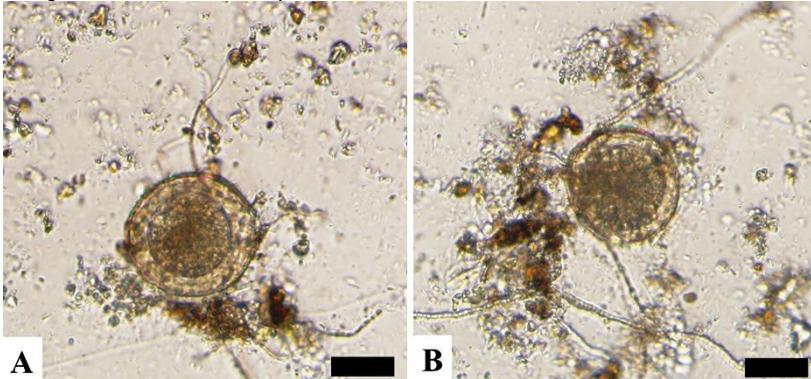
Figura 14 - A-B. Oósporos de *P. viticola* com grandes glóbulos em sua composição. Estes não coloriram e foram considerados inviáveis/anormais. (Figura A: Barra=20µm, Figura B: Barra=20µm).



(Fonte: Elaborado pelo autor, 2019)

No presente estudo tanto para o município de Curitibaanos, quanto para o município de São Joaquim não foi observado a formação do macrosporângio e dos zoósporos de *P. viticola* durante os 14 dias de avaliações (Figura 15). Sob condições controladas (em laboratório) os oósporos apresentaram a sua morfologia característica (formato arredondado e uma parede espessa), no entanto, não apresentaram o tubo germinativo, que é característico de oósporos germinados.

Figura 15 - Oósporos de *P. viticola* após 14 dias de incubação em Ágar-água (1%), e sob a temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas. A. Oósporo de *P. viticola* não germinado encontrado em amostras foliares oriundas do município de Curitibaanos/SC. B. Oósporo de *P. viticola* não germinado encontrado em amostras foliares oriundas do município de São Joaquim/SC. (Barra=20 µm).



(Fonte: Elaborado pelo autor, 2019)

## 5 DISCUSSÕES

### 5.1 FORMAÇÃO DOS OÓSPOROS DE *P. viticola*

#### 5.1.1 Dados climáticos no período inicial do outono

Os dois locais apresentaram poucas diferenças entre as suas temperaturas médias. Foi observada uma diferença entre as temperaturas médias de aproximadamente 2°C no mês de março, sendo que esta diferença diminuiu para menos 1°C no mês de abril. Em ambos os locais são comuns geadas nos períodos do outono/inverno. Além disso, no município de São Joaquim pode ocorrer de forma casual as condições climáticas favoráveis para a incidência de neve.

A unidade de São Joaquim apresentou temperaturas médias mais baixas em relação ao município de Curitiba. Este fato é corroborado com os dados climáticos históricos para os locais, onde a temperatura média anual histórica para o município de Curitiba é de 17,3°C, enquanto que para o município de São Joaquim é de 13,4°C (EMBRAPA, 2012; INMET, 2018). Um dos principais fatores que contribuem para que o município de São Joaquim apresente menores temperaturas em relação a Curitiba é a altitude local. O município de São Joaquim está localizado a 1360 m de altitude, enquanto o município de Curitiba se encontra a 987 m acima do nível do mar, sendo uma diferença de 373 m (EMBRAPA, 2012).

No período avaliado, a chuva ocorreu de forma melhor distribuída em 2017 no município de Curitiba. Já em 2018 no município de São Joaquim, o mês de março apresentou maiores índices pluviométricos (171,6 mm) em comparação com o mês de abril (29 mm). O mesmo foi observado no ano de 2018 para o município de Curitiba, no mês de março choveu 69,2 mm e no mês de abril houve uma redução do índice pluviométrico para 15,2 mm (AGRICULTURA CONSERVACIONISTA, 2017). Historicamente os dados do índice pluviométrico do mês de abril são menores em relação ao mês de março na mesorregião serrana de Santa Catarina (EMBRAPA, 2012). No entanto, neste período choveu menos que a média histórica da precipitação acumulada para o local. Sendo assim, pode-se considerar o mês de abril de 2018 como um período chuvoso atípico, ocorrendo poucos milímetros de chuva na mesorregião serrana de Santa Catarina.

A condição climática do local é um dos fatores que influenciam no ciclo vegetativo e reprodutivo da cultura e também no ciclo reprodutivo do patógeno (VALE et al., 2004; GIOVANNINI, 2014). Na cultura da

videira, com a diminuição da temperatura ocorrem a queda das folhas e o repouso vegetativo, sendo estes processos ocorrentes no final do outono e no período do inverno. Durante o período experimental, para os dois locais, foram observadas a diminuição da temperatura e a redução da disponibilidade de água (via umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica). No período da coleta, as folhas estavam entrando no processo de senescência. Isto indica que devido ao processo natural, a planta apresentava uma menor atividade fotossintética e as folhas uma menor disponibilidade de nutrientes. Segundo Giovannini (2014), a temperatura ideal para a videira realizar a fotossíntese fica entre 25°C a 30°C. Temperaturas abaixo ou acima destas ocorre um decréscimo na taxa fotossintética. Além disso, a atividade fotossintética se mantém até a queda das folhas, independente da data de vindima, diminuindo progressivamente devido ao envelhecimento das folhas e também da alteração dos fatores climáticos (GIOVANNINI, 2014). Para Grünzel (1961), a maior formação de oósporos no final do período vegetativo da videira pode estar associada com uma inibição fisiológica do desenvolvimento do patógeno (na fase assexuada) em folhas envelhecidas.

Estudos com oósporos de *P. viticola* foram realizados a campo em diferentes locais como exemplo a França, Itália, Austrália e Alemanha (KENNELLY et al., 2007). Estes locais são conhecidos pelas suas baixas temperaturas no período do outono e inverno. Estudos avaliando a formação dos oósporos em laboratório foram realizados por Lehoczky (1956). O autor observou a formação de oósporos de *P. viticola* em discos foliares flutuando em água sob a temperatura de 19 a 25°C, nove a 12 dias após a inoculação (dai). Outro estudo realizado para avaliar o efeito da temperatura (10, 14, 15, 18 e 22°C) sobre e a formação dos oósporos de *P. viticola*, foi observado que em todas as temperaturas testadas os oósporos foram formados (GEHMANN et al., 1987). Sendo as temperaturas de 14 e 18°C as que resultaram nos maiores níveis de formação de oósporos. Em outro estudo mais recente, realizado por Wong, Burr, Wilxoc (2001), em laboratório não ocorreu a formação dos esporos sexuais de *P. viticola* nos discos foliares até oito dai a 12°C. No entanto, quando os discos foram mantidos por no mínimo dez dias, houve um aumento significativo na formação das estruturas.

Por se tratar de um ambiente natural, neste estudo para ambos os locais não ocorreram períodos com temperaturas constantes. Observando os dados climáticos do município de Curitiba, verificou-se que do dia 18 de março até 04 de abril de 2017 as temperaturas mínimas se mantiveram na média de 13,7°C. Neste período ocorreram poucos

milímetros de chuva (2,6 mm). A umidade relativa do ar ficou em torno de 80,6%. Do dia 17 de abril até 25 de abril de 2017, as condições climáticas foram semelhantes no local, onde as temperaturas médias mínimas ficaram em torno de 13,6°C. A chuva acumulada no local neste período foi de 1,4 mm e a umidade relativa do ar encontrava-se próximo a 83,9%. No município de São Joaquim as temperaturas mínimas consecutivas ocorreram do dia 05 de março até 13 de março de 2018, onde a temperatura média mínima foi de 12,9°C, com o total de chuvas de 5,2 mm. Neste período a umidade relativa do ar foi de 81,5%, aonde no dia 13 de março especificamente a umidade relativa média chegou a ficar próximo a 49,7%. Também para o período avaliado, do dia 01 de abril até a data de coleta a temperatura média mínima durante este período foi de 12,5°C. A chuva acumulada no local foi de 6,6 mm e a umidade relativa encontrava-se a 79,1%.

Deste modo, as temperaturas observadas no período inicial do outono, nos dois locais de estudo, encontram-se dentro do intervalo de temperaturas que resultaram na formação de oósporos de *P. viticola* em ensaios de laboratório (LEHOCZKY, 1956; GEHMANN et al., 1987; WONG, BURR, WILXOC, 2001). Durante todo os meses de março e abril a temperatura média para ambos os locais oscilou de 15,2°C a 18,9°C, ficando próximas às temperaturas ideais observadas por Lehoczky (1956) e por Gehmann et al. (1987). Também foi observado que os períodos que ocorreram os menores índices pluviométricos apresentaram a temperatura média mínima em torno de 13°C, sendo esta temperatura próxima a temperatura utilizada nos experimentos de Wong, Burr, Wilcox (2001) e de Gehmann et al. (1987). Além disso, Grünzel (1961) observou em seu estudo que os esporos sexuais foram produzidos em períodos mais secos, quando a esporulação é impedida.

Observa-se também que os fatores climáticos na fase experimental do estudo, são limitantes no desenvolvimento do patógeno na fase assexuada. Conforme Agrios (2010), a temperatura ideal para o desenvolvimento do patógeno nesta fase varia entre 20°C a 25°C. Para a ocorrência da infecção neste período, se faz necessário a presença da água livre nos tecidos por um período mínimo de 2-3 horas. Para o processo de esporulação é necessário que a umidade relativa do ar esteja próxima a 95%. Diante disto, os resultados obtidos sugerem que nas condições climáticas da mesorregião de Santa Catarina, o patógeno apresenta uma limitação no seu desenvolvimento na fase assexuada e forma os oósporos como estrutura de resistência para garantir a sua sobrevivência no local. De acordo com Dick (1995), a reprodução sexual em fungos pode ser

considerada uma estratégia evolucionária para manter a regeneração e sobrevivência da população.

Vale et al. (2004) relatam que os modelos de previsão de doenças e sistemas de alerta fitossanitário levam em consideração o conhecimento da interação patógeno-ambiente. Conhecer o efeito climático sobre ciclo de vida do fitopatógeno possibilita a adoção de uma série de medidas de manejo, sendo de âmbito prático como também em pesquisas científicas.

### 5.1.2 Microscopia de luz de campo claro

Em termos gerais, a ausência dos oósporos na parte externa dos discos foliares como observado na Figura 5, confirma as informações descritas na literatura, onde a fase sexuada do *P. viticola* ocorre de forma intercelular (AGRIOS, 2005; GESSLER; PERTOT; PERAZZOLLI, 2011). Quando os discos foram observados sob microscópio de luz de campo claro (Figura 6), foi possível visualizar que as regiões centrais das lesões oriundas do míldio da videira apresentavam maiores quantidades de oósporos. Lehoczky (1956) também demonstrou que os oósporos não se encontram distribuídos de forma aleatória pela folha, mas sim, concentrados em poucas regiões que são delimitados pelas nervuras.

Quando observados sob microscópio de luz de campo claro (x 200), os oósporos encontrados em amostras foliares do município de Curitiba (Figura 6A) não apresentaram diferenças visuais na sua morfologia em comparação com as estruturas sexuais encontradas em amostras do município de São Joaquim (Figura 6B). Para ambos os locais, os esporos apresentaram o formato arredondado e uma parede espessa, sendo estas características típicas da sua morfologia (DICK, 1995; VERCESI et al., 1999; WONG, BURR, WILXOC, 2001).

No entanto, quando mensurados foi possível observar que os oósporos encontrados no município de Curitiba são, em média, maiores em relação ao diâmetro dos oósporos encontrados no município de São Joaquim. Entretanto, todas as medidas realizadas nos dois locais estão dentro do intervalo de diâmetro de oósporos observados em outros estudos, que oscilaram de 20 a 50µm de diâmetro (LEHOCZKY, 1956; GESSLER; PERTOT; PERAZZOLLI, 2011). Além disso, através da análise estatística foi possível confirmar que a médias do diâmetro dos oósporos do município de Curitiba e de São Joaquim apresentaram diferença significativa. Uma possível justificativa para a diferença de tamanho entre os oósporos nos dois locais pode estar relacionado com a data da coleta das folhas. No município de Curitiba a coleta do material foi realizada no final do mês de março, enquanto que no

município de São Joaquim a coleta foi realizada na segunda semana do mês de abril. Além disso, no momento da coleta foi observado que no município de São Joaquim as folhas mais velhas, que não foram coletadas, em sua maioria não estavam mais presentes na planta. Um dos motivos desta desfolha, pode ter sido devido ao ataque do míldio, uma vez que, no vinhedo experimental de São Joaquim não foi adotada nenhuma medida química para o controle da doença.

Considerando que a maior formação dos oósporos ocorre nas folhas mais velhas (GRÜNZEL, 1961) e que foram utilizadas folhas mais jovens, pode ter ocorrido que as estruturas sexuais ainda encontravam-se no processo de maturação. O estudo realizado em laboratório por Lehoczky (1956) verificou que tamanho médio de oósporos foi de 31,5 µm, sendo este diâmetro médio semelhante ao encontrado no município de Curitiba. Neste caso, para garantir que as folhas mais velhas estejam ainda presentes na planta, recomenda-se que a coleta do material no município de São Joaquim seja antecipada em relação ao período de coleta do presente estudo.

Historicamente, a primeira descrição dos oósporos de *P. viticola* foi realizada em 1863 por Bary (GRÜNZEL, 1961). Em 1880, os oósporos foram encontrados em maior quantidade na Europa por Millarde (1882). No Brasil, em 1988 os pesquisadores Cirne, Sonagam e Grigoletti Junior (1988) deram início aos primeiros estudos da presença de oósporos de *P. viticola* na região da Serra Gaúcha. No entanto, este estudo foi publicado como “pesquisa em andamento” e os resultados não foram publicados em revista científica confirmando se a estrutura era formada nas condições climáticas do local. Ainda no Brasil, Camargo (2017) relata em seu estudo que no estado de São Paulo foi encontrado a presença de uma única espécie críptica de *P. viticola* (*P. viticola* clado *aestivais*) e que a reprodução sexuada possui um papel secundário no progresso das epidemias do míldio da videira. Segundo o autor, nos locais estudados as epidemias são decorrentes da reprodução assexuada do patógeno, e que as infecções clonais múltiplas são ocasionadas por um ou poucos genótipos. Diante disto, os resultados do presente estudo demonstram que após mais de um século do primeiro relato da formação de oósporos de *P. viticola*, pode-se confirmar que as condições climáticas da mesorregião serrana de Santa Catarina são favoráveis para o desenvolvimento da estrutura de resistência do agente etiológico do míldio da videira (*P. viticola*).

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a maior formação de oósporos ocorreu no final do período vegetativo da videira, o que está de acordo com os relatos realizados por Grünzel (1961). Além

disso, de acordo com esse autor, o esporo sexual foi formado sob diferentes temperatura e estes foram produzidos em condições de períodos secos, quando a esporulação é impedida. Vale et al. (2004) relatam que nas regiões temperadas ou regiões mais frias a inibição do processo de esporulação é o resultado de baixas temperaturas que prevalecem no período noturno, fortalecendo os resultados encontrados no presente estudo. Adicionalmente, as estruturas de resistência dos fungos sobrevivem melhor em condições de baixas temperaturas e baixa umidade relativa do ar.

As condições estudadas em laboratório por Lehoczky (1956) são raramente encontradas em um vinhedo a campo em condições naturais, no entanto, este estudo também indica que a estrutura é formada sob diferentes temperatura, e principalmente quando a esporulação é impedida. Uma vez que a presença de água por tempo prolongado em contato com o tecido vegetal pode diminuir a vitalidade das folhas e também impedir que o patógeno continue se desenvolvendo na fase assexuada (esporulação/disseminação).

Além das condições climáticas favoráveis é necessário que ambos os tipos de acasalamento (A1 e A2) estejam presentes nos locais para a formação dos oósporos. Uma vez que, o *P. viticola* apresenta o acasalamento do tipo heterotálico (WONG, BURR, WILXOC, 2001). Desta forma, a formação dos oósporos nos dois locais sugere que na mesorregião de Santa Catarina o patógeno apresente os dois tipos de acasalamento.

Levando em consideração os resultados, observa-se que a temperatura não atua diretamente na formação dos oósporos, e que esta, atua sobre o processo de senescência das folhas, diminuindo assim a disponibilidade de nutrientes e também no processo de esporulação do patógeno na fase assexuada. Estudos indicam que nestas condições de estresse, o míldio garante a sua sobrevivência via reprodução sexuada. Para confirmar estas hipóteses, novas pesquisas com os oósporos de *P. viticola* precisam ser realizadas em Santa Catarina, abrangendo novas regiões de estudo, com menor altitude, e acompanhando o processo de formação dos oósporos. Ensaios de laboratório também podem confirmar a heterotalia do oomiceto.

### **5.1.3 Distribuição dos oósporos de *P. viticola* no tecido vegetal**

As secções transversais demonstram que os tecidos foliares apresentam as características estruturais semelhantes entre si nos dois locais de estudo, mesmo o material sendo coletado no final do ciclo da

cultura e com a doença do míldio (Figuras 8 e 9). Conforme Bassanezi et al. (2001), os fungos biotróficos apresentam mecanismos de penetração e colonização mais especializados e causam menores danos nos tecidos foliares do que os fungos necrotófricos. Yin et al. (2017), em seu estudo observaram que o *P. viticola* na fase assexuada não promoveu a necrose celular no tecido vegetal mesmo com altas taxas de infecção do patógeno. Para confirmar se as estruturas observadas eram realmente oósporos, os resultados foram comparados com estudos que avaliaram a anatomia de folhas da cv. ‘Cabernet Sauvignon’, onde foi possível observar que as estruturas do tecido foliar são semelhantes com os resultados obtidos no presente estudo (MONTEIRO; TEIXEIRA; LOPES, 2013). Por serem análises com o tecido vegetal sadio, observa-se que estas não apresentam nenhuma estrutura semelhante ao oósporo no mesófilo.

Foi observado que os oósporos estão localizados na parte central do mesófilo (entre os parênquimas paliçádico e esponjoso). O mesófilo das folhas é o tecido fotossintético mais ativo das plantas verdes, contendo muitos cloroplastos e pigmentos fotossintéticos. As regiões mais compactadas do tecido (parênquima paliçádico) não apresentam a formação do oósporo. Esta limitação pode contribuir para a localização central dos oósporos no tecido foliar, uma vez que, para a formação da estrutura sexual é necessária a presença de dois talos compatíveis e a maior quantidade de hifas está localizada nos espaços intercelulares do mesófilo. De acordo com Unger et al. (2007), as células mais agrupadas do tecido vegetal formam uma barreira estrutural natural, impedindo um maior desenvolvimento do patógeno nesta região do tecido do hospedeiro.

Os resultados obtidos também demonstram que ambos os corantes utilizados contribuíram para a visualização da estrutura sexual do *P. viticola* no tecido do hospedeiro. Foi observado que o corante azul de toluidina é mais eficiente quando o objetivo é avaliar a distribuição do oósporo no tecido vegetal. O corante Eosina Y, como recomendado por Kortekamp (2005), destaca com maior precisão a estrutura sexual do patógeno em si. Quando combinados com outras análises, os corantes podem contribuir para uma melhor compreensão da estrutura de resistência do patógeno e possivelmente de outros oomicetos.

Estudos avaliando a distribuição dos oósporos no tecido foliar são incipientes. Por outro lado, na literatura podem ser encontrados diferentes estudos avaliando a formação e a distribuição das estruturas assexuadas do *P. viticola* no tecido vegetal (DÍEZ-NAVAJAS et al., 2007; LIU et al., 2015; YIN et al., 2017). Como o agente causador do míldio da videira realiza grande parte do seu ciclo de vida dentro da folha, as observações histológicas do tecido são métodos simples e informativos que podem

auxiliar na visualização das interações entre a planta e o patógeno. Conforme Alfnas & Mafía (2007), as análises microscópicas são essenciais para a visualização das estruturas fúngicas no interior do tecido vegetal. Quando aliadas às técnicas histológicas, estas análises podem contribuir com diferentes pesquisas. Como exemplo, a avaliação da resistência da plantas a doenças e também em estudos que visam verificar o processo de infecção do fitopatógeno no tecido do hospedeiro.

#### 5.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os resultados descritos na microscopia eletrônica de varredura foram fundamentados em pesquisas realizadas com oósporos de *P. viticola* e de outros oomicetos. As estruturas visualizadas na Figura 10 também foram relatadas por Dick (1995) para outro oomiceto. Segundo o autor ocorre uma reorganização protoplasmática durante o processo de formação do oósporo. Essa reorganização envolve a redistribuição de três tipos de reserva: a camada interna, o ooplasto e os glóbulos lipídicos. A camada interna do oósporo é composta por  $\beta$ -glucanos e é considerada a camada mais importante da estrutura, pois ela é reabsorvida no processo de germinação. O seu volume e espessura diminui gradativamente antes que o tubo germinativo seja formado. Outra importante estrutura é o ooplasto, que também apresenta  $\beta$ -glucanos em sua composição, mas tem como principal função o armazenamento de fosfato. Bartinicki-Garcia (1968), também relata que os oomicetos de maneira geral, são considerados microorganismos celulósicos, cujas paredes celulares contêm principalmente celulose com polímeros adicionais de  $\beta$ -1,3-glucano. Por fim, a camada lipídica, que é considerada um suprimento energético endógeno. Fox et al. (1983) avaliou a composição lipídica do oósporos de *Achlya americana* (oomiceto) e verificou que aproximadamente 37% dos oósporos são compostos por lipídios. Sendo que do total de lipídios, 88,7% são triglicerídeos. Weete (1980), também relata que dependendo do estágio de desenvolvimento, os lipídios podem se acumular como glóbulos. Além disso, estes são compostos principalmente por triglicerídeos.

Lippmann et al. (1973) também avaliou a composição da parede dos oósporos de *Phytophthora megasperma* var. *Sojae*. Segundo os autores as paredes constituem 47% do volume total do oósporo. Sendo que, os glucanos insolúveis compreendem quase 80% da parede, onde o principal componente são os  $\beta$ -glucanos. Segundo os autores, nos polímeros da parede são encontrados a glicose e pequenas quantidades de manose e glucosamina. As proteínas também podem ser encontradas,

compreendendo cerca de 12% e os aminoácidos mais abundantes foram a arginina e a glicina.

Segundo Hemmes & Bartnicki- Garcia (1975), Beakes & Gay (1978) e Dick (1995), a formação do oósporo tem início quando o anterídio entra em contato com a parede do oogônio. Após o contato, os núcleos do oogônio migram para uma única região (concentrados no periplasma). O tubo fertilizador do anterídio rompe a camada do oogônio e deposita o núcleo haploide, formando de imediato uma membrana que delimita o periplasma da oosfera. Após a formação da oosfera, a composição do citoplasma modifica-se aparecendo vacúolos e corpos lipídicos distribuídos de forma aleatória e encontrados em grandes quantidades. O processo final de formação dos oósporos termina com a reorganização das substâncias de reserva, onde os vacúolos gradualmente se unem para formar o ooplasto. E de forma simultânea, ocorre a ligação e formação da camada com glóbulos lipídicos. A ontogenia do oósporo não foi avaliada no presente estudo. No entanto, o “produto” que caracteriza o fim do processo de formação do oósporo é facilmente visualizado na Figura 10A.

Vercesi et al. (1999), identificaram a existência de três tipos de oósporos de *P. viticola*. O tipo I é considerado imaturo, e é caracterizado por uma fina parede interna, grandes glóbulos lipídicos e dois núcleos. O tipo II é considerado maduro, apresenta um notável aumento da espessura da parede interna, fusão dos núcleos, quebra de grandes glóbulos lipídicos em glóbulos menores. Dick (1995), também relata que os oósporos maduros contêm um único ooplasto e poucas camadas de glóbulos lipídicos. Por fim, o oósporo do tipo III apresentam os glóbulos lipídicos muito grandes, onde estes ocupam praticamente toda a região do citoplasma. Segundo os autores nesta última classificação, o oósporo também apresenta a camada interna muito espessa e bastante homogênea. Estes são considerados anormais e dificilmente viáveis (BEAKES et al., 1986). Estas informações sugerem que os oósporos de Curitiba mensurados anteriormente no microscópio de luz de campo claro podem ser classificados como do tipo II. E os oósporos encontrados no município de São Joaquim podem ser classificados como do tipo I. Possivelmente estes oósporos são ainda imaturos e devido a isso apresentam um menor diâmetro (Figura 7). Vercesi et al. (1999) relata que em seu estudo os oósporos do tipo I foram os mais frequentemente encontrados.

Estudos avaliando oósporos de *P. viticola* na microscopia eletrônica de varredura são dificilmente encontrados na literatura. No entanto, um estudo neste âmbito foi realizado por Korterkamp, Wind, Zyprian (1998). Segundo os autores o oósporo apresenta o diâmetro de

seis a oito  $\mu\text{m}$  e uma parede externa ornamentada. Essas informações não corroboram com os resultados obtidos no presente estudo. Principalmente em relação ao diâmetro da estrutura, sendo este valor extremamente inferior as medidas já conhecidas para o oósporo. Diante disso, este trabalho pode ser considerado o primeiro a descrever e confirmar medidas já conhecidas de oósporos de *P. viticola* através da microscopia eletrônica de varredura.

Durante o processo metodológico nos deparamos com a dificuldade em localizar a estrutura sexuada. Isto ocorreu por causa da sua localização, uma vez que o oósporo é formado dentro do tecido do hospedeiro. Beakes et al. (1986) também relata dificuldades em visualizar os oósporos de *Phytophthora* no microscópio eletrônico. O procedimento de criofratura foi realizado com o intuito de fragmentar o tecido vegetal e facilitar a visualização da estrutura sexual do patógeno, e este cumpriu com o seu objetivo. No entanto, devido à rapidez do processo de congelamento e descongelamento grande parte dos oósporos encontraram-se colapsados (Figura 10C). Beakes et al. (1986) verificou problemas semelhantes em seu protocolo, onde encontrou diversos oósporos com conteúdo bastante achatados e ausência do ooplasto na região central.

De maneira geral, a estrutura observada apresentou as principais características morfológicas do oósporo de *P. viticola* e de outros oomicetos, sendo levado em consideração os fatores: tamanho, formato, localização no tecido e as paredes estruturais do oósporo. Diante disso, o resultado desta análise confirma que a estrutura avaliada nesta e nas diferentes metodologias, são seguramente oósporos de *P. viticola*.

## 5.2 VIABILIDADE E GERMINAÇÃO DOS OÓSPOROS DE *P. viticola*

Nos dois locais estudados, os oósporos que apresentaram a coloração vermelho intensa ou intermediária foram considerados viáveis. Lakon (1949) relata que a classe de coloração intermediária deve ser considerada viável, uma vez que a mudança de cor implica ao organismo condições vitais. De maneira geral, o teste de tetrazólio está relacionado com a atividade das desidrogenases, onde catalisam as reações respiratórias nas mitocôndrias, durante a glicólise e o ciclo de Krebs. Estas enzimas reduzem o sal de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio ou TCT) nos tecidos vivos. Quando o TCT é reduzido, forma-se um composto vermelho conhecido como trifenilformazan. Esta modificação indica que há atividade respiratória nas mitocôndrias e consequentemente viabilidade celular (FRANÇA NETO et al., 1998).

Portanto, tecidos não viáveis não reagem e consequentemente não apresentam mudança em sua coloração.

Como as amostras foram retiradas do campo no início de cada mês, levamos em consideração os dados das temperaturas médias do mês precedente à retirada da amostra. Quando comparados os locais, se observa que no mês de setembro o percentual de viabilidade dos oósporos foi de 81% em Curitiba e 69% em São Joaquim. As temperaturas médias durante o mês de agosto foram de 10,5°C e 10°C, respectivamente. No mês de outubro, o percentual em Curitiba foi de 79% e 67% em São Joaquim. Em setembro as temperaturas médias foram de 14,7°C em Curitiba e 12,8°C em São Joaquim. No mês de novembro, o percentual de viabilidade dos oósporos foi de 73% em Curitiba e 76% em São Joaquim. As temperaturas médias no mês de outubro para os locais foram de 16,5°C e 13,1°C, respectivamente.

Os resultados demonstram que não houve diferença significativa na viabilidade dos oósporos entre os diferentes meses para os diferentes locais. No entanto, os oósporos viáveis apresentaram diferença significativa quando comparados com oósporos inviáveis (Tabela 1). Ronzon-Tran & Sung (1990) avaliaram por três anos a germinação dos oósporos de *P. viticola* em um vinhedo localizado em Bordeaux na França. Seus resultados demonstraram que no primeiro ano a germinação dos oósporos ocorreu no final de março, no segundo ano ocorreu no início de maio e no último ano a germinação ocorreu novamente em março. Isto demonstra que há uma variação muito grande no processo de germinação dos oósporos nas condições climáticas naturais, podendo oscilar a cada ano para o mesmo local.

Em termos gerais, o município de Curitiba apresenta as temperaturas médias maiores em relação ao município de São Joaquim (EMBRAPA, 2012). O mesmo foi observado em nossos resultados (Figuras 11 e 12). Durante o período em que as amostras ficaram no campo (de abril a agosto), as temperaturas médias foram de 17,3°C a 10°C em Curitiba e entre 15,2°C a 10°C em São Joaquim. Temperaturas diárias abaixo de 0 °C foram observados apenas em alguns dias durante o inverno. Nos meses de junho, julho e agosto, o município de Curitiba apresentou as temperaturas médias mínimas mais baixas em comparação com o município de São Joaquim, nos quais, no mês de junho as temperaturas média foi de 5,5°C em Curitiba e 6,0°C em São Joaquim. Uma diferença de 2°C foi observada no mês de julho, onde em Curitiba a temperatura média mínima foi de 5,5°C e 7,4°C em São Joaquim. O mês de agosto apresentou as menores temperaturas médias, sendo de 4,6°C em Curitiba e 5,5°C em São Joaquim. Rouzet &

Jacquín (2003) relatam que para que ocorra o processo de germinação, os oósporos precisam atingir a sua maturidade completa. Carisse (2016) também relata que a temperatura é um dos fatores que mais influenciam a germinação e também a ocorrência das infecções primárias.

Conforme relatado por Vercesi et al. (1999), a maturação dos oósporos ocorre em duas fases distintas, primeiro os oósporos se tornam maduros morfológicamente e então amadurecem fisiologicamente. Rouzet & Jacquín (2003) afirmam que as baixas temperaturas no período do inverno contribuem significativamente com a maturação dos oósporos de *P. viticola*. Além disso, os autores relatam que para quebrar a dormência dos oósporos é necessário um acúmulo de 160° dias (temperatura base de 8°C). Para entender melhor os nossos resultados, avaliamos o acúmulo de graus dias para os diferentes locais, levando em consideração a temperatura base de 8°C (ARNOLD, 1960). Verificamos que a soma total de graus dias (° dias) para o período experimental (mês de abril até o mês de novembro) foi de 1510,2° dias no município de Curitiba e 1115,8° dias no município de São Joaquim. Observamos também que do mês de abril (período de formação dos oósporos) até o mês de setembro (início da primavera), o município de Curitiba apresentou um acúmulo de 764,4° dias, e o município de São Joaquim durante o mesmo período apresentou um acúmulo de 580,9° dias. Portanto, estes valores são superiores aos valores (° dias) necessários para a maturação dos oósporos. Sendo assim, podemos considerar que na mesorregião serrana de Santa Catarina, os oósporos de *P. viticola* apresentam um dos fatores essenciais para a quebra da sua dormência e posterior germinação. Estes resultados também demonstram que o acúmulo de graus dias no município de Curitiba foi superior no ano de 2018, em comparação com o do município de São Joaquim (diferença de 183,5° dias), este fato ocorreu por que as temperaturas médias em São Joaquim foram menores em relação ao município de Curitiba.

Outra variável climática avaliada foi o volume de chuvas. Os resultados para ambos os locais demonstram que o volume de chuvas foi superior a 100-120 mm/mês desde o mês de agosto até o final do experimento (Figuras 11 e 12). Vercesi et al. (2010) afirmam que a relação entre as variáveis climáticas e a dinâmica de germinação precisam ser melhor investigadas. Seus resultados demonstram que a disponibilidade de água afeta a germinação dos oósporos, tanto em condições controladas como em condições naturais. Os autores verificaram que quando os oósporos foram mantidos em baixas temperaturas e em contato com o substrato totalmente seco, o percentual de germinação foi muito baixo e que quando os oósporos foram mantidos

a 5°C, tanto com a disponibilidade de água alternada como água constante, as taxas de germinação foram maiores e por um período mais longo. Rossi et al. (2008) e Caffi et al. (2009) também relatam que uma vez quebrada a dormência, a germinação é influenciada pela temperatura, chuva e a umidade.

Os oósporos incolores avaliados (inviáveis), em sua maioria apresentaram na região central grandes glóbulos em sua morfologia. O mesmo foi observado por Beakes et al. (1986) e Dick (1995). Segundo os autores os oósporos anormais e inviáveis apresentam os glóbulos lipídicos muito grandes, ocupando praticamente toda a região do citoplasma. Além disso, estes apresentam a camada interna muito espessa (Figura 14). Beakes et al. (1986) também relatam em outro estudo que os oósporos anormais encontrados nas suspensões controle e nas suspensões coradas com tetrazólio foram caracterizados pelos seus grandes glóbulos lipídicos.

Os resultados demonstram que para os dois locais estudados e durante os diferentes meses, o percentual de oósporos viáveis se diferenciou do percentual de oósporos inviáveis. Isto sugere que nas condições naturais a viabilidade dos oósporos encontrados na mesorregião serrana de Santa Catarina se mantenha ao longo do tempo e em diferentes proporções. Segundo Kennelly et al. (2007) e Gobbin et al. (2006) os esporos sexuais constituem a maior fonte de inóculo durante todo o ciclo vegetativo da videira. Rossi et al. (2008) também reforçam os resultados, onde relatam que a germinação dos oósporos acontece de forma intermitente, podendo ocorrer apenas no ano seguinte após a sua formação e que estes não germinam ao mesmo tempo.

No presente estudo tanto para o município de Curitiba, quanto para o município de São Joaquim não se obtiveram resultados positivos nas avaliações de germinação dos oósporos de *P. viticola* (Figura 15). Nenhuma mudança morfológica visual foi observada nos oósporos amostrados durante o período experimental. Carisse (2016) relata que na primavera, a germinação dos oósporos maduros é favorecida pela ruptura de sua parede. Dick (1995) também relata que no processo germinativo a parede interna é mobilizada rapidamente. O volume e, portanto, a espessura diminui acentuadamente antes de qualquer tubo germinativo ser formado e o ooplasto durante este processo também desaparece.

Segundo Ronzon-Tran et al. (1988), os período completo dos oósporos podem ser divididos em três fases. A primeira fase (fase da formação), é quando os oósporos não são capazes de germinar e estão imaturos. Na segunda fase (fase da maturação), a proporção de oósporos maduros aumenta consideravelmente, esta fase difere de ano para ano. Na

terceira fase (fase de pós-maturação ou germinação), os oósporos maduros formam os macroesporângios se as condições climáticas forem favoráveis. Toffolatti et al. (2007) avaliaram os percentuais de germinação dos oósporos em ágar-água a 20°C em amostras invernadas de novembro até julho. O autor relata que a formação de macroesporângios ocorreu de novembro até o final de maio. Para Rouzet & Jacquín (2003), a germinação dos oósporos começa quando a temperatura atinge em média 12°C e o solo está úmido. Park et al. (1997) também relata que a germinação dos oósporos é favorecida por temperatura acima de 11°C e o mesmo é inibido quando as temperaturas estão acima de 30°C. Gobbin et al. (2005), demonstram em seu estudo que no Canadá, o período favorável para a germinação dos oósporos é de maio a junho e que a germinação de oósporos pode ocorrer durante um período de 2 a 3 meses. Avaliando os dados climáticos do período experimental, podemos considerar que a mesorregião serrana de Santa Catarina apresenta nas condições naturais de temperatura e umidade para o processo de germinação dos oósporos de *P. viticola*.

No ano de 2018, no município de Curitiba os primeiros sintomas do míldio da videira ao campo foram observados em uma cultivar suscetível, na primeira quinzena de novembro (período de inflorescência da videira). Sendo assim, o período que antecedeu o início do sintoma contribuiu para o processo de germinação dos oósporos e conseqüentemente forneceu condições para o início das primeiras infecções do patógeno na fase assexuada a campo. De acordo com Carisse (2016) os primeiros sintomas da infecção do míldio também apareceram no período das inflorescências.

Verificamos em nossos resultados que os dois locais apresentaram os fatores essenciais para o processo germinativo, sendo a presença de oósporos viáveis, o acúmulo de graus dias necessários para a maturação completa dos oósporos, chuvas bem distribuídas durante o período experimental e temperaturas médias superiores a 11-12°C. A principal justificativa para a não germinação dos oósporos está relacionada a uma variável não identificada. Vercesi et al. (2010) relatam que os fatores exógenos (temperatura e chuva) não explicam totalmente as variações observadas nas taxas de germinação. Mas exercem influência junto a fatores endógenos que também podem ser responsáveis por oscilações na capacidade dos oósporos em germinar. No entanto, como a etapa de germinação foi realizada sob condições de laboratório, sugerimos que o protocolo utilizado deva ser reajustado. Caso tenham ocorrido problemas metodológicos, possivelmente nas condições naturais do vinhedo os oósporos se comportem de outra forma. Para responder

melhor estas questões, sugere-se que estudos que avaliem a diversidade genética do patógeno a campo devam ser realizados para determinar se há a contribuição de zoósporos provenientes de esporos sexuais no processo de infecção.

### 5.3 IMPLICAÇÕES DA FORMAÇÃO DOS OÓSPOROS

Segundo Vercesi et al. (2010), a germinação dos oósporos desempenha um papel fundamental nas epidemias de míldio. Durante anos, a literatura relatava que a doença do míldio da videira era iniciada por apenas algumas infecções primárias ocorrendo em um curto período, e que o progresso da doença era ocasionado por infecções secundárias (GESSLER; PERTOT; PERAZZOLLI, 2011). No entanto, estudos realizados em diferentes países da Europa demonstraram que os esporos sexuais são a maior fonte de inóculo durante todo o ciclo vegetativo da videira (GOBBIN et al., 2006).

Além disso, a resistência de uma cultivar depende do genótipo presente na planta como do patógeno, sendo estes afetados pelas condições climáticas do ambiente. Delbac (2017), avaliou na França a durabilidade da resistência da videira ao míldio. Os resultados evidenciaram há formação de oósporos viáveis e férteis nos genótipos parcialmente resistentes a doença (*Rpv1*, *Rpv3* e *Rpv1 / Rpv3*). Isso demonstra que o *P. viticola* é capaz de completar seu ciclo de vida (assexual e sexual) em videiras parcialmente resistentes. Tornando-se uma problemática para os programas de melhoramento genético.

Carisse (2016) relata que se o número de folhas infectadas no outono for superior a 5%, uma quantidade maior de inóculo primário (oósporos) estará presente na primavera seguinte. Conforme Rossi et al. (2008), dependendo da suscetibilidade da cultivar e da severidade do míldio, até 50.000 oósporos podem ser produzidos por m<sup>2</sup> no vinhedo. Sob condições favoráveis até 50 zoósporos/oósporos podem ser produzidos e disseminados em novos brotos localizados próximos ao solo (ROSSI & CAFFI, 2012). A formação de oósporos pode contribuir para o aumento da variabilidade genética do patógeno e pode explicar o rápido avanço da doença nos vinhedos (GOBBIN et al., 2006). A alta variabilidade genética em uma pequena escala espacial sugere que a reprodução sexuada ocorra e conseqüentemente proporciona ao patógeno uma rápida evolução e adaptação em diferentes ambientes (ANJOS, 2013). Diante disso, quanto maior a diversidade da população do patógeno, maiores são as chances do mesmo quebrar a resistência

genética do hospedeiro ou desenvolver resistência aos fungicidas aplicados para o seu controle (MCDONALD; LINDE, 2002).

## 6 CONCLUSÕES

O presente estudo foi de grande relevância, pois é o primeiro estudo científico a confirmar a formação de oósporos de *P. viticola* no Brasil.

Os oósporos, que são a estrutura reprodutiva do *P. viticola*, foram identificados na cv. 'Cabernet Sauvignon', suscetível a doença, na mesorregião Serrana de Santa Catarina.

A análise histológica permitiu identificar a distribuição dos oósporos no tecido vegetal.

Através da microscopia eletrônica de varredura, foi possível identificar as principais características externas do oósporos de *P. viticola*. Além disso, através desta análise foi possível confirmar de forma segura que as estruturas avaliadas no presente estudo são oósporos de *P. viticola*.

Não houve diferença significativa na viabilidade dos oósporos entre os diferentes meses para os diferentes locais. No entanto, os oósporos viáveis apresentaram diferença significativa quando comparados com oósporos inviáveis.

Para os dois locais estudados, o processo de germinação dos oósporos de *P. viticola* e a formação do macroesporângio não foram observados. Sendo assim, a metodologia utilizada precisa ser revista e os testes de germinação repetidos para confirmar os resultados.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo comprovou a formação de oósporos de *P. viticola* na mesorregião serrana de Santa Catarina. A identificação dos oósporos sugere que nos dois locais estudados ocorra tanto a fase sexuada quanto assexuada do patógeno. A reprodução sexuada contribui como fonte de esporos sexuais (zoósporos) durante os ciclos primários de infecção. Uma vez que, estes são formados através da reprodução sexuada do patógeno, que envolve o evento da meiose, fazendo-se necessário a união de hifas gaméticas compatíveis. O evento contribui para a maximização da diversidade genética do oomiceto via recombinações genéticas. Caso este fato seja confirmado, são maiores as chances do patógeno quebrar a resistência conferida por genes de resistência, bem como, desenvolver mecanismos de resistência aos fungicidas aplicados para o seu controle. Este fato é agravado, visto que, conforme observado nos resultados, as taxas de viabilidade são altas e segundo pesquisadores a germinação dos oósporos ocorre de forma intermitente, ou seja, são gerados novos esporos sexuados ao longo de todo o ciclo da cultura da videira.

No presente estudo, o vinhedo comercial (Curitibanos) foi submetido ao controle químico. No entanto, o vinhedo experimental (São Joaquim) não apresentou nenhuma medida de controle química. Como podemos observar em nossos resultados, nas duas situações os oósporos de *P. viticola* foram formados. Além disso, os oósporos também foram encontrados em discos foliares da cv. 'Merlot' para o município de Curitibanos. Isto demonstra que outras cultivares *V. viniferas* produzidas na mesorregião serrana de Santa Catarina provavelmente apresentam a estrutura de resistência do patógeno.

Como relatado por Gobbin et al. (2006) na Europa foram encontrados altos níveis de diversidade genética dentro e entre as populações de *P. viticola*. No Brasil, Camargo (2017) relata que nos locais estudados as epidemias são decorrentes da reprodução assexuada do patógeno, e que as infecções clonais múltiplas são ocasionadas por um ou poucos genótipos. Apesar da importância econômica da doença, são incipientes as informações da estrutura genética da população (*P. viticola*) em Santa Catarina. Desta forma, recomendamos que estudos deste âmbito sejam realizados.

Os resultados apresentados neste estudo fornecem uma base sólida para avançar com estudos mais aprofundados sobre a biologia reprodutiva do agente causal do míldio da videira no Brasil. Programas de melhoramento genético da videira, métodos de manejo da doença e

modelos de previsão da doença precisam a partir de agora mudar o paradigma no controle da doença no Brasil, e levar em consideração a reprodução sexuada do pseudofungo *P. viticola*, sob pena de terem sua efetividade comprometida caso não o façam.



## REFERÊNCIAS

AGRICULTURA CONSERVACIONISTA – **Agrometeorologia**. Disponível em: <<http://agriculturaconservacionista.ufsc.br/>>. Acesso em: 25 ago. 2018.

AGRIOS, George N. **Plant Pathology**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 5 ed. p.922, 2005.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 382p.

ALVARENGA, A. A.; ABRAHÃO, E.; REGINA, M.A.; ANTUNES, L.E.C.; PEREIRA, A.F. Origem e classificação botânica da videira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.19, n.194 p.5-8, 1991.

ANGELOTTI, F.; HAMADA, E.; MAGALHÃES, E. E.; GHINI, R.; RESSUREIÇÃO GARRIDO, L.; JÚNIOR, M. J.P.; Climate change and the occurrence of downy mildew in Brazilian grapevines. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. vol. 52, n.6. Brasília. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2017000600006>

AMORIM, Lilian; REZENDE, Jorge Alberto Marques; FILHO, Armando Bergamin. **Manual de fitopatologia**. 4 ed. Piracicaba: Agronômica Ceres. p.704, 2011.

AMORIM. L.; SPÓSITO, M.B.; KUNIYUKI, H.; **Manual de fitopatologia** – Doenças da videira. 5ed. Ouro Fino – MG: Agronômica Ceres, p.750, 2016.

ANJOS, Liamar Maria dos. **Diversidade genética de Plasmopara viticola e mapeamento de QTLs DE RESISTÊNCIA AO MÍLDIO EM VIDEIRA (Vitis spp.)**. Tese de doutorado. Programa de Pósgraduação em Fitopatologia. 2013. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/18325>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

ARNOLD, C.Y. Maximum-minimum temperatures as a basis for computing heat units. **Journal of the American Society for Horticultural Sciences**, Alexandria, v. 76, p. 682 - 692, 1960.

BALASUNDRAM, Nagendran; SUNDRAM, Kalyana; SAMMAN, Samir. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>.

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

BARTINICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. **Annual review of microbiology**. v. 22, p. 87 – 108, 1968. DOI:<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.22.100168.000511>

BASSANEZI, R. B.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; HAU, B.; BERGER, R.D. Accounting for photosynthetic efficiency of bean leaves with rust, angular leaf spot and anthracnose to assess crop damage. **Plant Pathology**. v. 50, n. 4, p. 443 – 452. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00584.x>.

BEAKES, G. W. Electron microscopic study of oospore maturation and germination in an emasculate isolate of *Saprolegnia ferax*. **Canadian Journal of Botany**. v. 58, n. 2, p. 182 – 194, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1139/b80-020>.

BEAKES, G. W.; GAY, J. L.; Light and electron microscopy of oospore maturation in *Saprolegnia furcata*: I. Cytoplasmic changes. **Transactions of the British Mycological Society**. v. 71, p. 11 – 24, 1978. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(78\)80002-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(78)80002-3).

BEAKES, G.W.; EL-HAMALAWI, C. ERWIN, D. C.; Ultrastructure of mature oospores of *Phytophthora megasperma* f.sp. *medicaginis*: Preparation protocols and effects of MTT vital staining and permanganate pre-treatment. **Transactions of the British Mycological Society**. v.86, n. 2, p. 195 – 206. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(86\)80145-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(86)80145-0).

BORGHEZAN, Marcelo; GAVIOLI, Olavo; PIT, Fábio Antônio; SILVA, Aparecido lima da. Comportamento da variedade Cabernet Sauvignon cultivada em vinhedos de altitude em São Joaquim – Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 46, n.4, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000400009>.

BOWERS, J.E.; MEREDITH, C. P. The parentage of classic wine grape, Cabernet Sauvignon. **Nature Genetics**, v. 16, p. 84 – 87, 1997. DOI: 10.1038/ng0597-84.

BRIGHENTI, A. F.; BRIGHENTI, E.; BONIN, V.; RUFATO, L.; Phenological characterization and thermic requirement of distinct grapevines varieties in São Joaquim, Santa Catarina – Brazil. **Ciência Rural**, v. 43, n.7, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782013005000082>

BUSATO, Cristiani C.M; SOARES, Antonio A.; MOTOIKE, Sérgio Y.; BUSATO, Camilo. Phenological and thermal demand of the grapevine cultivate ‘Niagara Rosada’ produced in Espirito Santo Northwes. **Revista trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**. v.7, n. 2, 2013. Disponível em: <<http://www.periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/ccaatropica/articloe/view/1097/4>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

CAETANO, Brunna Salmi; SPONTONI, Mariana Teixeira; OLIVEIRA, Tatiane de Oliveira Pereira e; OLIVEIRA, Jefferson Anthony Gabriel de. Principais doenças na cultura da videira. **Revista Conexão Eletrônica – Três Lagoas, MS** – v.14, n.1, 2017.

CAFFI T. et al. A MODEL PREDICTING PRIMARY INFECTIONS OF PLASMOPARA VITICOLA IN DIFFERENT GRAPEVINE-GROWING AREAS OF ITALY. **Journal of Plant Pathology**. v. 91, n. 3, p. 535 – 548, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v91i3.544>.

CAMARGO JÚNIOR, Osnil Alves. **Potencial da reprodução sexual na diversidade genética em populações de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli***. – Tese de doutorado – Universidade Federal de Lavras. p.132, 2008.

CAMARGO, M. P.; **Estrutura genética populacional de *Plasmopara viticola* e o progresso do míldio e da ferrugem da videira**. 2017. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017. DOI:10.11606/T.11.2018.tde-02042018-092537.

CARISSE, O. Development of grape downy mildew (*Plasmopara viticola*) under northern viticulture conditions: influence of fall disease incidence. **European Journal of Plant Pathology**. v. 144, n. 4, p. 773 – 783, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0748-y>

CARVALHO, Cleonice de; TREICHEL, Michelle; BELING, Romar Rudolfo. **Anuário brasileiro da uva: 2016**. p. 64. Disponível em: <<http://www.editoragazeta.com.br/flip/anoario-uva-2016/files/assets/common/downloads/publication.pdf>>. Acesso em 15 jul. 2018.

CASTRO, Luis Antônio Suita. **Processamento de Amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura** – Documentos 93. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.37. 2002. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32390/1/documento-93.pdf>>. Acesso em: 06 mar. 2017.

CIRNE, Mauro Miguel dos Santos; SÔNEGO, Olavo Roberto. Ocorrência de oósporos de *Plasmopara viticola*, agente causal do míldio da videira, na região da serra gaúcha. **Folheto – Embrapa Uva e Vinho**. n. 17, p.3, 1988. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/60789/1/CNPUV-PESQ.AND.-17.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

DELBAC, L.; DELIÈRE, L.; DELMOTTE, F.; Evidence for sexual reproduction and production of fertile oospores of *Plasmopara viticola* on partially resistant grapevine varieties. **GBG 2018**, Bordeaux, France, p. 15-20, 2018.

DELOIRE, A.; VAUDOUR, E.; CAREY, V.; BONNARDOT, V.; VAN, L. C. Grapevine responses to terroir: une approche globale. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v.39, n.4, p. 149-162, 2005. DOI: 10.20870/oenone.2005.39.4.888.

DICK, M. W. Sexual reproduction in the *Peronosporomycetes* (chromistan fungi). **Canadian Journal of Botany**. v. 73, p. 712 – 724, 1995. DOI:<https://doi.org/10.1139/b95-314>.

DÍEZ-NAVAJAS, A. M.; GREIF, C.; POUTARAUD, A.; MERDINOGLU, D. Two simplified fluorescent staining techniques to observe infection structures of the oomycete *Plasmopara viticola* in grapevine leaf tissues. **Micron**. v. 38, p. 680 – 683, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.09.009>.

ELLIS, M. A.; Downy Mildew of Grape. **Department of Plant Pathology**. The Ohio State University. 2008. Disponível em: <[https://ohiograpeweb.cfaes.ohio-state.edu/sites/grapeweb/files/imce/pdf\\_factsheets/Downy%20Mildew.pdf](https://ohiograpeweb.cfaes.ohio-state.edu/sites/grapeweb/files/imce/pdf_factsheets/Downy%20Mildew.pdf)>. Acesso em: 24. jul. 2018.

EMBRAPA – Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária. **Atlas climático da Região Sul do Brasil: Estados do Parana, Santa Catarina e Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; Colombo: Embrapa Florestas, 2012.

FALCÃO, L. D. **Caracterização analítica e sensorial de vinhos Cabernet Sauvignon de diferentes altitudes de Santa Catarina**. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, p. 150, 2007.

FALCÃO, L.D.; BURIN, V.M.; CHAVES, E.S.; VIEIRA, H.J.; BRIGHENTI, E.; ROSIER, J.P.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Vineyard altitude and mesoclimate influences on the phenology and maturation of Cabernet Sauvignon grapes from Santa Catarina State. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v. 44, n. 3, p. 135-150, 2010.

FOX, N. C.; CONIGLIO, J. G.; WOLF, F. T. Lipid Composition and Metabolism in Oospores and Oospheres of *Achlya americana*. **Experimental Mycology**. v. 7, p. 216 – 226, 1983. DOI: [https://doi.org/10.1016/0147-5975\(83\)90042-7](https://doi.org/10.1016/0147-5975(83)90042-7).

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. O teste de tetrázolio. Londrina: EMBRAPA- CNPSO- 1988. 72p.

GEHMANN, K; STAUDT, G; GROSSMANN, F. The influence of temperature on oospore formation of *Plasmopara viticola*. v. 94, n. 3, p. 230 – 234, 1987. Acesso em: <<http://cel.webofknowledge.com/InboundService.do?customersID=atypnncel&smartRedirect=yes&mode=FullRecord&IsProductCode=Yes&product=CEL&Init=Yes&Func=Frame&action=retrieve&SrcApp=literatum&SrcAuth=atyponcel&SID=8Bexr5Q4OURReEADJvZ&UT=WOS%3AA1987H991900002>>. Acesso em: 15 dez. 2018.

GESSLER, Cesare; PERTOR Ilaria; PERAZZOLLI Michele. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. **Phytopathologia Mediterranea**, vol. 50, n.1, 2011. DOI: [http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-9360](http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-9360).

GIOVANNINI, E. **Manual de viticultura**. Porto Alegre: Bookman, p. 253, 2014.

GOBBIN, D., JERMINI, M., LOSKILL, B., PERTOT, I., RAYNAL, M. AND GESSLER, C. Importance of secondary inoculum of *Plasmopara viticola* to epidemics of grapevine downy mildew. **Plant Pathology**. v. 54, n. 4, p. 522 – 534, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01208.x>.

GOBBIN Davide; RUMBOU Artemis; LINDE Celeste C.; GESSLER Cesare: Population genetic structure of *Plasmopara viticola* after 125 years of colonization in European vineyards - **Molecular Plant Pathology**. v.7, p.519–531, 2006. DOI: [10.1111/j.1364-3703.2006.00357.x](https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00357.x)

GRIS, E .F.; BURIN, V. M.; BRIGHENTI, E.; VIEIRA, H. J. ; BORDIGNON-LUIZ, M. Phenology and ripening of *Vitis vinifera* grape varieties in São Joaquim, southern Brazil: a new South American wine growing region. **Ciência e Investigación Agraria**, v. 37, p. 61-75, 2010. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202010000200007>.

GRÜNDEL Von Hermann. Untersuchungen über die Oosporenbildung beim Falschen Mehltau der Weinrebe (*Peronospora viticola* de Bary). **Pflanzenpathologie**. v. 68, n. 2, p. 65-80. 1961.

HEMMES, D. E.; BARTINICKI-GARCIA, S.; Electron Microscopy of Gametangial Interaction and Oospore Development in *Phytophthora capsici*. **Archives of Microbiology**. v. 103, p. 91 – 112, 1975. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00436336>.

HOLZHAUSEN, A.; PORSCHE, C.; SCHUBERT, H. Viability assessment and estimation of the germination potential of charophyte oospores: testing for site and species specificity, **Botany Letters**. p. 147 – 158, 2017. DOI:<https://doi.org/10.1080/23818107.2017.1393460>

INMET – **Instituto Nacional de Meteorologia**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>. Acesso em: 28 ago. 2018.

KENNELLY, M.M.; GADOURY, D.M.; WILCOX, W.F.; MAGAREY, P.A.; SEEM, R.C. Primary infection, lesion productivity, and survival of sporangia in the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. **Phytopathology**, v.97, p.512-522, 2007. DOI: 10.1094/PHTO-97-4-0512.

KIMATI, Hiroshi; AMORIM, Lilian; BERGAMIN FILHO, Armando; REZENDE, Jorge A. M. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. v.2. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.

KIST, B. B.; CARVALHO, C. C.; TREICHEL, M.; SANTOS, C. E.; **Anuário brasileiro da Fruticultura 2018** – Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, p. 88, 2018. Disponível em: <<http://www.editoragazeta.com.br/produto/anuario-brasileiro-da-fruticultura/>>. Acesso em: 5 mai. 2018.

KORTEKAMP, A. Staining methods for the investigation of *Plasmopara viticola* and its infection structures in semi-thin sections. **Vitis**. n.44, p.45-47, 2005. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/268419007\\_Staining\\_methods\\_for\\_the\\_investigation\\_of\\_Plasmopara\\_viticola\\_and\\_its\\_infection\\_structures\\_in\\_semi-thin\\_sections](https://www.researchgate.net/publication/268419007_Staining_methods_for_the_investigation_of_Plasmopara_viticola_and_its_infection_structures_in_semi-thin_sections)>. Acesso em: 15 mai. 2017.

KORTEKAMP, A.; WIND, R.; ZYPRIAN, E. Untersuchungen zur Interaktion von *Plasmopara viticola* mit anfälligen und resistenten Rebsorten. **Journal of Plant Diseases and Protection**. v. 105, n. 5, p. 475 – 488, 1998. Disponível em:

[https://www.jstor.org/stable/43386544?seq=1#metadata\\_info\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/43386544?seq=1#metadata_info_tab_contents)>. Acesso em: 14 nov. 2018.

LAKON, G. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. **Plant Physiology**. v. 24, n. 3, p. 389 – 394, 1949. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC437388/>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

LEHOCZKY, János. Observations on oospore production by *Plasmopara viticola* in floating leaf discs in artificial culture. **Vitis**. v. 5, p. 17 – 19, 1956.

LIU, R. et al., Histological responses to downy mildew in resistant and susceptible grapevines. **Protoplasma**. v. 70, p. 252 – 259, 2015. DOI: 10.1007/s00709-014-0677-1.

LIPPMANN, E.; ERWIN, D.C.; BARTINICKI-GARCIA, S. Isolation and Chemical Composition of Oospore-Oogonium Walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Microbiology**. v. 80, p. 131 – 141, 1973. DOI: 10.1099/00221287-80-1-131.

LOPES, Leilane Demito. **Desenvolvimento e avaliação de subprodutos de uva e sua utilização como ingrediente alimentício**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Londrina. 2013.

LSPA – **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro. v. 30, n.1, p.1-81, 2018. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_%5Bmensal%5D/Fasciculo/2017/lspa\\_201701.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/2017/lspa_201701.pdf)>. Acesso em: 23 mai. 2018.

MCDONALD, Bruce A.; LINDE, Celeste. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**. v. 124, p. 163 – 180, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1015678432355>.

MONTEIRO, A.; TEIXEIRA, G.; LOPES, C. M. Comparative leaf micromorphoanatomy of *Vitis vinifera* ssp. *vinifera* (Vitaceae) red cultivars. “Ciência e Técnica Vitivinícola. v. 28, n. 1, p. 19 – 28, 2013.

Disponível em: < <http://hdl.handle.net/10400.5/6374>>. Acesso em: 15 jan. 2019.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue o. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368–373, 1964. DOI:<https://doi.org/10.1007/BF01248568>

PARK, E. W.; SEEM, R. C.; GADOURY, D. M.; PEARSON, R. C. DMCAST: a prediction model for grape downy mildew development. **Viticultural and Enological Science**. v. 52, p. 182 – 189, 1997. Disponível em: < [https://www.researchgate.net/profile/David\\_Gadoury/publication/258219975\\_DMCast\\_a\\_prediction\\_model\\_for\\_grape\\_downy\\_mildew\\_development/links/0deec529e35f1c0e03000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/David_Gadoury/publication/258219975_DMCast_a_prediction_model_for_grape_downy_mildew_development/links/0deec529e35f1c0e03000000.pdf)>. Acesso em: 19 jan. 2019.

PERES, F., MOREIRA, J. C. *É veneno ou é remédio: agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. p.384, 2003. Disponível em: < <http://books.scielo.org/id/sg3mt/pdf/peres-9788575413173.pdf>>. Acesso em: 6 ago. 2017.

PROTAS, José Fernando da Silva; CAMARGO, Umberto Almeida. **Viticultura Brasileira. Panorama Setorial em 2010**. Bento Gonçalves. IBRAVIN: Embrapa Uva e Vinho. 2011. Disponível em: <<http://www.ibravim.org.br/admin/arquivos/downloads/1455901895.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2018.

ROSSI, V.; CAFFI, T. The Role of Rain in Dispersal of the Primary Inoculum of *Plasmopara viticola*. **Phytopathology**. v. 102, n. 2, p. 158 – 165, 2012. DOI: 10.1094/PHYTO-08-11-0223.

ROSSI, V.; CAFFI, T.; BUGIANI, R.; SPANNA, F.; DELLA VALLE, D. Estimating the germination dynamics of *Plasmopara viticola* oospores using hydro-thermal time. **Plant Pathology**. v. 57, p. 216 – 226, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01738.x>

ROUZET, J.; JACQUIN, D. Development of overwintering oospores of *Plasmopara viticola* and severity of primary foci in relation to climate. **EPPO Bulletin**. v. 33, n. 3, p. 437 – 442, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2003.00670.x>.

RUZIN, S. E. **Plant microtechnique and microscopy**. New York, NY: Oxford University press, 1999.

RONZON-TRAN, C.; SUNG, M. Simulation of the Date of Maturity of *Plasmopara viticola* Oospores to Pretict the Severity of Primary Infections in Grapevine. **Plant Disease**. v. 74, n. 2, 1990. DOI: 10.1094/PD-74-0120.

RONZON-TRAN, C.; SUNG, M.; CLERJEAU, I. M. Techniques for Formation, Maturation and Germination of *Plasmopara viticola* Oospores Under Controlled Conditions. **Plant Disease**. v. 72, p. 938 – 941, 1988. DOI: 10.1094/PD-72-0938.

TOFFOLATTI, S. L.; SERRATI, L.; SIEROTZKI, H.; GISI, U.; VERCESI, A. Assessment of QoI resistance in *Plasmopara viticola* oospores. **Pest management science**. v. 63, n. 2, p. 194 – 201, 2007. DOI: 10.1002/ps.1327.

TOFFOLATTI, Silvia Laura et al. Unique resistance traits against downy mildew from the center of origin of grapevine (*Vitis vinifera*). Scientific Reports - **Springer Nature America**, v. 8, n. 1, p.1-11, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-30413-w>.

TÖPFER, Reinhard; HAUSMANN, Ludger; HARST, Margit; MAUL, Erika; ZYPRIAN, Eva; EIBACH, Rudolf. New Horizons for Grapevine Breeding. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**. v.5, p. 79 – 100, 2011. Disponível em: <[http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2011/FVCSB\\_5\(SI1\)/FVCSB\\_5\(SI1\)79-100o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2011/FVCSB_5(SI1)/FVCSB_5(SI1)79-100o.pdf)>. Acesso em: 15 jul. 2017.

TRIGIANO, Robert N.; WINDHAM, Mark T.; WINDHAM, Alan S. **Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 575 p.

UNGER, S., BÜCHE C., BOSO S., KASSEMAYER H.H. The course of the colonization of two different *Vitis* genotypes by *Plasmopara viticola* indicates compatible and incompatible host–pathogen interactions. **Phytopathology**, v.97, p. 781–786, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-7-0780>.

VALE, F. X. R do; JUNIOR, W.C.J.; ZAMBOLIM, L. **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfil Editora, p. 532, 2004.

VERCESI, A.; TOFFOLATTI, S.; ZOCCHI, G.; GUGLIELMANN, R.; IRONI, L. A new approach to modelling the dynamics of oospore germination in *Plasmopara viticola*. *Eur. J. Plant Pathol.* v. 128, p. 113-126, 2010. DOI:<https://doi.org/10.1007/s10658-010-9635-8>.

VERCESI, A.; TORNAGHI, R.; SANT, S.; BURRUANO, S.; FAORO, F. A cytological and ultrastructural study on the maturation and germination of oospores of *Plasmopara viticola* from overwintering vine leaves. **Mycological Research.** v. 103, p. 193 – 202, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1017/S095375629800700X>.

WAN DER GAAG, D.J. FRINKING, H.D. GEERDS, C.F. Production of oospores by *Peronospora viciae* f.sp. *fabae*. **Journal of Plant Pathology.** v. 99, p. 83 – 91, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03041398>.

WEET, J. D.; Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organisms. 1980. Disponível em: < <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4757-0064-0>>. Acesso em: 19 dez. 2018.

WONG, F.P.; BURR, H.N.; WILCOX, W.F. Heterothallism in *Plasmopara viticola*. **Plant Pathology.** v. 50, p. 427 – 432, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00573.x>

YIN X. et al., Pathogen development and host responses to *Plasmopara viticola* in resistant and susceptible grapevines: an ultrastructural study. **Horticulture Research.** v. 4, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/hortres.2017.33>.

ZANUS, M. C. **Panorama da viticultura brasileira**. Bento Gonçalves: Embrapa. In: XV Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia, 2015. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/136794/1/Zanus-artigo.pdf>>. Acesso em: 30 Jul. 2018.