

Jaqueline Nogueira Muniz

**RESISTÊNCIA DE VIDEIRAS AO MÍLDIO:
PROGRESSÃO DA DOENÇA E DIVERSIDADE DO PATÓGENO**

Tese submetida ao Programa de
Recursos Genéticos Vegetais da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
doutor em Ciências
Orientador: Prof. Dr. Aparecido Lima
da Silva

Florianópolis
2017

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

Muniz, Jaqueline

Resistência de videiras ao míldio : Progressão da
doença e diversidade do patógeno / Jaqueline Muniz ;
orientador, Aparecido Lima da Silva - SC, 2017.

p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Viticultura.
3. Melhoramento genético vegetal. 4. Resistência a
doenças. 5. Piramidação de genes de resistência. I.
Lima da Silva, Aparecido . II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Jaqueline Nogueira Muniz

**RESISTÊNCIA DE VIDEIRAS AO MÍLDIO: PROGRESSÃO DA
DOENÇA E DIVERSIDADE DO PATÓGENO**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Ciências” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Recursos Genéticos Vegetais.

Florianópolis, 24 de abril de 2017.

Prof. Paulo Emílio Lovato, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Aparecido Lima da Silva,
Dr. Orientador
Universidade Federal de Santa
Catarina

Marco Antonio Dalbó, Dr.
Empresa de Pesquisa e
Extensão Agropecuária de
Santa Catarina

Prof. Rubens Onofre Nodari,
Dr.
Universidade Federal de Santa
Catarina

Alberto Fontanella Brighenti,
Dr.
Empresa de Pesquisa e
Extensão Agropecuária de
Santa Catarina

Prof. Miguel Pedro Guerra, Dr.
Universidade Federal de Santa
Catarina

Leonardo Araújo, Dr.
Empresa de Pesquisa e
Extensão Agropecuária de
Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais que sempre me apoiaram e acreditaram no meu futuro.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, e aos professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela oportunidade e cooperação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos durante o curso, e da concessão da bolsa para Doutorado Sanduíche no exterior.

Aos professores Dr. Aparecido Lima da Silva por concordar em ser meu orientador, e ao Dr. Leocir José Welter por junto comigo investirem no melhoramento genético da videira, pelo empenho de ambos para que este trabalho fosse desenvolvido com excelência.

Ao grupo de pesquisa “Genetica e miglioramento genético della vite”, em especial ao meu orientador Dr. Marco Stefanini, ao pesquisador Dr. Luca Zullini, e aos colaboradores Silvano, Monica Colombo, Alessandra Zatelli, Cinzia Dorigatti, Silvia Lorenzi. Aos queridos amigos Dr. Duilio Porro, Dr. Stefano Pedò e Dr. Walter pelo acolhimento e amizade neste um ano de estágio.

Às pesquisadoras Dra. Silvia Vezzuli e Dra. Stella Grando e a todos os colaboradores da Fondazione Edmund Mach, por me receberem no instituto, acreditarem no meu trabalho e pelo suporte financeiro para todas as análises moleculares e fenotípicas desenvolvidas em San Michele all’Adige, Itália.

Aos pesquisadores da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão de Santa Catarina (EPAGRI), que tive a oportunidade de conviver durante o curso, pela amizade e pelo suporte que de alguma forma muitos concederam, Alberto Fontanella Brighenti, Emilio Brighenti, Marcos Dalbó, João Peterson Pereira Gardin, e Vinicius Caliari.

Aos colegas do Núcleo de Estudos da Uva e do Vinho, e colegas da UFSC, em especial aos amigos Anyela Rojas Molina, Fernando Sanchez Mora, Jéssica Maronez, Luciano Saifer, Márcia Rossarolla, Tiago Camponogara Tomazetti pela amizade e ajuda no desenvolvimento deste trabalho. E aos colegas do campus Curitibanos, em especial ao Eduardo Novak, Jean Zanghellini, Jéssica Karine Menon, Renan Giacometti, Wilson Taybar Assumpção,

Aos membros da banca examinadora Dr. Rubens Onofre Nodari, Dr. Miguel Pedro Guerra, Dr. Marcos Antonio Dalbó, Dr. Alberto Fontanella Brighenti e Dr. Leonardo Araújo pelas sugestões e comentários imprescindíveis para o enriquecimento deste trabalho.

Aos meus pais Deise Velloso Nogueira Muniz, Carlos Antonio Muniz, ao meu irmão Carlos Antonio Muniz Junior, à minha avó Nereyde Maria Velloso que acreditaram em mim e sempre incentivaram meus objetivos profissionais.

Go back young man and gather up your weary and
defeated genes of the past, take your currently successful genes,
find some new ones if you can, and build yourself a genetic
pyramid (Nelson, 1978).

RESUMO

A mesorregião serrana de Santa Catarina tem se destacado na produção de vinhos finos e espumantes. No entanto, a região apresenta elevada precipitação pluviométrica, o que favorece o aparecimento de doenças, como o míldio, que constituem um risco para a viticultura e podem reduzir substancialmente a produtividade. A região do Trentino Alto Adige na Itália é famosa pela produção de vinhos finos, entretanto a utilização de variedades europeias por todo o território torna-se um foco de ataque por míldio também. Nas últimas décadas diferentes genótipos e variedades de videiras resistentes ao míldio foram desenvolvidos, entretanto existe a preocupação de que o patógeno possa ter evoluído com o passar dos anos e com a criação de novas variedades. Neste sentido, o objetivo principal do presente estudo foi avaliar no Brasil os efeitos dos loci de resistência *Rpv1* e *Rpv3* (individual e piramidados) sobre o progresso da doença de *Plasmopora viticola* durante todo o ciclo vegetativo e reprodutivo dos genótipos do programa de melhoramento genético da UFSC Curitibano; e na Itália o principal objetivo foi avaliar as diferenças moleculares entre isolados de míldio coletados na região do Trentino Alto Adige e determinar se existem diferentes níveis de agressividade nos genótipos e variedades estudados. As plantas da população UFSC-2012-1 foram selecionadas e divididas em quatro grupos de resistência: 1) Nenhum loci de resistência; 2) Apenas *Rpv1*; 3) Apenas *Rpv3* e 4) *Rpv1* + *Rpv3*. A gravidade da doença foi monitorada durante as estações 2014/2015 e 2015/2016. Foram construídas curvas de progresso da doença do míldio e foram comparadas as epidemias de cada grupo de resistência utilizando quatro medidas epidemiológicas: início da aparência dos sintomas (BSA), tempo para atingir a gravidade máxima da doença (TRMDS), gravidade máxima da doença (Smax) e área sob a doença Curva de progresso (AUDPC). 41 marcadores SSR foram utilizados na análise genética de sete isolados de *Plasmopora viticola*. Doze variedades / genótipos hospedeiros foram utilizados para as inoculações cruzadas com quatro isolados de *P. viticola*. Os hospedeiros foram divididos em dois grupos: susceptível (SUS) e resistente ou parcialmente resistente (R ou PAR) a *P. viticola*, contendo diferentes QTLs conferindo resistência a *P. viticola* (*Rpv*). A escala OIV-452-1 foi utilizada em discos foliares para avaliar a resistência dos genótipos ao patógeno. Nos genótipos do programa de melhoramento da UFSC Curitibanos, os grupos contendo apenas um dos loci de resistência revelaram apenas resistência parcial a *P. viticola*; contudo, quando os loci foram piramidados, o controle do progresso da

doença foi completo. Na Itália, a comparação molecular e fenológica de isolados de míldio coletados em diferentes vinhedos da região mostrou que existem diferenças genéticas entre eles e sua agressividade em diferentes genótipos de *Vitis* também foram demonstrados.

Palavras-chave: Vitivinicultura, seleção assistida por marcadores moleculares, variedades resistentes, míldio, interação hospedeiro-patógeno, piramidação de genes de resistência.

ABSTRACT

The mountainous region of Santa Catarina has been excelling at the production of fine and sparkling wines. However, the region presents high rainfall, which favors the emergence of diseases that are a risk to viticulture and can substantially reduce productivity. The region of Trentino, Alto Adige in Italy, is famous for the production of fine wines. Conversely, the use of grape varieties throughout the territory has become a focus of attack by mildew. In the last decades, different mildew resistant genotypes and varieties of vines have been developed; notwithstanding, there is concern that the pathogen may have evolved over the years with the creation of new varieties. In this sense, the main objective of the present study was to evaluate, in Brazil, the effects of resistance loci *Rpv1* and *Rpv3* – individual and pyramidal – on the progress of *Plasmopara viticola* disease throughout the vegetative and reproductive cycles of the genotypes in the breeding program UFSC Curitiba. In Italy, the main objective was to evaluate the molecular differences between isolates collected in the Trentino Alto Adige region, and to determine if there are different levels of aggression in the genotypes and varieties studied. The plants of the UFSC-2012-1 population were selected and divided into four resistance groups: 1) No resistance loci; 2) *Rpv1* only; 3) Only *Rpv3* and 4) *Rpv1* + *Rpv3*. The severity of the disease was monitored during the 2014/2015 and 2015/2016 seasons. Progress curves for mildew disease were constructed and the epidemics of each resistance group were compared using four epidemiological measures: symptom onset (BSA), time to maximum disease severity (TRMDS), maximum disease severity (Smax) and area under the Disease Progress Curve (AUDPC). The use of 41 SSR markers was implemented in the genetic analysis of seven isolates of *Plasmopora viticola*. In total, 12 host varieties / genotypes were used for cross inoculation with four isolates of *P. viticola*. The hosts were divided into two groups: susceptible (SUS) and resistant or partially resistant (R or PAR) to *P. viticola*, containing different QTLs, which confer resistance to *P. viticola* (Rpv). The OIV-452-1 scale was used in leaf discs to evaluate the resistance of the genotypes to the pathogen. In the breeding program genotypes of UFSC Curitiba, groups containing only one of the resistance loci revealed only partial resistance to *P. viticola*; however, when the loci were pyramided, full control of the disease progress was attained. In Italy, the molecular and phenological comparison of mildew isolates collected from different vineyards in the region, revealed the existence genetic differences

between them – and their aggressiveness in different genotypes of *Vitis* were also demonstrated.

Key words: Vitiviniculture, selection assisted by molecular markers, resistant varieties, mildew, host-pathogen interaction, resistance gene pyramiding.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Ciclo de doença do míldio em videira causado por *Plasmopara viticola*.....39

Figura 2. Sintomas causados por *Plasmopara viticola* em folhas e bagas de videira: (A) mancha de óleo na face superior da folha; (B) esporulação recente na face inferior da folha; (C) esporulação de *P. viticola* em frutos novos e (D) sintoma do ataque do patógeno no cacho, causando escurecimento e ressecamento dos frutos novos.....40

CAPÍTULO I

Figura 1. Precipitation (mm), air relative humidity (RH%) and mean temperature (°C) at Curitibanos, Santa Catarina state, Brazil, during the period of evaluation of *P. mildew* disease progress in the growing seasons of 2014/2015 (a) and 2015/2016 (b).....62

Figura 2. Downy mildew disease progress curves on plants without resistance loci (susceptible), only *Rpv1*, only *Rpv3* and *Rpv1+Rpv3*, during the growing seasons 2014/15 and 2015/16 in Curitibanos, Santa Catarina state, Brazil.65

CAPÍTULO II

Figura 1. Local of lesion collection of *Plasmopara viticola*, in the region of Trentino Alto Adige, Italy. ... 77

Figura 2. Dendrogram of Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) cluster analysis based on Jaccard distance, demonstrating the genetic relationship between seven *Plasmopara viticola* isolates, collected in Trento, Italy, genotyped with 35 microsatellite markers.81

Figura 3. Area Under the Diseases Progress Curve (AUDPC) of 12 grapevine varieties or breeding lines inoculated with four different isolates of *Plasmopara viticola*, from four to seven days after inoculation (dpi).....90

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1. Beginning of symptom appearance (BSA), maximum value of severity (Smax), time to reach the maximum disease severity (TRMDS) and area under the disease severity progress curve (AUDPC) of grapevine downy mildew in genotypes containing different resistance loci, during the growing seasons 2014/15 and 2015/16 in Curitibanos, state of Santa Catarina, Brazil.....64

CAPÍTULO II

Table 1. Source host, location and date of collection of the *Plasmopara viticola* isolates used in the molecular characterization and controlled cross-inoculations.....76

Table 2. Primers sequence, repeat type, annealing temperature and allele size range of the 41 microsatellite loci employed in the genetic analysis of *Plasmopara viticola* isolates.....79

Table 3. Disease severity, sporulation density and severity of necrosis for four isolates of *Plasmopara viticola* at four and seven days post inoculation. The values represent the mean of 12 grapevine varieties inoculated with the isolates.....83

Table 4. Mean values of disease severity, sporulation density and severity of necrosis for each genotype obtained by the inoculation of the isolates PVL_2014, PVL_Regent, PVL_Orietta and PVL_16-02-102 in leaf discs bioassays under laboratory conditions.....85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Avr- Avirulência
C. V.- Coeficiente de variação
DNA – Ácido desoxiribonucléico
dNTPs – Deoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
F – Iniciador direto, “forward”
HR – resposta da hipersensibilidade
MAS – seleção assistida por marcadores moleculares
mg – Miligrama
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
mM – Milimolar
ng – Nanograma
ng µL⁻¹ – Nanograma por microlitro
pb – Pares de base
PCR – Polymerase Chain Reaction / Reação em Cadeia da Polimerase
pH – Potencial hidrogeniônico
QTLs-*Quantitative trait locus*
R – Iniciador reverso, “reverse”
rpm – Rotações por minutos
Rpv - Resistência a *Plasmopora viticola*
SSR – Marcadores microssatélites - Sequências simples repetidas
U – Unidade enzimática
µg- Microgramas
µL -Microlitros
µM – Micromolar
µm –Micrômetro

SUMÁRIO

1	SUMÁRIO	23
2	INTRODUÇÃO	27
2.1	OBJETIVOS	29
2.1.1	Objetivo Geral.....	29
2.1.2	Objetivos Específicos	29
3	DESENVOLVIMENTO	31
3.1	A cultura da videira.....	31
3.2	Importância sócio-econômica do cultivo da videira no Brasil.....	32
3.3	Panorama do cultivo de uvas em Santa Catarina	34
3.4	Suscetibilidade a doenças das variedades de uvas cultivadas	34
3.5	Ocorrência do Míldio na videira	35
3.6	Etiologia do míldio na videira.....	37
3.7	Epidemiologia e sintomas de <i>Plasmopara viticola</i>	38
3.8	Melhoramento genético visando à resistência a doenças	41
3.9	Uso de Microsatélites ou sequencias simples repetidas (SSR) no melhoramento de plantas.....	43
3.10	Mapeamento de QTLs.....	46
3.10.1	Origem da resistência	46
3.10.2	Genes de grande efeito e de pequeno efeito.....	48
3.11	Seleção assistida por marcadores moleculares.....	49
3.12	Piramidação de genes de resistência	50
4	CAPÍTULO I. The effect of pyramiding the resistance loci <i>Rpv1</i> and <i>Rpv3</i> on the progress of downy mildew in grapevine.....	57
5	CAPÍTULO II. Molecular characterization and aggressiveness examination of <i>Plasmopora viticola</i> isolates occurring in Trentino Alto Adige, Italy.....	73

6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	99
7	REFERÊNCIAS.....	100

INTRODUÇÃO

As regiões de altitude elevada de Santa Catarina (entre 900 e 1.400 metros) estão entre as melhores regiões brasileiras para a produção de vinhos finos e espumantes e as uvas produzidas nestas regiões apresentam características próprias e distintas das demais regiões produtoras no Brasil, com maturação completa, o que permite a elaboração de vinhos e espumantes de alta qualidade (BURIN et al., 2011; GRIS et al., 2011; BORGHEZAN et al., 2011; MALINOVSKI et al., 2012, 2016; BRIGHENTI et al., 2014, 2015, 2016; MUNIZ et al., 2015).

Nesses locais, como nas principais regiões vitícolas do mundo, a produção de vinhos finos é baseada exclusivamente em variedades europeias (*Vitis vinifera* L.), tais como: Cabernet Sauvignon, Merlot, Sauvignon Blanc, Chardonnay e Pinot Noir, entre outros. As variedades europeias são mundialmente cultivadas devido ao elevado potencial enológico que apresentam. No entanto, estas variedades são suscetíveis a uma série de estresses bióticos, dentre os quais se destacam as doenças fúngicas.

Atualmente, grandes quantidades de fungicidas são aplicadas mundialmente no controle das doenças fúngicas. No Brasil, a região Sul, maior produtora de uva para elaboração de vinhos e espumantes, caracteriza-se por verões quentes e úmidos (PANDOLFO et al., 2002). Esta condição ambiental favorece o ataque de doenças, especialmente o míldio da videira (*Plasmopara viticola*), dificultando o cultivo de variedades europeias (MENDES, 2002). O cultivo destas variedades nestas condições ambientais requer aplicações preventivas massivas de fungicidas para o controle das doenças (FREIRE et al., 1992).

O controle químico destas doenças resulta no aumento do custo de produção e do *input* energético necessário ao cultivo da videira, além de oferecer uma série de riscos a saúde humana, animal e ambiental, comprometendo a sustentabilidade do sistema produtivo. Neste cenário, o desenvolvimento de novas variedades adaptadas às condições locais de cultivo, resistentes as doenças e com elevado potencial enológico torna-se essencial na busca de um sistema de cultivo mais sustentável.

Com o intuito de criar novas variedades que conciliem qualidade de vinho com resistência durável às principais doenças de ocorrência no Estado de Santa Catarina, pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão

Rural (EPAGRI) em parceria com pesquisadores da Fondazione Edmund Mach da Itália, propuseram dois projetos, em um primeiro momento aprovou-se o projeto intitulado “Tecnologias para o Desenvolvimento da Vitivinicultura Catarinense”, que teve início no ano de 2006 e teve por finalidade introduzir e avaliar a adaptação de diversas variedades italianas nas principais regiões de altitude do Estado, com a possibilidade de produção de uvas para vinho com elevada qualidade e tipicidade, que expresse as características dessa nova região produtora.

Em um segundo momento aprovou-se o projeto intitulado “Avaliação vitivinícola de genótipos de videira nas condições edafoclimáticas de Santa Catarina”. Essa segunda proposta visou dar continuidade ao primeiro projeto resultante do convênio firmado entre o Governo do Estado de Santa Catarina e a Província Autônoma de Trento (Itália), com participação técnica-científica da Epagri, UFSC e do Instituto Agrário di San Michele all’Adige – Itália, com a inclusão da participação do “Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof” (Alemanha). Esta cooperação apoiou de 2013 a 2016, ações de Ciência e Tecnologia da vitivinicultura catarinense, a qual se encontra em processo de expansão nos últimos anos, na busca de novas tecnologias para a melhoria dos vinhedos, das uvas e dos vinhos.

Concomitante a estes dois projetos em 2012 foi aprovado pela FAPESC o projeto intitulado “Desenvolvimento e aplicação de marcadores moleculares na piramidação de genes de resistência às principais doenças fúngicas que atacam a videira na mesorregião serrana/SC”, de autoria do Dr. Leocir José Welter, professor e pesquisador da UFSC campus Curitibanos. Este projeto teve por objetivo desenvolver e aplicar marcadores moleculares na piramidação de genes de resistência, buscando o desenvolvimento de novas variedades que conciliem qualidade de vinho com resistência durável às principais doenças de ocorrência na mesorregião serrana de Santa Catarina.

Neste programa estadual de melhoramento, anualmente são realizados cruzamentos entre genótipos resistentes oriundos de programas de melhoramento de videira da Itália e Alemanha; e utilizados marcadores moleculares para assistir a piramidação de genes de resistência a doenças. Genótipos contendo locos de resistência ao míldio (*Rpv1* e *Rpv3*) e oídio (*Run1* e *Ren3*) foram selecionados e implantados a campo e estão sendo avaliados quanto a caracteres agrônômicos e resistência às doenças, e seu desempenho está sendo

comparado com genótipos e variedades já estabelecidos nos programas de melhoramento de videira da Europa a fim de realizar a melhor escolha para a nossa região, com padrões altos de eficiência produtiva e de resistência a doenças.

Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho foi estimar as diferenças entre genótipos com diferentes genes de resistência ao míldio e entre diferentes isolados do patógeno *P. viticola*.

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo Geral

Avaliar variedades de videira com diferentes graus de resistência ao míldio (*Plasmopora viticola*), com ou sem genes piramidados, e proceder uma caracterização molecular do patógeno quanto a sua diversidade.

2.1.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar genótipos de videira do programa de melhoramento da UFSC, campus Curitibanos, quanto à resistência ao míldio durante um ciclo completo da planta;
- b) Avaliar genótipos piramidados do programa de melhoramento da UFSC, campus Curitibanos, e comparar o desenvolvimento do patógeno em relação aos demais genótipos;
- c) Associar as condições climáticas de Curitibanos com a incidência e severidade de míldio nas plantas de videira do programa de melhoramento genético da UFSC;
- d) Proceder caracterização molecular e avaliar as diferenças genotípicas dos isolados de míldio da região do Trentino Alto Adige;
- e) Avaliar as diferenças fenotípicas em genótipos e variedades italianas da região do Trentino Alto Adige em relação à resistência ao míldio, a partir de isolados de *P. viticola* coletados na região;
- f) Examinar a existência de diferenças na agressividade do patógeno quando inoculado em diferentes genótipos e variedades com diferentes QTLs de resistência para míldio.

DESENVOLVIMENTO

3.1 A cultura da videira

A videira é considerada a mais antiga fruta domesticada que se tem conhecimento, devido o registro de muitas civilizações antigas (SOUZA, 1996). Ela pertence a família Vitaceae, compreendendo 14 gêneros, entre os que se inclui *Parthenocissus*. A este gênero pertencem as vinhas silvestres (*P. tricuspidata* e *P. quinquefolia*), originárias da Ásia e da América do Norte, e o gênero *Vitis*, originário das zonas temperadas do hemisfério norte (América, Europa e Ásia) (REYNIER, 1995). Em contraste com várias outras famílias botânicas, tais como Solanaceae, Leguminosae, Rosaceae e Gramíneae, *Vitis* é o único gênero de importância agrícola na família Vitaceae (RIAZ et al., 2004; THIS et al., 2006).

O gênero botânico *Vitis* consiste aproximadamente de 60 espécies interférteis que ocorrem quase exclusivamente no hemisfério Norte (THIS et al., 2006) e inclui dois subgêneros: *Euvitis*, ou da videira verdadeira, e *Muscadinia* (WINKLER, 1980; ALLEWELDT e POSSINGHAM, 1988). O subgênero *Euvitis* está composto por mais de 50 espécies que se distribuem na América do Norte, e destas, vinte espécies apresentam poucos atributos viníferos, com exceção de *Vitis labrusca*. Na Europa ocidental há apenas uma espécie, *Vitis vinifera*, que apresenta grandes qualidades para a produção de vinho e espumantes, uvas de mesa e uvas passas (WINKLER, 1980; SOUSA, 1996). O subgênero *Muscadinia* compreende três espécies, originadas do sudeste dos Estados Unidos da América e México (*V. munsoniana*, *V. rotundifolia* e *V. popenoeii*); unicamente a espécie *V. rotundifolia* se cultiva nestas regiões para a produção de doces, geleias e sorvetes, para consumo *in natura* e para vinho, pois apresenta sobre tudo um grande interesse para o melhoramento genético, porque é resistente às doenças e à filoxera (REYNIER, 1995).

A videira europeia ou grupo de *V. vinifera* caracteriza-se por uma ampla variabilidade morfológica e fisiológica e tem frutos de excelente qualidade (ALLEWELDT e POSSINGHAM, 1988). Hoje é cultivada em todas as regiões temperadas e tropicais do mundo para frutas frescas, frutas secas, suco e amplamente utilizada na indústria mundial de vinhos finos e espumantes (RIAZ et al., 2004; THIS et al., 2006).

As variedades europeias, individualmente, apresentam interesse econômico significativo ao longo do tempo, enquanto que, algumas

outras espécies, por exemplo, as Americanas (*V. rupestris*, *V. riparia* ou *V. berlandieri*), tem importância no melhoramento, devido à sua resistência contra pragas e patógenos de videira, tais como filoxera, oídio e míldio (TERRAL et al., 2010).

As videiras europeias foram introduzidas em regiões fora do seu habitat natural. Para que isto ocorresse com sucesso, foram muitas vezes hibridizadas com espécies de *Vitis* nativas, por exemplo, na América do Norte, América Central e do Japão. Isto resultou em híbridos mais adaptados a ambientes locais e habilitando a viticultura, onde espécies viníferas não poderiam ter sobrevivido devido à sua suscetibilidade às doenças fúngicas ou geadas severas no inverno (ALLEWELDT e POSSINGHAM, 1988). Segundo Sousa (1996), a espécie *V. vinifera* com sua enorme quantidade de variedades é a única de real importância econômica, mas espécies silvestres do gênero *Vitis* têm contribuído, através de cruzamentos interespecíficos, acidentais ou planejados, para a adaptação da videira às mais diferentes condições que a sua expansão tem exigido.

Atualmente a viticultura brasileira, apresenta uma grande diversidade cuja atividade ocupa uma área de aproximadamente 83.700 hectares, com uma produção anual variando entre 1.300 e 1.400 mil toneladas. Há uma grande variabilidade no material genético utilizado, sendo mais de 120 variedades de *V. vinifera* e mais de 40 variedades de uvas americanas, incluindo as castas de *V. labrusca*, *V. bourquina* e de híbridos interespecíficos (CAMARGO et al., 2011). No Estado de Santa Catarina, historicamente, os vinhos eram produzidos principalmente a partir de espécies americanas (*V. labrusca*), ou de híbridos interespecíficos adaptados às condições ambientais do Estado. Porém, desde 1998, a viticultura em Santa Catarina vem sofrendo intensa transformação, com o crescente uso de variedades européias (*V. vinifera*) ano a ano (Schuck et al. (2009).

3.2 Importância sócio-econômica do cultivo da videira no Brasil

A viticultura brasileira teve início com a chegada dos colonizadores portugueses, no século XVI. Somente a partir do início do século XX tornou-se uma atividade comercial no Brasil, iniciativa dos imigrantes italianos estabelecidos no Sul do país a partir de 1875. Na década de 1970 a vitivinicultura brasileira apresentou uma grande evolução, devido ao investimento de grandes empresas estrangeiras, na produção de uvas e vinhos no Estado do Rio Grande do Sul (BRIGHENTI & TONIETTO, 2004).

A viticultura é uma atividade muito importante no Brasil, especialmente para os Estados localizados no nordeste, sudoeste e sul do país (HAMADA et al., 2008). Destacam-se, pelo volume de produção os Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Paraná, Bahia, Santa Catarina e Minas Gerais (Camargo et al., 2011).

A viticultura de clima temperado é uma atividade tradicional e representa cerca de 88% da área de vinhedos e mais de 98% da uva utilizada para processamento de vinhos, sucos e outros derivados do país (IBRAVIN, 2012). Em 2014, a produção de uvas destinadas ao processamento foi de 673.422 milhões de quilos de uvas, representando 46,89% da produção nacional. O restante da produção (53,11%) foi destinado ao consumo *in natura* (MELLO, 2015).

Em 2015 a área brasileira plantada com uvas foi superior a 76 mil hectares, compreendendo tanto as áreas de uvas para processamento como para o consumo *in natura*. A área plantada decresceu nos últimos anos, entretanto o Rio Grande do Sul continua se destacando em relação aos demais Estados, representando cerca de 65% da área plantada no país (CALIARI, 2016).

O setor vitivinícola nacional, nos últimos anos, tem recebido investimentos significativos para a melhoria da qualidade de toda a cadeia produtiva. Além disso, o atual período da vitivinicultura é caracterizado pela identidade regional, com a elaboração de vinhos de qualidade típicos e a caracterização das regiões em *terroirs* na formação das Indicações Geográficas (IG). A implementação destes signos de qualidade, com a produção de vinhos em regiões delimitadas, é uma das alternativas para o aumento da competitividade do vinho nacional e o fortalecimento da produção de vinhos com identidade regional (MELLO, 2013; SILVA, 2008).

O Estado de Santa Catarina teve uma área colhida de 4,7 mil hectares e sua produção foi de 37,3 mil toneladas de uvas (CALIARI, 2016). Em face de uma expressiva quebra de produção, de 2015 para 2016 a quantidade de uvas processadas decresceu 57,3% no Rio Grande do Sul e 68,7% em Santa Catarina.

As uvas produzidas em regiões de altitude de Santa Catarina apresentam características próprias e distintas das demais regiões produtoras no Brasil, o que permite a elaboração de vinhos de alta qualidade. Isso se deve ao fato do Planalto Sul Catarinense apresentar características particulares, como a proximidade ao Oceano Atlântico (cerca de 150 km), a localização predominantemente na latitude 28° S e altitudes de 800 a 1.400 metros acima do nível do mar (BRIGHENTI; TONIETTO, 2004; FALCÃO et al., 2007; BORGHEZAN et al., 2011;

BURIN et al., 2011; MALINOVSKI et al., 2012, 2016 ; BRIGHENTI et al., 2014, 2015, 2016; MUNIZ et al., 2015).

3.3 Panorama do cultivo de uvas em Santa Catarina

A viticultura é uma atividade já tradicional em nove regiões brasileiras. Como zonas de viticultura temperada destacam-se as regiões da Campanha Gaúcha, Serra do Sudeste, Serra Gaúcha, Campos de Cima da Serra e regiões Central e Norte do Estado do Rio Grande do Sul; as regiões do Vale do Rio do Peixe, Planalto Serrano e Planalto Norte e Carbonífera, no Estado de Santa Catarina.

As regiões de altitude, no Planalto Serrano do Estado de Santa Catarina têm se destacado na produção de vinhos. A região pode ser estruturada em três pólos produtores: São Joaquim, Campos Novos e Caçador. Situam-se entre as latitudes 26° e 28°S e entre as longitudes 50° e 52°W, com altitude variando entre 900 e 1.400m., sendo que estes pólos produtores estão voltados exclusivamente ao cultivo de variedades de *Vitis vinifera*, para a produção de vinhos finos e espumantes (BRIGHENTI; TONIETTO, 2004, IBRAVIN, 2012).

O clima do Planalto Sul de Santa Catarina é classificado como Cfb, segundo Köppen (PEEL et al., 2007), com temperatura média anual de 13,4°C, média das mínimas de 9,4°C e média das máximas de 18,9°C. A temperatura média do mês mais quente (fevereiro) é de 19,6°C. A precipitação pluvial média anual é de 1621 mm e a umidade relativa do ar média anual é de 80% (EMPRAVA, 2012). As temperaturas médias mais baixas na fase de maturação criam condições especiais para a vitivinicultura voltada para a produção de vinhos finos (FALCÃO et al., 2007). Mas o excesso de chuvas e os verões úmidos e amenos favorecem o ataque de doenças, especialmente o míldio da videira.

3.4 Suscetibilidade a doenças das variedades de uvas cultivadas

A ocorrência de doenças reduzem a produtividade das plantas e a qualidade da uva produzida e podem em determinadas situações, inviabilizar a produção de uva (OLIVEIRA et al., 2005). No sul do Brasil as principais doenças são o míldio (*Plasmopara viticola*), a antracnose (*Elsinoe ampelina*) e as podridões de frutos. Os danos de necrose irreversível e o desfolhamento precoce provocado por estas doenças causam queda na produtividade, pela redução da área

fotossintética e, conseqüentemente, diminuição da produção de carboidratos (GAVA et al., 2004).

Buscando explorar a variabilidade genética, os programas de melhoramento de videira têm disponibilizado variedades que, além dos atributos de produtividade e qualidade, agregam a resistência a doenças, tendo em vista que é o interesse crescente em favor da saúde de produtores e dos consumidores, além da sustentabilidade ambiental e econômica das atividades agrícolas.

3.5 Ocorrência do Míldio na videira

O míldio da videira é causado pelo oomyceto *P. viticola* (Berk & Curtis.) Berl. & de Toni, que infecta todos os tecidos verdes da videira, incluindo folhas, cachos, bagas, gavinhas e brotos causando prejuízos sobre a futura produção, por provocar a morte de tecidos foliares e desfolha precoce e, conseqüentemente, o enfraquecimento da planta (GARRIDO e SÔNEGO, 2002; MATASCI et al., 2008).

O míldio é uma doença complexa, classificada como policíclica, na qual várias gerações do patógeno ocorrem em um mesmo ciclo de cultivo e, conseqüentemente, a quantidade de inóculos produzida ao final de cada ciclo do patógeno é aumentada em muitas vezes, resultando em altos índices de infecção, na ausência de medidas de controle curativo (BEDENDO, 2011).

Esta doença é originária da América do Norte, onde sempre ocorreu em videiras selvagens. Atualmente *P. viticola* apresenta ampla distribuição mundial, infectando principalmente variedades suscetíveis de *V. vinifera*. Sua introdução no Brasil ocorreu conjuntamente com a introdução das videiras americanas em São Paulo (SANTOS-NETO, 1955; GARRIDO e SÔNEGO, 2002).

A doença é responsável pelos maiores danos à viticultura no sul do Brasil, com efeitos extremamente danosos à sua produção, provocando grandes perdas caso não sejam adotadas medidas de controle (CZERMAINSKI e SÔNEGO, 2004; HAMADA et al., 2008; PERUCH e BRUNA, 2008).

A umidade relativa do ar considerada ideal para as diversas atividades metabólicas da videira está entre 62 e 68%. Em geral, locais com alta umidade relativa do ar favorecem a infecção por patógenos (GIOVANNINI, 2014), que associada às temperaturas elevadas pode provocar altas incidências de míldio nos vinhedos, podendo até inviabilizar a produção (TEXEIRA et al., 2002).

Nos climas úmidos, tanto nas Américas como na Europa, o controle do míldio é baseado principalmente na aplicação de fungicidas (CADLE-DAVIDSON, 2008; CAFFI et al., 2010). Com a utilização de variedades suscetíveis ao míldio (*V. vinifera*), clima favorável e a presença do patógeno no sul do Brasil, o uso repetido de fungicidas durante o período de vegetação torna-se uma das únicas estratégias de manejo que podem conter as epidemias (KORTEKAMP et al., 2008). A necessidade de aplicações recorrentes de fungicidas levanta preocupações sobre a segurança ambiental, seja para protetores à base de cobre sintéticos ou fungicidas mais modernos e promove o aparecimento de resistência a estes produtos (KORTEKAMP et al., 2008).

No Brasil são necessárias diversas aplicações de fungicidas para o controle do míldio (Czermainski e Sônego, 2004). Produtos a base de cymoxanil + mancozeb e metalaxil + mancozeb e dithianona, foram os mais eficazes no controle da doença na cv. Tannat, independentemente das condições climáticas observadas em cada ano. Segundo Shimano e Sentelhas (2013), o número de pulverizações empregadas pelo sistema do calendário foi invariavelmente maior do que o necessário para o controle do míldio, da antracnose e das manchas das folhas, o que demonstra que a racionalização do uso de agrotóxicos para controle de doenças fúngicas na videira *V. labrusca* é uma necessidade e deve ser baseada em sistemas que levem em consideração pelo menos dados pluviométricos.

O uso de cobertura plástica sobre vinhedos no Brasil pode diminuir a incidência de doenças fúngicas em regiões que apresentam excesso de chuvas no desenvolvimento e na maturação dos frutos e esta cobertura ocasiona modificações no microclima junto às videiras, cujas alterações propiciam condições favoráveis ao crescimento e incremento da produtividade (CHAVARRIA e SANTOS, 2009). Esse procedimento é uma alternativa válida para a minimização do molhamento da parte aérea da videira causado pela chuva e pode reduzir a ocorrência e severidade do míldio, reduzindo o número de pulverizações de fungicidas em até 75% em relação à tela antigranizo (GENTA et al., 2010).

A cobertura plástica aumenta a temperatura diurna próxima ao dossel vegetativo, e não influencia na umidade relativa do ar, diminui a radiação fotossinteticamente ativa e a velocidade do vento e restringe drasticamente a água livre sobre as folhas e cachos (CHAVARRIA et al., 2007). Nessas condições, o cultivo protegido não permite o estabelecimento de míldio e diminui a incidência e a severidade de

podridões de cacho, devido à alteração microclimática. Entretanto, estas alterações microclimáticas de ambiente quente e seco no vinhedo favorecem a germinação dos conídios do oídio pela luz difusa (CRUZ, 2001).

Os focos de oídio em videiras sob cultivo protegido ainda requerem o uso de pulverizações de fungicidas (CHAVARRIA et al., 2007; GENTA et al., 2010), ou seja, embora a cobertura plástica seja eficaz na incidência e severidade do míldio, seu uso acaba favorecendo a infecção por *Erysiphe necator* (sin. *Uncinula necator*) que precisaria ser controlado também com o uso de fungicidas. Desta forma, todos os benefícios ambientais e monetários conquistados no desaparecimento do míldio seriam perdidos com a incidência dos oídios. Além disto, a cobertura plástica não seria uma alternativa viável para grandes vinhedos devido a sua baixa durabilidade, em média 2 a 3 anos, e também por ter que mudar a forma de condução das videiras, passando de condução em espaldeira para outro tipo. Assim o melhoramento genético para desenvolvimento de novas variedades aparece como uma das estratégias mais eficazes no controle destas doenças.

3.6 Etiologia do míldio na videira

O míldio da videira é causado pelo parasita obrigatório, *P. viticola* (Berk & Curtis.) Berl. & de Toni. Pertence ao Reino Chromista, Filo Oomycota, Classe Oomycetes, Ordem Peronosporales, Família Peronosporaceae.

Os esporangióforos do fungo medem de 140 a 250 μm . Na sua extremidade formam-se esporângios hialinos, elipsóides que medem 14 x 11 μm . Cada esporângio contém de um a dez zoósporos biflagelados com dimensões de 6 a 8 x 4 a 5 μm . Os zoósporos são providos de dois flagelos que possibilitam a sua movimentação em meio líquido. Após aproximadamente 30 minutos de constante movimentação, os zoósporos entram em repouso (encistam) e aproximadamente 15 minutos depois emitem um tubo germinativo que penetra na planta através dos estômatos e produz hifas cenocíticas intercelulares, provido de haustórios que se encarregam da absorção de substâncias nutritivas da planta. Uma vez estabelecida a infecção, há nas lesões abundante frutificação constituída de esporângios, correspondente à fase assexuada do fungo, repetindo-se várias vezes o ciclo secundário (AGRIOS, 2005).

3.7 Epidemiologia e sintomas de *Plasmopara viticola*

O ‘fungo’ *P. viticola* é um oomiceto heterotálico, ou seja, possui micélio auto-estéril e requer a participação de outro talo compatível para que ocorra a reprodução sexuada (WONG et al., 2001). O patógeno possui dois tipos de reprodução: sexuada e assexuada. Nas regiões de clima temperado, o ciclo sexual ocorre no outono (quando a temperatura está inferior a 12° C). A reprodução sexuada ocorre pelo cruzamento entre hifas haploides, no interior das folhas infectadas, formando estruturas de resistência diploides pela fusão de um anterídio e um oogônio, denominados oósporos, que representam o meio de sobrevivência do patógeno no inverno em regiões de clima temperado (KENNELLY et al., 2007). A fase assexuada é responsável pelos múltiplos ciclos da doença e ocorre ao longo do período de crescimento vegetativo da videira, enquanto que a fase sexuada é responsável pela produção de oósporos, que representam o inoculo primário para a estação seguinte.

O ‘fungo’ *P. viticola* pode infectar todas as partes verdes e em desenvolvimento da videira, causando maiores danos quando afeta flores e frutos pequenos. Os zoósporos possuem motilidade para penetrar através dos estômatos e colonizar o espaço intercelular do mesófilo foliar (KORTEKAMP et al., 1998; KIEFER et al., 2002). Durante a colonização de *P. viticola* ocorre a formação do haustório para a nutrição do fungo (BOSO e KASSEMAYER, 2008).

A germinação de oósporos de *P. viticola* ocorre na primavera, quando a temperatura média supera 10°C e ocorrem precipitações de, ao menos, 10 mm em 24 horas. Os oósporos irão emitir filamentos que formam esporângios, que após se fixarem nas plantas podem liberar zoósporos, dando início à infecção primária. Esta infecção ocorre quando se atinge a regra dos três 10: mínimo de 10 mm de chuva em 24 horas, mínimo de 10°C de temperatura média e mínimo de 10 cm de comprimento dos brotos (KENNELLY et al., 2007; GESSLER et al., 2011; GIOVANNINI, 2014).

A infecção secundária ocorre já com a presença do mofo branco, causado na infecção primária, que possui uma grande massa de órgão de propagação, o que torna a difusão do parasita ainda mais fácil. As condições para as infecções secundárias ocorrerem são ao menos de 4 a 5 horas de presença de água livre sobre a superfície foliar e temperaturas médias entre 14°C e 28°C. À temperatura de 15°C existe um aumento na intensidade da doença, devido à germinação indireta dos esporângios. Estas condições facilitam a germinação dos esporângios, que irão

envolver a superfície foliar até os estômatos, onde irão parasitar a folha (KENELLY et al., 2009; GESSLER et al., 2011; GIOVANNINI, 2014).

O ciclo da doença pode levar de 5 a 18 dias (**Figura 1**), dependendo da temperatura, umidade relativa do ar, e da suscetibilidade da variedade (AGRIOS, 2005). Em condições ótimas, podem ocorrer vários ciclos secundários em um mesmo ciclo de cultivo.

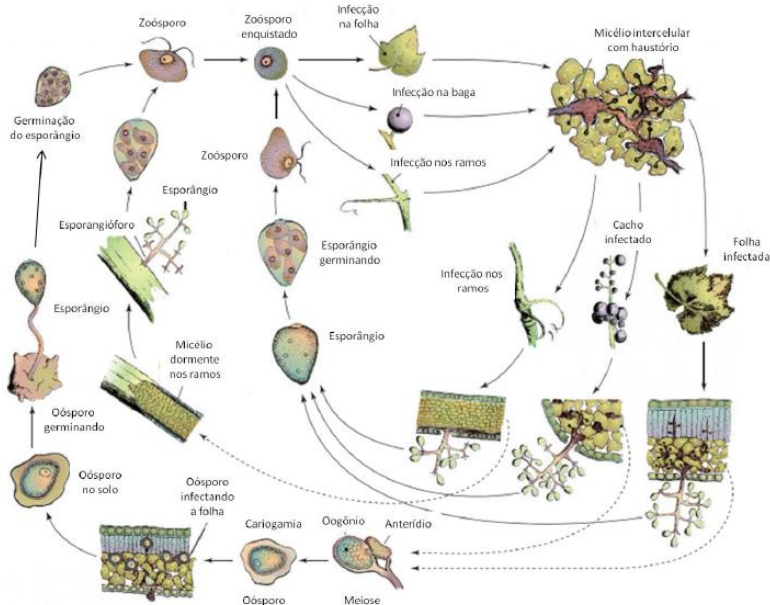


Figura 1. Ciclo de doença do míldio em videira causado por *Plasmopara viticola*. Fonte: DOS ANJOS (2013) adaptado de AGRIOS (2005).

Os agentes de disseminação mais comuns são o vento, que propicia a dispersão de esporângios a distâncias relativamente grandes e a água, principalmente através de respingos, que espalha esporângios e zoósporos para plantas vizinhas e para a própria planta doente. A disseminação a longa distância ocorre pelo transporte de material vegetal infectado. Quando um esporângio alcança uma folha suscetível, tem início a etapa de infecção.

O primeiro sintoma da doença nas folhas é o aparecimento da mancha-de-óleo na face superior, de coloração clara (**Figura 2A**). Na face inferior correspondente, aparecem estruturas esbranquiçadas que

são os órgãos de frutificação do fungo (esporangióforos com esporângios), que saem através dos estômatos (**Figura 2B**). As áreas da folha infectada sofrem dessecação e tornam-se marrons devido à morte celular. Quando o ataque do fungo é muito intenso, as folhas doentes caem prematuramente, privando a planta de seu órgão de nutrição. Durante a floração, o patógeno provoca o escurecimento e a destruição das flores afetadas. Nos estádios da pré-floração e em bagas pequenas, o fungo penetra pelos estômatos, paralisando a passagem de seiva e água, causando escurecimento e secamento dos órgãos. As bagas infectadas nessa fase apresentam coloração pardo-escuro e são facilmente destacadas do cacho (**Figura 2C e 2D**). Frutos no início de formação (**Figura 2C**) são altamente suscetíveis ao míldio e as bagas infectadas permanecem firmes comparadas às bagas sadias (**Figura 2D**), que amolecem à medida em que amadurecem (LIMA et al., 2009). O período crítico da planta ao ataque do fungo ocorre no início da floração e formação das bagas. Além de perdas de rendimento, a ocorrência da doença causa perdas indiretas reduzindo a atividade fotossintética das folhas afetadas e provocando a desfolha precoce (AGRIOS, 2005).

Os sinais da doença surgem com a formação das frutificações assexuadas do patógeno, quando o micélio volta a atravessar os estômatos para o exterior, formando os esporangióforos e esporângios, constituindo uma massa esbranquiçada com aspecto aveludado (o míldio). A liberação dos esporângios, onde os zoósporos são formados, marca o início de um novo ciclo.

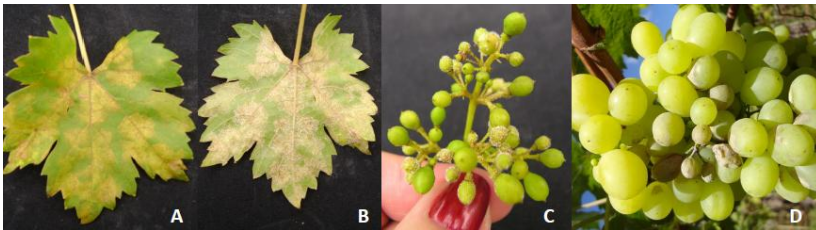


Figura 2. Sintomas causados por *Plasmopara viticola* em folhas e bagas de videira: (A) mancha de óleo na face superior da folha; (B) esporulação recente na face inferior da folha; (C) esporulação de *P. viticola* em frutos novos e (D) sintoma do ataque do patógeno no cacho, causando escurecimento e ressecamento dos frutos novos. Fonte: DOS ANJOS (2013).

3.8 Melhoramento genético visando à resistência a doenças

O consumo de uvas *in natura* ou como vinho faz parte da história do homem que, em todas as suas conquistas, a utilizou para celebrar momentos importantes (LEÃO; BORGES, 2009). Grande parte das variedades de *V. vinifera* existentes são consequência da grande diversidade morfogênética, a fácil propagação assexuada e a domesticação da espécie que ocorreu há cerca de 6.000 anos (POMMER, 2003).

Entretanto, em 1860, a morte de plantas em vinhedos franceses, devido a um pulgão subterrâneo conhecido como filoxera que ataca as raízes da planta (GIOVANNINI, 2001), modificou a história da viticultura mundial (LEÃO; BORGES, 2009). Fontes de resistência foram identificadas nos Estados Unidos, onde o inseto vivia em simbiose com os tipos americanos e o governo francês passou a importá-las para realizar seleção local. *Vitis riparia* e *Vitis rupestris* mostraram-se as mais tolerantes e foram largamente propagadas (Pommer, 2003).

Na Europa, a partir do século 20, com a justificativa do surgimento de fungicidas para o controle das doenças fúngicas e da baixa qualidade dos vinhos produzidos pelas variedades híbridas, passou-se a dar grande ênfase à criação de variedades tradicionais para a produção de vinhos por meio da seleção clonal (CAMARGO; RITSCHHEL, 2008).

A utilização de hibridação interespecífica passou a ocorrer ainda na metade do século 19, com o objetivo de se obter híbridos de porta-enxertos resistentes à filoxera, no intuito de se manter intactas as qualidades das variedades-copa. Nos anos subsequentes, foram obtidos híbridos interespecíficos, buscando-se resistência a doenças causadas por fungos, como o do míldio (*P. viticola*) e oídio (*U. necator*) (CAMARGO; RITSCHHEL, 2008).

Especialmente espécies americanas foram testadas na Europa e utilizadas em hibridações com variedades viníferas, gerando uma série de novas variedades híbridas que são utilizados atualmente nos vinhedos de quase todo o mundo (WINKLER, 1980). As espécies americanas possuíam resistência a estas pragas e doenças porque co-evoluíram com as mesmas, e *V. rotundifolia* é considerada como tendo a resistência mais forte entre todas as espécies americanas (OLMO, 1986). Todas as fontes de resistência para esses patógenos são espécies selvagens de baixa qualidade enológica (ADAM-BLONDON et al., 2004).

A combinação da resistência de espécies americanas com *V. vinifera* tornou-se uma importante estratégia para combater as doenças

fúngicas (FISHER et al., 2004). Um grande problema, porém, é o longo tempo necessário para produzir uma nova variedade que une resistência e alta qualidade do vinho. Várias gerações de retrocruzamentos com variedades de *V. vinifera* são necessários, a fim de restaurar os atributos de qualidade (ADAM-BLONDON et al., 2004; KORTEKAMP et al., 2008).

A utilização de controle químico passou a sofrer fortes restrições nas últimas décadas, pois nem sempre se revela como o método mais adequado de controle de pragas e doenças. A preocupação crescente com o meio ambiente, com a saúde pública, a qualidade de vida do consumidor e a expansão competitiva dos mercados agrícolas vêm motivando os produtores a aperfeiçoar as práticas culturais utilizando menos fungicidas e sempre buscando a utilização de variedades resistentes. Uma das formas mais eficientes para o controle de doenças de plantas tem sido a seleção de fontes de resistência e a transferência desta resistência para variedades comercialmente aceitas (LEÃO; BORGES 2009).

Em vários países os programas de melhoramento genético visam o desenvolvimento de novas variedades resistentes ao míldio e ao oídio. Deste modo, é fundamental que fontes de resistência sejam caracterizadas para o seu melhor uso no melhoramento genético. No Brasil, o primeiro programa de melhoramento de videira foi desenvolvido pelo IAC (Instituto Agronômico de Campinas), que teve início em 1943, devido à grande relevância da viticultura no Estado de São Paulo o programa visava à obtenção de variedades de uvas de vinho, uvas de mesa e porta-enxertos (FERRI; POMMER, 1995).

Os autores verificaram que *P.viticola* apresentou sucesso na colonização das anfitriãs europeias, enquanto que nas espécies Siberianas não-asiáticas foram observados somente hifas na superfície foliar. Em outro estudo Khiavi et al. (2012), no Irã, avaliaram a resistência ao oídio em variedades de videiras e encontraram resultados promissores. Os autores classificaram as variedades como altamente resistentes ao oídio e concluíram que estas poderiam ser usadas como fonte de resistência genética em programas de melhoramento genético da videira. Nesta linha, Reisch & Pratt (1996) citam *V. aestivalis*, *V. cinerea* e *V. labrusca*, como fontes de resistência ao míldio, e *V. cinerea* e *V. rupestris*, como fontes de resistência ao oídio. Há uma ênfase para a seleção por imunidade ou ao menos para altos níveis de resistência e genes que conferem estas características são manipulados em gerações segregantes (ELLINGBOE, 1978; BROWN, 2015; GÓMEZ-ZELEDÓN, 2016; OCHSSNER, 2016; XIANG et al.,

2016) através de hibridação. Finalmente, a utilização de plantas resistentes tem como grande vantagem à redução dos riscos de contaminação do homem e do meio ambiente, causados pelo uso de fungicidas potencialmente perigosos e, conseqüentemente, a redução dos custos de produção, que muitas vezes é elevado devido ao uso de fungicidas (LESTER, 1984, DELMOTTE et al., 2006, KORTEKAMP et al., 2008; SCHWANDER et al., 2012; ROSSBERG, 2013).

3.9 Uso de Microssatélites ou sequencias simples repetidas (SSR) no melhoramento de plantas

Os marcadores moleculares são características genéticas entre indivíduos ou espécies, e geralmente eles não representam os genes-alvo, mas atuam como "sinais" ou "marcas", devido estarem localizados na proximidade de genes de interesse, ou seja, estão fisicamente ligados. Além disso, não afetam o fenótipo da característica de interesse (COLLARD et al., 2005). Estas são marcas herdáveis e passíveis de utilização na seleção de plantas. Entre as aplicações dos marcadores moleculares no melhoramento vegetal está a seleção assistida de características de importância agrônômica, a qual se fundamenta no mapeamento e associação de marcadores moleculares a genes que controlam essas características de interesse (OLIVEIRA et al., 2005).

O uso de marcadores moleculares viabiliza a caracterização genética de grande número de genótipos por meio de procedimentos relativamente rápidos. A detecção de marcadores ligados a genes de interesse agrônômico permite a seleção de genitores superiores em programas de melhoramento de forma objetiva e precisa, determinando a formação de populações segregantes com alta frequência de genótipos superiores (BERED, 1997). Comparados com os caracteres morfológicos, os marcadores moleculares que detectam polimorfismos no nível do DNA tem a vantagem de serem neutros frente ao ambiente, possuírem maior poder discriminativo e serem altamente reproduzíveis e detectáveis em todas as fases de crescimento da planta (FRANCIA et al., 2005; MARTÍNEZ et al., 2006).

Uma classe de marcadores moleculares que tem sido amplamente utilizada nos últimos anos são os chamados microssatélites, também conhecidos como sequências simples repetidas ou *Simple Sequence Repeats* (SSR), que são regiões de sequências pequenas (dois a seis pares de bases), repetidas em “tandem”, organizadas em série e distribuídas aleatoriamente pelo genoma (FALEIRO, 2007). Estas sequências são altamente variáveis, pois sofrem alta taxa de mutação, e

estão dispersas em muitos sítios nos genomas de fungos, plantas e animais, os quais podem ou não estar associados com genes (AZOFEIFA-DELGADO, 2006).

Os microssatélites são amplamente utilizados em estudos genéticos, incluindo a caracterização genética, genética de populações, melhoramento genético e testes de paternidade. Esta gama de aplicações é devida ao fato destes apresentarem herança mendeliana, serem codominantes, apresentarem alto nível de polimorfismo, serem altamente reprodutíveis, terem alta resolução e serem baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) (OLIVEIRA et al., 2006; TROGGIO et al., 2007).

Segundo Oliveira et al. (2006) os microssatélites são classificados, de acordo com o tipo de sequência repetida que representam, em perfeito, imperfeito, interrompido ou composto. Em um microssatélite perfeito, a sequência de repetição não é interrompida por qualquer base que não pertencem ao padrão (por exemplo, TATATATATATATA), enquanto que em um microssatélite imperfeito há um par de bases entre os motivos repetidos que não correspondem à sequência motivo (por exemplo, TATATATACTATATA). No caso de um microssatélite interrompido, há uma pequena sequência dentro da sequência repetida que não coincide com a sequência motivo (por exemplo, TATATACCGTGTTATATATA), enquanto que em um microssatélite composto contém a sequência de duas repetições de sequências distintas e adjacentes (por exemplo, TATATATATAGTGTGTGTGT).

A fim de gerar um conjunto de marcadores codominantes para estudos genéticos da videira, 21 grupos de pesquisa formaram um consórcio internacional para identificar marcadores microssatélites na videira (VMC, *Vitis* Microsatellite Consortium, coordenado pelo AGROGENE, Moissy Cremayel, França) (WELTER et al., 2007). Assim, também na França foram desenvolvidos 169 novos marcadores microssatélites (VVI), representando um novo e informativo conjunto de marcadores para estudos genéticos na videira (MERCINOGLU et al., 2005). Na Itália Di Gaspero et al. (2005) desenvolveram 118 microssatélites (UDV) em *V. vinifera*.

Na videira, uma das maiores aplicações dos marcadores microssatélites é a identificação e discriminação de variedades, a fim de facilitar a gestão das coleções e controlar o comércio de material vegetal com uma correta identificação de variedades (SEFC et al., 2000; THIS et al., 2004). Por exemplo, os microssatélites atualmente têm sido utilizados com sucesso na identificação de variedades na Itália

(VIGNANI et al., 1996), na Espanha (CARCAMO et al., 2010), na Argentina (MARTÍNEZ et al., 2006) e no Brasil (SCHUCK et al., 2010; LEÃO et al., 2011).

Estes marcadores têm sido também amplamente utilizados no mapeamento genético da videira, o que têm contribuído na identificação de várias regiões genômicas com efeitos importantes em relação à resistência genética ao míldio e oídio da videira (BARKER et al. 2005; WIEDEMANN-MERDINOGLU et al., 2006; WELTER et al., 2007; BELLIN et al., 2009; SCHWANDER et al., 2012; VENUTI et al., 2013).

Na maioria das espécies vegetais, os mapas de ligação genéticos são obtidos a partir de populações segregantes derivados de cruzamentos entre linhas puras homozigotas. Entretanto, a condição heterozigota da videira requer a utilização de populações F1 aliando-se a estratégia de pseudo- retrocruzamento baseada na construção de mapas genéticos de ambos parentais, integrados em um mapa consenso utilizando marcadores codominantes em alelos que segregam em ambos parentais (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF,1994).

O primeiro mapa genético da videira de referência baseado apenas em marcadores moleculares codominantes microssatélites foi desenvolvido por Riaz et al. (2004), com a utilização de uma população de mapeamento com 153 indivíduos, resultantes do cruzamento de “Riesling” (*Vitis vinifera*) x “Cabernet Sauvignon” (*Vitis vinifera*). Doligez et al. (2006) obtiveram um mapa genético da videira utilizando como base cinco diferentes populações de mapeamento, o qual foi composto por 502 marcadores SSR e outros 13 marcadores de DNA baseados em PCR, cobrindo uma distância de 1.647 cM em 19 grupos de ligação, e com uma distância média entre marcadores de 3,3 cM.

Uma das principais aplicações dos mapas de ligação genéticos é o mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) ou loci, que controlam a expressão de características quantitativas, como a resistência a doenças, apirenia e tamanho das bagas, visando o desenvolvimento de novas variedades que incorporem os alelos de QTLs de importância agrônômica. O foco principal dos estudos de identificação de QTLs na videira são a resistência a doenças como míldio (*P. viticola*), oídio (*U. necator*), nematoide (*Xiphinema index*) e a bactéria *Xyllela fastidiosa* (mal de Pierce), além de aspectos como qualidade da uva, tamanho de bagas e sabor moscatel (LEÃO; BORGES, 2009).

3.10 Mapeamento de QTLs

Muitas características agronomicamente importantes, como produtividade, qualidade e algumas formas de resistência a doenças são controladas por muitos genes e são conhecidos como caracteres quantitativos (ou também características poligênicas, multifatoriais ou complexas). As regiões genômicas que contêm os alelos associados a uma característica quantitativa em particular, são conhecidas como locos de características quantitativas (QTL – quantitative trait loci) (COLLARD et al., 2005).

3.10.1 Origem da resistência

Em *V. rotundifolia*, a resistência genética ao oídio da videira é controlada por um único gene dominante *Run1* presente na espécie silvestre, mas ausente em *V. vinifera* (BARKER et al., 2005). Segundo Pauquet et al. (2001) este alelo foi introduzido em *V. vinifera*, utilizando a estratégia do pseudo-retrocruzamento. Na procura por marcadores moleculares ligados ao *Run1*, foi realizado o mapeamento genético da população Mtp3294 (VRH3082-1-42 × Cabernet Sauvignon). Nesta população de 157 indivíduos do quinto ciclo de retrocruzamento, identificaram-se 13 marcadores ligados ao gene de resistência *Run1*, confirmando a informação na análise fenotípica, onde foram encontrados ausentes em todos os genótipos suscetíveis e presentes em todos os indivíduos resistentes.

Assim também, Barker et al. (2005) utilizaram três populações no estudo de mapeamento: Mtp3294 (VRH3082-1-42 x *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon; 161 indivíduos), Mtp3322 (VRH3176-21-11 x *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon; 419 indivíduos) e Mtp3328 (*V. vinifera* cv. Marselan x VRH3082-1-49; 416 indivíduos), e localizaram o loco *Run1* entre os marcadores microssatélites VMC4f3.1 e VMC8g9 e, como tal, está localizado numa região equivalente ao cromossomo 12. O alelo *Rpv1* que confere resistência ao míldio está localizado no cromossomo 12 de *M. rotundifolia* e está geneticamente associado ao *Run1* (BARKER et al., 2005; WIEDEMANN-MERDINOGLU et al., 2006). O alelo *Rpv2* por sua vez, também originado de *M. rotundifolia* está localizado no cromossomo 18 (MERDINOGLU et al., 2003; PERESSOTTI et al., 2010).

O mapeamento da população F₁ (144 plantas), proveniente do cruzamento das variedades de *V. Vinifera* ‘Regent’, a qual apresenta vários componentes de resistência a doenças fúngicas herdados como características poligênicas x ‘Lemberger’, que é uma variedade tradicional suscetível às doenças (FISHER et al., 2004; WELTER et al.,

2007), permitiu a identificação de vários QTLs de resistência contra o *E. necator* e *P. viticola*. O loco *Ren3*, que confere resistência ao oídio, foi detectado no cromossomo 15. O loco de resistência apresentou efeitos significativos nas avaliações de resistência nas folhas e nas bagas, explicando 56,8% e 64,5% da variação fenotípica, respectivamente (WELTER et al., 2007). Na mesma população, foram identificados vários QTLs para resistência ao míldio. O principal QTL foi o loco *Rpv3*, localizado no cromossomo 18, mostrando efeitos significativos em todos os anos avaliados, tanto na folha, quanto na baga (WELTER et al., 2007; BELLIN et al., 2009; CASAGRANDE et al., 2011; Di GASPERO et al., 2012).

Trabalhos de Bellin et al. (2009) com inoculação de discos foliares em dois isolados de míldio coletados em vinhedos italianos e franceses em plantas de uma população de 116 indivíduos proveniente do cruzamento entre ‘Chardonnay’ (susceptível ao míldio) x ‘Bianca’ (resistente ao míldio). No referido trabalho foram feitas classificações de resistência e identificações histológicas da fase de interação, quando o desenvolvimento do patógeno prejudicava os indivíduos resistentes. Os autores encontraram que o parental ‘Bianca’ e 59% da sua descendência foram heterozigotas para um gene dominante, localizado a 2,9 cM do *Rpv3*, localizado no cromossomo 18. O gene é responsável pelo aparecimento de uma resposta de hipersensibilidade (HR) aos sítios de infecção dentro de dois dias após a inoculação (dpi).

Segundo Casagrande et al. (2011), a incorporação de alelos favoráveis no material de melhoramento proporcionaria uma estrutura genética mais apropriada, em que os genes R dominantes podem ser transferidos, já que estes genes explicam uma porção significativa do fenótipo de resistência. O alelo *Rpv3* está associado com a capacidade de montar uma resposta localizada de hipersensibilidade (HR), a qual se manifesta após o início da infecção de *P. viticola*.

Posteriormente, outros locos de resistência contra o míldio da videira foram identificados: *Rpv8* e *Rpv12* localizados no cromossomo 14 e *Rpv10* localizado no cromossomo 9, todos provenientes de *V. amurensis*, uma espécie silvestre do “pool” genético de *Vitis* asiático (BLASI et al., 2011; SCHWANDER et al., 2012; VENUTI et al., 2013) e *Rpv14* localizado no cromossomo 5 e derivado de *V. cinerea* (OCHSSNER et al., 2016). Em outro estudo, Ramming et al. (2011), avaliando populações segregantes de resistência ao oídio do cruzamento entre *V. vinifera* × *V. romanetii* determinaram a presença de um único loco dominante, *Ren4*, conferindo resistência ao oídio da videira.

Desta forma este conjunto de estudos disponibilizaram marcadores moleculares ligados a locos de resistência a doenças, oportunizando o desenvolvimento de estratégias de seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), o que permite acelerar o processo de melhoramento genético da videira contra doenças (EIBACH et al., 2007).

3.10.2 Genes de grande efeito e de pequeno efeito

A disponibilidade de um número cada vez maior de marcadores moleculares vem permitindo a seleção de um maior número de genes de grande efeito (PATERSON et al., 1991; YOUNG 1999; DEKKERS e HOSPITAL 2002). Muitos programas de melhoramento genético de plantas de diferentes espécies, estão utilizando os marcadores moleculares como ferramentas de diagnóstico para pesquisar genes importantes de interesse (EAGLES et al., 2001, DUBCOVSKY 2004). Várias pesquisas têm por objetivo determinar os cruzamentos mais eficientes e a melhor estratégia de seleção quanto usam a piramidação de múltiplos genes de grande efeito em um mesmo genótipo (BONNETT et al., 2005, WANG et al., 2007).

Os melhoristas de plantas selecionam simultaneamente traços controlados por um ou por um pequeno número de genes, assim como para traços poligênicos controlados por múltiplos genes que podem ser detectados como loci de traços quantitativos (QTL) (WANG et al., 2009).

Os genes de grande efeito geralmente têm efeitos prontamente discerníveis sobre os traços fenotípicos e sua herança pode ser estudada por genética mendeliana (FALCONER e MACKAY ,1996). Em contraste, o efeito de um gene menor não é grande o suficiente para causar uma descontinuidade no fenótipo e não podem ser estudados individualmente na genética quantitativa clássica.

A definição de QTL varia na literatura. De acordo com Dekkers e Hospital (2002), QTL são loci genéticos ou regiões cromossômicas que contribuem para a variabilidade em termos de traços quantitativos. Nesse sentido, um QTL pode ser tanto um gene de grande efeito como de pequeno efeito. Se os QTL forem definidos como identificáveis através da análise estatística de traços complexos em vez da genética mendeliana (BARTON e KEIGHTLEY, 2002), o QTL pode ser apenas de genes de pequeno efeito.

3.11 Seleção assistida por marcadores moleculares

A seleção assistida por marcadores (SAM) é uma forma de seleção indireta, na qual o caráter indireto apresenta herdabilidade igual a 100%, uma vez que marcadores moleculares não são influenciados pelo ambiente (BERED, 1997). Assim, a seleção indireta tem potencial para aumentar a eficiência de seleção por permitir avaliação e seleção antecipada e por reduzir o tamanho da população de plantas usada durante a seleção. Para espécies perenes, é uma metodologia extremamente atraente, tendo em vista o tempo necessário para completar uma geração ou ciclo de melhoramento de tais espécies (OLIVEIRA et al., 2005).

Esta estratégia SAM envolve a presença ou ausência de um marcador ou alelo, como um substituto para auxiliar na seleção fenotípica de uma forma que pode torná-lo mais eficiente, eficaz, confiável e de baixo custo em comparação com a metodologia de melhoramento de plantas mais convencional (COLLARD et al., 2005). Ela oferece vantagens únicas na escolha correta de genótipos elites, a fim de melhorar as características para as quais são de baixa herdabilidade ou existem limitações das tecnologias de fenotipagem (DI GASPERO e CATTONARO, 2010). A SAM é especialmente útil quando o gene alvo é verdadeiramente único e há poucas alternativas para obter fenótipos desejados, tais como no caso da resistência a doença monogênica (GILL-LANGARICA e MAYEK-PÉREZ, 2008). Envolve a seleção indireta de características através da seleção do marcador ligado ao gene de interesse (JOSHI e NAYAK, 2010).

As vantagens da SAM são (i) economia de tempo em comparação com ensaios de campo complexos (que precisa ser realizado em determinadas épocas do ano ou em locais específicos, ou de trabalho intensivo); (ii) eliminação da avaliação fenotípica confiável associada com o campo devido aos efeitos ambientais; (iii) a seleção de genótipos em fase de plântula; iv) piramidação de genes ou combinação de múltiplos genes simultaneamente, evitando a transferência de genes indesejáveis ou prejudiciais; v) seleção para características de baixa herdabilidade e testes para características específicas, cujas medições fenotípicas não são viáveis (WU e WANG, 2011).

Para os melhoristas de plantas, a aplicação mais útil da SAM é a utilização de marcadores baseados em DNA tendo basicamente três finalidades: rastrear do alelo favorável (dominante ou recessivo) ao longo de gerações a fim de acumular alelos favoráveis; identificar os indivíduos mais adequadas entre progênies segregantes, com base na

composição alélica de uma parte ou de todo o genoma e quebrar a possível ligação de alelos favoráveis com locos indesejáveis (Francia et al., 2005).

A aplicação da SAM para a resistência a doenças conduz a uma pirâmide de genes de resistência, e a comparação dos dados fenotípicos com os resultados das análises de marcadores moleculares mostraram uma clara correlação entre o grau de resistência e a presença de alelos de resistência relacionados (Eibach et al., 2007).

As melhores oportunidades de sucesso da SAM estão no melhoramento para resistência às doenças, onde a piramidação de genes é desejável na mesma variedade com menos ciclos de seleção (JOSHI e NAYAK, 2010; WU e WANG, 2011).

3.12 Piramidação de genes de resistência

A eficácia dos genes de resistência a doenças em plantas diminui ao longo do tempo devido à seleção dos genótipos de patógenos virulentos. Um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético de plantas é usar estratégias diferentes para conferir a durabilidade da resistência por estes genes (REX CONSORTIUM, 2016).

No melhoramento para resistência a doenças, o acúmulo de genes para construir-se uma pirâmide genética é sugerido como uma estratégia que permite resistência duradoura (NELSON, 1978; KELLY et al. 1994; ALZATE-MARIN et al., 2005; VU et al., 2014; REX CONSORTIUM, 2016), cujo processo é longo e dispendioso, semelhante ao desenvolvimento de uma variedade (PEDERSEN e LEATH, 1988). Os métodos de melhoramento para piramidar genes de resistência compreendem geralmente cruzamentos, retrocruzamentos e cruzamentos testes destinados a verificar a presença de uma combinação desejada destes genes na descendência resultante (KELLY et al., 1994).

As seguintes etapas são fundamentais no desenvolvimento de um programa de piramidação de genes de resistência auxiliado por marcadores moleculares: (1) seleção de genitores contrastantes para genes de resistência às doenças de interesse e identificação das raças do patógeno de maior importância para a região para a qual se destinam as novas variedades; (2) estudos de herança da resistência às raças selecionadas a partir de cruzamentos entre as fontes de resistência e a variedade suscetível de interesse, (3) identificação de marcadores moleculares ligados aos diferentes alelos de resistência (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Se vários genes estão sendo incorporados e todos eles conferem resistência completa ao mesmo patógeno, a presença de um fator de resistência mascara o efeito fenotípico dos demais (MILACH e CRUZ, 1997). Assim, este processo torna-se mais eficiente pelo uso de marcadores moleculares estreitamente ligados aos genes de resistência, selecionando assim indiretamente e na ausência do agente patogênico, a presença desses genes responsáveis pela resistência (KELLY et al., 1994). É importante notar que a utilização de marcadores moleculares é uma ferramenta que ajuda a acelerar o processo da piramidação de genes, mas não substitui as técnicas convencionais de melhoramento, sendo necessário continuar explorando a complementaridade entre melhoramento clássico e o assistido com ferramentas biotecnológicas (GARZÓN et al., 2007).

O desenvolvimento de variedades com múltiplos genes de resistência pode reduzir a probabilidade de mutação simultânea do patógeno. No entanto, é difícil realizar a piramidação de genes utilizando abordagens de melhoramento convencional, devido aos efeitos epistáticos dos genes que regulam a resistência. Entretanto, a disponibilidade de marcadores moleculares para diferentes genes de resistência permite a identificação de plantas que transportam os diferentes genes (KELLY et al., 1994; CARANTA et al., 1999; TAR'NA et al., 2003). O uso dos marcadores moleculares, portanto, torna-se verdadeira ferramenta no monitoramento da introgressão da resistência em variedades de interesse, tornando disponível não somente a piramidação de genes, como também auxiliando no melhor entendimento dos mecanismos genéticos presentes nas fontes de resistência (FERREIRA et al., 1999).

Com o aumento da aplicação de marcadores baseados em PCR, a seleção assistida por marcadores moleculares, sem dúvida se tornou uma ferramenta mais viável no melhoramento de plantas (FRANCIA et al., 2005; JOSHI e NAYAK, 2010; WU e WANG, 2011), sendo usado como uma estratégia na piramidação de genes em várias culturas.

Na Colômbia, Tapiero et al. (2003) visando a resistência genética a *Pyricularia grisea* Sacc em arroz, utilizaram os genes *Pi-1* e *Pi-2*, obtendo linhas com genes piramidados mediante cruzamentos de duas linhas isogênicas. A presença e a condição homocigota dos genes de resistência nas novas linhas foram estabelecidas através de marcadores moleculares. O comportamento das pirâmides foi avaliado em câmaras de crescimento, com isolados representativos da doença e também a campo, numa região dedicada tradicionalmente a produção de arroz onde as epidemias da brusone eram frequentes. Tanto nas inoculações

artificiais, como nas áreas de cultivo, as pirâmides conservaram a resistência ao patógeno. Contra esta mesma doença, foram piramidados os genes *Pi-1*, *Piz-5* e *Pita* por Hittalmani et al. (2000). Os autores verificaram que as plantas que transportavam as combinações de dois ou três genes, foram testadas quanto à resistência à brusone nas Filipinas e Índia, resultando que combinações incluindo *Piz-5* apresentaram maior resistência do que quando somente o referido gene estava presente.

Em feijão, Kelly et al. (1994) conseguiram com sucesso a piramidação dos genes *Up-2*, *Ur-3*, e *B-190*, os quais conferem resistência à ferrugem. A identificação de marcadores moleculares ofereceu a oportunidade de piramidar os genes de resistência mais eficientes em genótipos específicos. Também, Kelly et al. (1995) piramidaram cinco genes de resistência (*I*, *be-u*, *be-1²*, *be-2²*, *be-3*) contra o vírus do mosaico comum do feijoeiro (BCMV). Também na cultura do feijão, Ragagnin et al. (2003) testaram a piramidação de genes de resistência contra a ferrugem, a antracnose e a mancha-angular no background “carioca” Rudá. Os autores determinaram o espectro de resistência de isolinhas a diferentes patótipos a fim de selecionar as linhagens mais similares aos progenitores doadores quanto à sua resistência. Comparando-se os espectros de resistência dos progenitores doadores e das isolinhas deles derivadas, os autores verificaram que as isolinhas TO-41-5-6-24, AB-74-1-18, ON-25-99 e AND-7-2-9-4-6 apresentaram essencialmente os mesmos genes de resistência presentes em seus progenitores.

Em soja, Shi et al. (2009) obtiveram a piramidação de três locos de resistência (*Rsv1*, *Rsv3*, e *Rsv4*) para o vírus do mosaico de soja (SMV). Os múltiplos genes desempenham um papel importante na prevenção de quebra da resistência genética, devido à ocorrência de novas cepas virulentas. Também, Maphosa et al. (2012), mediante a utilização de seleção assistida por marcadores obtiveram a piramidação em homozigose dos genes *Rpp2* e *Rpp3* o que aumentou claramente a resistência contra a ferrugem-asiática, com as das duas combinações de genes.

Em milho, visando a piramidação de genes de resistência para Helmintosporiose comum (*Exserohilum turcicum*) e Carvão do pendão (*Sphacelotheca reiliana*) Min et al. (2012) encontraram que as linhas que transportam os genes de resistência *HT1*, *HT2* e QTL para *S. reiliana*, apresentaram alto nível de resistência e rendimento, sugerindo que a estratégia de seleção assistida pode ser usado efetivamente para selecionar o nível de alto rendimento e resistência nos materiais de reprodução em milho.

Em trigo, três combinações de genes de resistência (*Pm2 + Pm4a*; *Pm2 + Pm21*; *Pm4a + Pm21*) contra oídio foram integrados com sucesso na variedade elite 'Yang158', ilustrando as perspectivas para a utilização de marcadores moleculares no melhoramento para resistência da doença (LIU et al., 2000). No trigo de inverno acredita-se que as resistências à ferrugem do caule e ao oídio foram alcançadas pela combinação de múltiplos genes de resistência menores (Singh ., 2011; Ellis et al, 2014; Brown, 2015).

Outros estudos da piramidação de genes para várias características agronômicas em diversas culturas são relatados: em centeio (TWARDOWSKA et al., 2005), em tomate (SACCO et al., 2013) e em pepino (ROBBINS et al., 2008).

Estudos de piramidação de genes de resistência *Gb2*, *Gb3* e *Gb6* para o pulgão-verde (*Homoptera: Aphididae*) em trigo, avaliando diferentes biótipos de pulgões nas reações das plantas piramidadas com os genes *Gb2/Gb3*, *Gb2/Gb6* e *Gb3/Gb6*. Ao ser comparadas com as plantas carregando os genes de resistência individuais, a piramidação não forneceu proteção adicional sobre aquele conferido pelos genes de resistência individuais (PORTER et al., 2000).

Assim também, Zhang et al. (2010) mediante métodos de melhoramento convencional combinado com SAM, identificaram dezessete linhas homocigotas carregando os genes *o2* e *o16* combinados, relacionados com a alta produção de lisina em milho. Por sua parte, Yang et al. (2013) piramidaram os genes *waxy* (*wx*) associado com maior teor de amilopectina no endosperma e melhor sabor e o gene *opaque-16* (*o16*), relacionado com maior teor de lisina no endosperma e melhor valor nutricional, com o que, obtiveram resultados significativos na melhoria da qualidade do milho.

Nas últimas duas décadas vários pesquisadores de todo o mundo concentraram seus estudos no mapeamento genético de QTLs que conferem resistência às doenças de videira empregando diferentes fontes de resistência. Os QTLs que conferem resistência a *P. viticola* foram identificados e designados como *Rpv* (Resistência a *P. viticola*). Exemplos destes são *Rpv1* e *Rpv2* derivados de *M. rotundifolia* e localizados nos cromossomos 12 e 18, respectivamente (MERCINOGLU et al., 2003; PERESSOTTI et al., 2010); *Rpv3* mapeado em 'Regent' e 'Bianca', provavelmente herdado de *V. rupestris* e mapeado no cromossomo de referência 18 (WELTER et al., 2007, BELLIN et al., 2009, Casagrande et al., 2011, DI GASPERO et al., 2012); *Rpv 8* e *Rpv 12* localizados no cromossoma 14 e *Rpv 10* localizados no cromossomo 9, herdados de *V. amurensis* (BLASI et al.,

2011; SCHWANDER et al., 2012; VENUTI et al., 2013) e *Rpv 14* localizados no cromossomo 5 e derivados de *V. cinerea* (OCHSSNER et al., 2016).

A partir da descoberta das fontes de resistência ao míldio e a outros patógenos que comprometem a cultura da videira, aliado às vantagens do uso da seleção assistida com marcadores moleculares (MAS), os pesquisadores empreenderam esforços para combinar as características de resistência das espécies selvagens de *Vitis* com a qualidade de cultivares de *V. vinifera* já existentes, e assim novas variedades de videiras com alta qualidade e resistência considerável ao míldio e a outros patógenos foram desenvolvidas.

Um exemplo para tal combinação de piramidação de diferentes loci de resistência pela aplicação de MAS foi recentemente descrito por Eibach et al. (2007), e nas últimas décadas resultaram em novas cultivares como 'Solaris' com a espécie *V. amurensis* em sua filiação. A variedade 'Solaris' confere resistência ao míldio acompanhado de necrose (BOSO E KASSEMAYER, 2008), deposição calosa (GINDRO et al. 2003) e acumulação de estilbeno (GINDRO et al., 2006, 2012; PEZET et al., 2004) como mecanismos de defesa ativos. Outras variedades contendo QTL's de resistência também foram desenvolvidas, como Regent (FISCHER et al., 2004; AKKURT et al., 2007; EIBACH et al., 2007); Bianca (CSIZMAZIA e BEREZNAi, 1968) e outros.

Outros experimentos em videira foram e continuam sendo desenvolvidos para compreender os mecanismos de defesa das plantas e a relação planta-patógeno e suas implicações no desenvolvimento de novas variedades resistentes e também de patógenos resistentes (POLESANI et al., 2008, 2010; YU et al., 2012; LENZI et al., 2016; NASCIMENTO-GAVIOLI et al., 2017).

Vários experimentos demonstraram que, em média, a resistência geneticamente quantitativa é mais durável (PARLEVLIET, 1989, REX CONSORTIUM, 2016), provavelmente porque a resistência quantitativa é poligênica enquanto a resistência qualitativa é dependente de um único grande gene de resistência (MUNDT, 2014).

Ainda atualmente, uma das principais restrições à piramidação de genes para o uso em grandes empresas de sementes é o tempo necessário para se obter uma variedade comercializável que seja bem sucedida. No entanto, novas técnicas como a seleção assistida por marcadores, a transformação genética, tecnologias de sequenciamento e edição genômica, continuam abrindo novas possibilidades para os pesquisadores (GUPTA et al., 2010); LUSSER et al., 2012; MICHELMORE et al., 2013; WANG et al., 2014). No Futuro, as

técnicas biotecnológicas permitirão criar organismos e variedades geneticamente modificados com alelos de resistência aos quais os patógenos nunca foram expostos (MCDONALD, 2014; WULFF e MOSCOU, 2016).

No entanto, os pesquisadores ainda enfrentam várias outras dificuldades (BURDON et al., 2014), incluindo genes que mascaram a expressão de resistência conferida por outro gene, as interações “genótipo x ambiente” que afetam a expressão da resistência e a fenótipos e custos fisiológicos associados à resistência de genes que podem prejudicar o desempenho agrônômico (REX Consortium, 2016).

CAPÍTULO I. The effect of pyramiding the resistance loci *Rpv1* and *Rpv3* on the progress of downy mildew in grapevine

Abstract - The main aim of the present investigation was to evaluate the effects of resistance loci *Rpv1* and *Rpv3* (individually and pyramided) on the disease progress of *Plasmopara viticola* during the whole vegetative and reproductive cycle. Plants of the population UFSC-2012-1 were selected and divided into four resistance groups: 1) No resistance loci; 2) Only *Rpv1*; 3) Only *Rpv3* and 4) *Rpv1* + *Rpv3*. The disease severity was monitored during the seasons 2014/2015 and 2015/2016. Downy mildew disease progress curves were constructed and the epidemics of each resistance group was compared using four epidemiological measures: beginning of symptom appearance (BSA), time to reach maximum disease severity (TRMDS), maximum disease severity (Smax) and area under the disease progress curve (AUDPC). The groups containing only one of the resistance loci revealed only partial resistance to *P. viticola*; however, when the loci were pyramided, the control of the disease progress was complete.

Index terms: pathogen resistance, resistance gene analogs, obligate plant pathogen, *Plasmopara viticola*, *Vitis vinifera*.

Introduction

The viticulture in Brazil is expanding and, in the last decades, it has been standing out due to the grapevine cultivation in new regions. These locations have been developing local identities through their diversity regarding different environmental conditions, crop systems and genetic resources with wide variability (Camargo et al., 2011).

The environmental factors present strong relation with the grapevine phenology (Jones et al., 2010; Bock et al., 2011; Chevet et al., 2011), listed among these factors: the temperature and humidity of the air, rainfall index and solar radiation (Fiorillo et al., 2012).

The state of Santa Catarina ranks second in the production of grapes that are destined to fine wines. And yet, it's a new practice in the region; especially on high altitude areas – from 900 meters above sea level – located in the Santa Catarina highlands and in the city Água Doce. Many authors have already proven the potential for production of fine grapes in these areas, with high viticultural and enological quality; this is possible due to the climate characteristics of the region. The

cooler air temperatures provide a slow and complete grape ripening, with a reproductive cycle longer than that in other grape growing regions of Brazil, contributing to a better wine quality (Gris et al., 2010, Falcão et al., 2010; Borghazan et al., 2011, Burin et al., 2011; Malinovski et al., 2012, 2016; Brighenti et al., 2014). Nonetheless, just as in other wine-growing zones in the world, the grapevine varieties are subject to diseases. In Southern Brazil, due to high rainfall, one of the most challenging diseases is the downy mildew.

The grapevine downy mildew, which is caused by the oomycete *Plasmopara viticola* (Berk & Curt.) Berl. & de Toni, is one of the most important fungal diseases of grapevine worldwide—particularly in warm and humid climates (Boso et al., 2008). *P. viticola* belongs to the family Peronosporaceae; its life cycle includes an asexual multiplication phase occurring during the plant vegetative period and a sexual phase that ensures pathogen overwinter survival (Wong et al., 2001). The pathogen overwinters as oospores in dead leaf lesions or as mycelium in infected twigs. In spring, and particularly during rainy periods, oospores germinate to produce sporangia, which are transported by wind or water to the wet leaves near the ground, which they infect through stomata on the lower surface. The mycelium then spreads into the intercellular spaces of the leaf from which sporangiophores arise and emerge through the stoma, ready to start new infection cycles (Gobbin et al., 2005).

P. viticola infests all green parts of the plants, but is especially destructive on leaves, flowers, inflorescences and berries (Pavlousek et al., 2012). The disease cycle may take from five to 18 days, depending on the temperature, humidity and varietal susceptibility (Agrios et al., 2005; Gessler et al., 2011). When the weather is favorable and no protection against the disease is provided, downy mildew can easily destroy up to 75% of production in a single season (Madden et al., 2000; Rossi & Caffi, 2012). The photosynthetic capacity of infected plants is reduced, inflorescences and berries necrotized, altogether resulting in decreased yields and deteriorated quality of berries (Liu et al., 2008). This disease is responsible for the greatest damages to the viticulture in the world – including Southern Brazil – with devastating effects to its production, causing substantial loss when control measures are not adopted (Czermainski & Sônego, 2004; Hamada et al., 2008; Peruch & Della-Bruna, 2008).

In Brazil the massive use of pesticides is necessary to contain the downy mildew, resulting in the increase of the production cost and energy input needed for properly growing the grapevine. In addition, it poses a series of risks to the human health and environment,

compromising the sustainability of the production system (Czermainski & Sonego, 2004).

In this scenario, the development of new grapevine varieties, which combine adaptation to the local cultivation conditions, resistance to the main diseases and high enological potential, becomes essential in the search for a more sustainable cultivation system.

In the last two decades, several researchers worldwide have focused their studies on the genetic mapping of Quait Trait Loci (QTLs) that confer resistance to grapevine diseases employing different resistance sources. QTLs conferring resistance to *P. viticola* have been identified and named as *Rpv* (Resistance to *P. viticola*). Examples of these are *Rpv1* and *Rpv2* derived from *M. rotundifolia* and located on chromosomes 12 and 18, respectively (Merdinoglu et al., 2003; Peressotti et al., 2010); *Rpv3* mapped on 'Regent' and 'Bianca', probably inherited from a *V. rupestris* background and mapped on the reference chromosome 18 (Welter et al., 2007; Bellin et al., 2009; Casagrande et al., 2011; Di Gaspero et al., 2012); *Rpv8* and *Rpv12* located on chromosome 14 and *Rpv10* located on chromosome 9, inherited from *V. amurensis* (Blasi et al., 2011; Schwander et al., 2012; Venuti et al., 2013) and *Rpv14* located on chromosome 5 and derived from *V. cinerea* (Ochssner et al., 2016).

One of the main objectives in the resistance plant breeding is to improve the durability of the resistance. The most usual strategy adopted by the breeders to improve durability, is the pyramiding of resistance genes, which is nothing more than the incorporation of several resistance genes into a single plant (Rex Consortium, 2016). The greatest possible number of genes is introduced into a plant in order to make it more difficult for the pathogen to break resistance (Eibach et al., 2007); currently, pyramiding is considered the most durable strategy available (Vu et al., 2014). However, the use of molecular markers is normally required to assist gene pyramiding, because with the sole analysis of phenotypic data, it's difficult to track resistance genes accumulation, and the markers assisted selection (MAS) also increases the efficiency of selection and reduces the time for launching new varieties of grapevines (Dalbó et al. , 2001, Fischer et al., 2004; Eibach et al., 2008).

The *Rpv1* locus was one of the first grapevine resistance genes to be cloned and functionally characterized. It was designated *MrRPVI* and confers strong resistance to *P. viticola* with a broad isolate specificity described by the severe restriction of hyphal growth and sporangiophore development. *MrRPVI* produces four alternatively spliced variants,

encoding only one full-length functional TIR-NBS-LRR protein (Feechan et al., 2013). The *Rpv3*⁺ haplotype is associated with the ability of mounting a localized hypersensitive response (HR), which becomes apparent soon after the beginning of the infection (Casagrande et al., 2011). The *Rpv3*⁺-dependent response is correlated with a significant limitation of mycelial growth in the spongy mesophyll and a reduction of the number of sporangiophores disseminated by the pathogen during the subsequent phase of vegetative reproduction (Bellin et al., 2009; Degle`ne-Benbrahim et al., 2010). *Rpv1* and *Rpv3* individually confer partial resistance to *P. viticola*, but when pyramided, the resistance is total (Eibach et al. 2007). The same results were identified in Brazil (Saifert et al. in preparation).

Although the level of resistance conferred by *Rpv1* and *Rpv3* is described in the literature, neither investigation focused on the resistance conferred by these loci in field condition, during the whole season. The main aim of the present investigation was to evaluate the effects of *Rpv1* and *Rpv3* (individually and pyramided) on the disease progress of *D. mildew* during the whole vegetative and reproductive cycle in the Southern Brazilian environmental conditions.

Material and methods

The plant materials were selected from the breeding population UFSC-2012-1; the population was obtained from the '2000-305-122' e 'Gf.Ga-52-42', which segregates for the resistance loci *Rpv1* and *Rpv3*. The parental '2000-305-12' is resultant of the cross between 'VHR-3082-1-42' and 'Regent', and has the locus *Rpv1* (WIEDEMANN-MERDINOGLU et al., 2006); whereas parental 'Gf. Ga-52-42' (SCHWANDER et al., 2012) is the result of the crossing between 'Bacchus' and 'Villard Blanc', and carries the locus *Rpv3*. All plants of the population were genotyped with four microsatellite markers flanking the two resistance loci (Saifert et al., in preparation), allowing the precise detection of absence or presence of resistance loci.

For the present investigation, the plants of the population UFSC-2012-1 were selected and divided into four resistance groups: 1) No resistance loci; 2) Only *Rpv1*; 3) Only *Rpv3* and 4) *Rpv1* + *Rpv3*. The experiment was completely randomized with five replications of each resistance group; each replication consisted of a single plant. The vineyard was implanted in Curitiba, state of Santa Catarina, at the Federal University of Santa Catarina, Campus of Curitiba (27°17'05" S; 50°32'05.12" O, altitude 1050 m). At the beginning of the evaluation the vineyard was 4 years old and the plants were grafted on

‘Paulsen 1103’ rootstock, trained in espalier, spaced 2.5 meters between rows and 1.0 meter between plants. The pruning in Guyot was performed leaving around 10 buds per spur.

Fungicide application to control the downy mildew was not used to allow infection of by the pathogen and disease propagation as well as the expression or not of the differences in resistance conferred by the resistance loci.

The disease severity was evaluated and quantified during the seasons 2014/2015 and 2015/2016; the assessments on the entire plant began with the appearing of the first symptoms. From this time on, the plants were evaluated three times a week until March. Downy mildew severity was assigned using the visual diagrammatic scale OIV-452, based on five grades of disease severity: 1, 3, 5, 7 and 9 (OIV, 2009), where “9” is considered highly susceptible and “1” resistant—no sporulation.

Downy mildew disease progress curves were constructed according to Campbell and Madden (1990) and the epidemics of each resistance group was compared using four epidemiological measures: beginning of symptom appearance (BSA), time to reach maximum disease severity (TRMDS), maximum disease severity (S_{max}) and area under the disease progress curve (AUDPC). AUDPC was calculated according to the Equation:

$$AUDPC = \sum \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2(t_{i+1} - t_i)} \right). \quad (1)$$

Where Y_i = the disease severity at the i th observation, t_i = time (days) at the i th observation, and n = the total number of observations (SHANNER and FINEY, 1977). The AUDPC was standardized by dividing the AUDPC value by the total duration of the epidemic in days (FRY, 1978), giving the relative area under the disease progress curve (RAUDPC) for each resistance group.

Data was analyzed using the repeated measures ANOVA. The ASSISTAT software, version 7.7 (Silva et al., 2016), was used for the data analysis.

The meteorological data was obtained from a meteorological station located in Curitibanos. The daily rainfall (mm), relative air humidity (%) and average temperature ($^{\circ}C$) were obtained from CIRAM (Center of Environmental Resources Information and Hydrometeorology of Santa Catarina) (Figure 1).

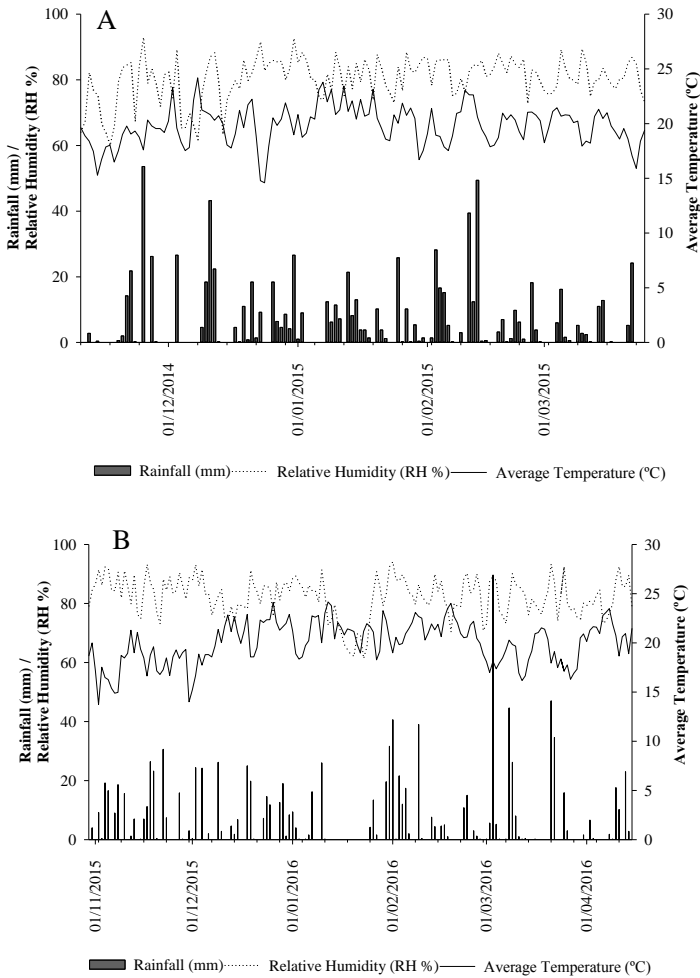


Figure 1. Precipitation (mm), air relative humidity (RH%) and mean temperature (°C) at Curitiba, Santa Catarina state, Brazil, during the period of evaluation of *P. viticola* disease progress in the growing seasons of 2014/2015 (a) and 2015/2016 (b).

Results and discussion

The accumulated precipitation from 01/11/2014 to 01/04/2015 and from 01/11/2015 to 01/04/2016 was of 1.052 and 1.180 mm,

respectively (Figure 1). The number of days during the period with precipitation higher than 10 mm was of 37 in 2014-15 and 41 in 2015-16 (Figure 1). The mean temperature during the same period was 19.2 °C in 2014-15, and 19.7°C in 2015-16; ranging from 12.8 to 24.2 °C and 4.9 to 24.2 °C, respectively.

The occurrence of mildew depends on the presence of moisture in the aerial part of the vine and adequate temperature. The more frequent and prolonged the periods of wetting of the plants green tissues, the more severe the epidemics are (Genta et al., 2010). The optimal growth of *P. viticola* is at temperatures between 20°C and 25°C, and humidity of 95% (Garrido & Sônego, 2002). Both cycles offered the environmental conditions required for the infection and propagation of *P. viticola*.

In the cycle 2014/15 the first symptoms of *P. viticola* were observed in one plant of the susceptible group (no resistance loci) on 17/11/2014—the evaluations began. The BSA for susceptible genotypes, *Rpv1*, *Rpv3* and *Rpv1+Rpv3* groups, were 1.6, 6.2, 6.6 and 47.8 days after the appearance of the first symptom (DAFS), respectively (Table 1). In cycle 2015/16 the first symptoms of the disease were observed on 30/10/2015 also in one plant of the susceptible group. The mean BSA was of 6.8, 35.8, 46.2 and 78.8 days for susceptible genotypes, *Rpv1*, *Rpv3* and *Rpv1+Rpv3* groups, respectively (Table 1). In both cycles the pyramiding of the *Rpv1* and *Rpv3* significantly retarded the appearance of the first symptoms. For the three classes possessing resistance loci, although symptoms were visible, very low or no sporulation was observed at that time. The symptoms were the results of the defense response of the host against the pathogen.

The Smax had significant differences between the groups in both years (Table 1). In the cycle 2014/15 the susceptible genotype reached the highest score (9) and reached 17.6 TRMDS (Table 1). The Smax for *Rpv1+Rpv3* group was only 3 and the TRMDS was significantly longer (47.8 days) (Table 1). The *Rpv1* and *Rpv3* groups showed intermediate values of Smax and TRMDS (Table 1). In the cycle 2014/15, significant differences were found for Smax, as in the previous year (Table 1). The highest value was observed on the susceptible genotype (9), followed by *Rpv1* (7), *Rpv3* (5) and *Rpv1+Rpv3* groups (3) (Table 1). The TRMDS did not vary significantly in this cycle.

In both cycles the AUDPC was significantly lower for the *Rpv1+Rpv3* group. As expected, the susceptible group revealed the highest AUDPC, while the *Rpv1* and *Rpv3* revealed intermediate areas (Table 1 and Figure 2).

Table 1. Beginning of symptom appearance (BSA), maximum value of severity (Smax), time to reach the maximum disease severity (TRMDS) and area under the disease severity progress curve (AUDPC) of grapevine downy mildew in genotypes containing different resistance loci, during the growing seasons 2014/15 and 2015/16 in Curitiba, state of Santa Catarina, Brazil.

Variable	Epidemic None		<i>Rpv1</i>		<i>Rpv3</i>		<i>Rpv1+Rpv3</i>		¹ C.V.(%)
Variable	loci								
2014-15									
BSA	1,6 [†]	b	6,2	b	6,6	b	47,8	a	25,84
Smax.	9	a	7,4	b	7	b	3	c	3,14
TRMDS	17,6	c	24	bc	37,2	ab	47,8	a	19,9
AUDPC	1082,2	a	858,2	b	784	b	299,6	c	3,68
2015-16									
BSA	6.8	c	35.8	b	46.2	b	78.8	a	36.48
Smax.	9	d	7	c	5	b	3	a	7.33
TRMDS	50.6	a	78.6	a	91.4	a	78.8	a	17,07
¹ AUDPC	933,8	a	574	b	371	c	229,6	d	7,69

[†]C.V. – Coefficient of variance. *Means followed by the same letter in the row are not significantly different (Tukey test, P<0.05). ¹Area calculated by trapezoidal integration value according to Fry (1978).

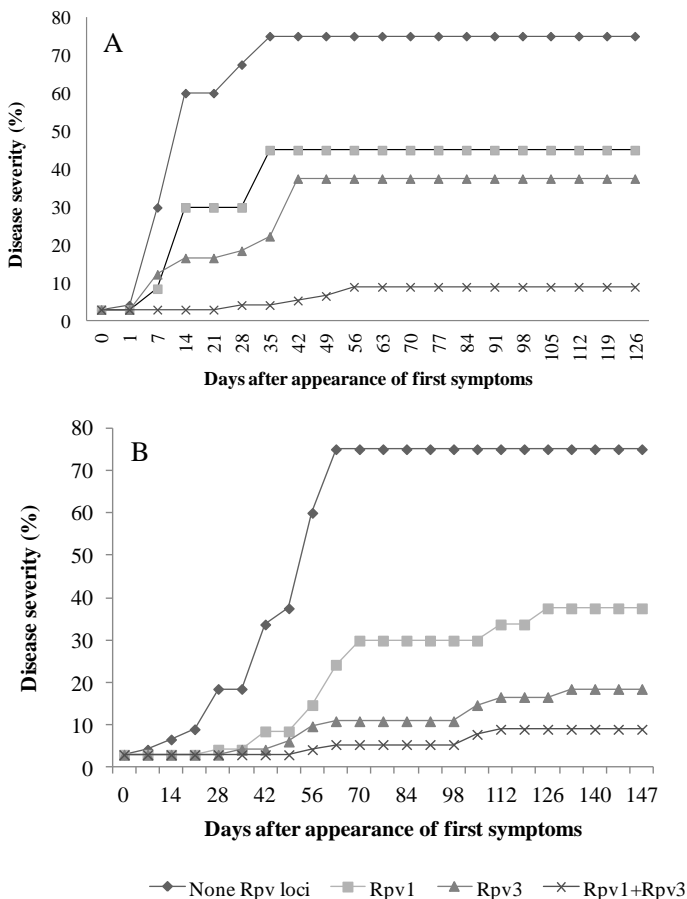


Figure 2. Downy mildew disease progress curves on plants without resistance loci (susceptible), only *Rpv1*, only *Rpv3* and *Rpv1+Rpv3*, during the growing seasons 2014/15 and 2015/16 in Curitiba, Santa Catarina state, Brazil.

Taking into consideration all the epidemic variables, it is evident that the pyramiding of the resistance loci *Rpv1* and *Rpv3* was very effective to control the progress of downy mildew during the whole cycle. The plants carrying the two pyramided loci retarded the appearance of the first symptoms, reduced strongly the maximum severity and reduced drastically the AUDPC; which represents

indirectly the leaf area attacked by the disease. When these loci are separated, the resistance conferred is intermediate, retarding the appearance of the first symptoms and reducing the S_{max} and the AUDPC, when compared to the susceptible plants.

The results obtained in the present work are in accordance with previous investigations performed with leaf disc assays. Eibach et al. (2007) and Saifert et al. (in preparation) observed that the plants, which contained only one of the resistance loci (*Rpv1* or *Rpv3*) exhibited medium resistance to the pathogen; however, when these loci were combined, the plants exhibited a high degree of resistance to the disease. Likewise, Venuti et al. (2013) found out that the combination of the resistance alleles *Rpv12* and *Rpv3* hampered the growing of *P. viticola* in comparison with the plants that carried only one of the alleles.

When evaluating the resistance of grapevine plants to downy mildew under field conditions, various types of microscopic symptoms may be observed, namely, hypersensitive reaction with the occurrence of necrosis. Some diffuse necrosis appeared on the intermediate resistant *V. rupestris*, but only necrotic spots were visible on the resistant *V. rotundifolia* (Dai et al., 1995).

Pavlousek et al. (2012) found in ‘Seyve Villard 12375’ the highest degree of resistance to downy mildew (8,75) the next ones were cultivars ‘Seibel 13666’ (7,50) and ‘Bianca’ (7,13). In all these cultivars the resistance was manifested as a hypersensitive response, either in the form of spot necrosis (‘Seyve Villard 12375’) or as small necrotic patches (‘Seibel 13666’ and ‘Bianca’).

The resistance to downy mildew can be manifested also as a hypersensitive reaction, as the necrotization of the leaf tissue. In grapevine plants, this hypersensitive reaction is associated with a low or zero sporulation and can be classified as small necrotic spots and/or small but better defined, localized necrotic lesions or spots (Liu et al., 2008). This observation was corroborated also in this study; as showed before, in the genotypes containing the pyramided *Rpv1+Rpv3* neither sporulation of the downy mildew, nor the appearance of necrosis was observed until the end of the cycle.

There are many studies that compared the benefits of pyramiding resistance genes with those of the deployment of a single resistance gene. They found that the pyramiding strategy was more durable than the use of a single resistance gene (Vu et al., 2014). In particular, it has been shown that the addition of quantitative resistances can greatly increase the durability of major resistance genes (Palloix et al., 2009; Brun et al., 2010; Delourme et al., 2014).

The incorporation of several resistance genes into the same plant (pyramiding) is the most durable strategy given the low probability of virulence emergence. This probability is low because it is the product of the probabilities of simultaneously breaking down each of the resistance genes (Rex Consortium, 2016).

Conclusion

Genotypes which contained only one of the resistance loci (*Rpv1* or *Rpv3*) exhibited medium resistance to the pathogen, however the pyramiding of the resistance loci *Rpv1* and *Rpv3* allowed high levels of resistance to downy mildew, and it became fundamental to control the progress of D. mildew disease under the environmental conditions of Southern Brazil.

Acknowledgements

The authors would like to sincerely thank the Coordination for Improvement of Personnel with Higher Education (*Capes*) for scholarships provided, and the Foundation for Research and Innovation Support of the State of Santa Catarina (FAPESC) for research funds.

References

- Camargo UA, Tonietto J, Hoffmann A (2011) Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura 33**: 144-149.
- Bellin D, Peressotti E, Merdinoglu D, Wiedemann-Merdinoglu S, Adam-Blondon AF, Cipriani G (2009) Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine ‘Bianca’ is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site, **Theoretical and Applied Genetics 120**: 163–176.
- Blasi P, Blanc S, Wiedemann-Merdinoglu S, Prado E, Ruhl EH, Mestre P (2011) Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of *Rpv8*, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. **Theoretical and Applied Genetics 123**: 43–53.
- Bock A, Sparks T, Estrella N, Menzel A (2011) Changes in the phenology and composition of wine from Franconia, Germany. **Climate Research 50**: 69-81.
- Boso S and Kassemeyer HH (2008) Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew. **Vitis 47**: 39–49.

Bolwell PP, Page A, Pislewska M, Wojtaszek P (2001) Pathogenic infection and the oxidative defenses in plants apoplast. **Protoplasma** **217**: 20–32.

Brun H, Che Ìvre AM, Fitt BDL, Powers S, Besnard AL, Ermel M (2010) Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphae riamaculans* in *Brassicnapus*. **New Phytologist** **185**: 285–299.

Burin VM, Silva AL, Malinovski LI, Rosier JP, Falcão LD, Bordignon-Luiz MT (2011) Characterization and multivariate classification of grapes and wines of two Cabernet Sauvignon clones. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **46**: 474–481.

Casagrande K, Falginella L, Castellarin SD, Testolin R, Di Gaspero G (2011) Defence responses in Rpv3-dependent resistance to grapevine downy mildew. **Planta** **234**: 1097–1109.

Chevet JM, Lecocq S, Visser M (2011) Climate, grapevine phenology, Production, and Prices: Pauillac (1800-2009). **American Economic Review** **101**: 3.

Czermainski ABC, Sônego OR (2004) Influência das condições climáticas sobre a eficácia de fungicidas empregados para o controle do míldio em *Vitis vinifera*. **Ciência Rural** **34**: 5-11.

Dai GH, Andary C, Mondolot-Cosson L, Boubals D (1995) Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **46**: 177–188.

Degle`ne-Benbrahim L, Wiedemann-Merdinoglu S, Merdinoglu D, Walter B (2010) Evaluation of downy mildew resistance in grapevine by leaf discs bioassay with in vitro- and greenhousegrown plants. **American Journal of Enology and Viticulture** **61**: 521–528.

Delourme R, Bousset L, Ermel M, Duffe P, Besnard AL, Marquer B (2014) Quantitative resistance affects the speed of frequency increase but not the diversity of the virulence alleles overcoming a major

resistance gene to *Leptosphaeria maculans* in oil seed rape. **Infection, Genetics and Evolution** 27: 490–499.

Di Gaspero G, Copetti D, Coleman C, Castellarin SD, Eibach R, Kozma P (2012) Selective sweep at the Rpv3 locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. **Theoretical and Applied Genetics** 124: 277–286.

Eibach R, Zyprian E, Welter L, Töpfer R (2007) The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. **Vitis** 46: 120-124.

Falcão LD, Burin VM, Chaves ES, Vieira HJ, Brighenti E, Rosier JP, Bordignon-Luiz MT (2010) 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** 44: 135-150.

Feechan A, Anderson C, Torregrosa L, Jermakow A, Mestre P, Wiedemann-Merdinoglu S (2013) Genetic dissection of a TIR-NB-LRR locus from the wild North American grapevine species *Muscadinia rotundifolia* identifies paralogous genes conferring resistance to major fungal and oomycete pathogens in cultivated grapevine. **The Plant Journal** 76: 661–674.

Fiorillo E, Crisci A, De Filippis T, Di Gennaro SF, Di Blasi S, Matese A, Primicerio J, Vaccari FP, Genesio L (2012) Airborne high-resolution images for grape classification: changes in correlation between technological and late maturity in a Sangiovese vineyard in Central Italy. **Australian Journal of Grape and Wine Research** 18: 80–90.

Fry WE (1978) Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide effects for integrated control of potato late blight. **Phytopathology** 68: 1650–1655.

Genta W, Tessmann DJ, Roberto SR, Batista Vida J, Colombo LA, Scapin CR, Ricce WS, Clovis LR (2010) Manejo de míldio no cultivo protegido de videira de mesa 'BRS Clara. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 45: 1388-1395.

Gris EF; Burin VM, Brighenti E, Vieira HJ, Bordignon-Luiz M (2010) Phenology and ripening of *Vitis vinifera* grape varieties in São Joaquim, Southern Brazil: a new South American wine growing region. **Ciência e Investigación Agraria** **37**: 61-75.

Hamada E, Ghini R, Rossi P, Junior MJP, Fernandes JL (2008) Climatic risk of grape downy mildew (*Plasmopara viticola*) for the state of São Paulo, Brazil. **Scientia Agricola** **65**: 60-64.

Jones G, Duff A, Hall AA, Myers JW (2010) Spatial analysis of climate in winegrape growing regions in the Western United States. **American Journal of Enology and Viticulture** **61**: 313-326.

Liu SM, Sykes ST, Clingeleffer PR (2008) Variation between and within grapevine families in reaction to leaf inoculation with downy mildew sporangia under controlled conditions. **Vitis** **47**: 55–63.

Malacarne G, Vrhovsek U, Zulini L, Cestaro A, Stefanini M, Mattivi F, Delledonne M, Veleasco R, Moser C (2011) Resistance to *Plasmopara viticola* in a grapevine segregating population is associated with stilbenoid accumulation and with specific host transcriptional responses. **BMC Plant Biology** **11**:114.

Malinovski LI, Brighenti AF, Borghezan M, Guerra MP, Silva AL, Porro D, Stefanini M, Vieira HJ (2016) Viticultural performance of Italian grapevines in high altitude regions of Santa Catarina state, Brazil. **Acta Horticulturae** **1115**: 203–210.

Merdinoglu D, Wiedeman-Merdinoglu S, Coste P, Dumas V, Haetty S, Butterlin G (2003) Genetic analysis of Downy Mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia* **Acta Horticulturae** **603**: 451-456

Nascimento-Gavioli MCA, Tenfen-Agapito SZ, Nodari RO, Welter LJ, Sanchez Mora FD, Saifert L, Silva AL, Guerra MP (2017) Proteome of *Plasmopara viticola*-infected *Vitis vinifera* provides insights into grapevine Rpv1/Rpv3 pyramided resistance to downy mildew. **Journal of Proteomics** **151**: 264–274.

OIV – Organization Internationale de la Vigne et du Vin. (2009) **Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis** (OIV, Paris, 504).

Palloix A, Ayme V, Moury B (2009) Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. **New Phytologist** **183**: 190–199.

Pavloušek P (2012) Evaluation of foliar resistance of grapevine genetic resources to downy mildew (*Plasmopara viticola*). Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis 8: 191–198.

Peressotti E, Wiedemann-Merdinoglu S, Delmotte F, Bellin D, Di Gaspero G, Testolin R (2010) Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. **BMC Plant Biology** 10:147.

Peruch LAM, Bruna ED (2008) Relação entre doses de calda bordalesa e de fosfito potássico na intensidade do míldio e na produtividade da videira cv. ‘Goethe’. **Ciência Rural** **38**: 2413-1418.

REX Consortium (2016) Combining Selective Pressures to Enhance the Durability of Disease Resistance Genes. **Frontiers in Plant Science** **7**:1916.

Shaner G and Finney RE (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology** **70**: 1183-1186.

Silva FAS, Azevedo ACV (2016) The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analyses experimental data. **African Journal of Agricultural Research** **11**: 3733-3740.

Schwander F, Eibach R, Fechter I, Hausmann L, Zyprian E, Topfer R (2012) Rpv10: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. **Theoretical and Applied Genetics** **124**: 163–176.

Venuti S, Copetti D, Foria S, Falginella L, Hoffmann S, Bellin D, Cindric P, Kozma P, Scalabrin S, Morgante M, Testolin R, Di Gaspero G (2013) Historical introgression of the downy mildew resistance gene Rpv12 from the asian species *Vitis amurensis* into grapevine varieties. **Plos one** **8** (4):e61228.

Vu Q, Quintana R, Fujita D, Bernal CC, Yasui H, Medina CD (2014) Responses and adaptation by *Nephotettix virescens* to monogenic and pyramided ricelines with Grh-resistance genes. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **150**: 179–190.

Welter LJ, Gokturk-Baydar N, Akkurt M, Eibach R, Töpfer R, Zyprian EM (2007) Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). **Molecular Breeding** **20**: 359–74.

**CAPÍTULO II. Molecular characterization and aggressiveness
examination of *Plasmopora viticola* isolates occurring in Trentino
Alto Adige, Italy**

Abstract - The overall aim of the present work was to evaluate the molecular differences between downy mildew isolates collected in Trentino Alto Adige region, Italy and to determine if there are different aggressiveness levels in diverse genotypes of *Vitis vinifera*. Forty one SSR markers were used in the genetic analysis of seven *Plasmopora viticola* isolates. Twelve host varieties/genotypes were used for the cross-inoculations with four *P. viticola* isolates. The hosts were divided into two groups: susceptible (SUS) and resistant or partially resistant (R or PAR) to *P. viticola*, containing different Quantitative Trait Loci (QTLs) conferring resistance to *P. viticola* (Rpv). OIV-452-1 scale was used in leaf discs to evaluate the resistance of genotypes to the pathogen. Molecular and phenological comparison of isolates of downy mildew collected in different vineyards of the region, showed that exist differences among them genetically, and their aggressiveness in different genotypes of *Vitis* were also demonstrated.

Index terms: Host-pathogen interaction; Pathogen phenotyping; Grapevine downy mildew; *Vitis*; Leaf disc bioassay

Introduction

The causal agent of grape downy mildew, *Plasmopara viticola* – an obligate biotrophic oomycete, native to North America – was inadvertently introduced into Europe at the end of the 19th century (Millardet, 1881; Viennot-Bourgin, 1949), causing severe damage to *Vitis vinifera*, which had evolved in the absence of this pathogen (Gessler *et al.*, 2011). However, other species of the genus *Vitis*, originally from Eastern Asia and North and Central America, have been described as partially or totally resistant to several pathogens (Staudt and Kessemeyer, 1995; Denzer *et al.*, 1995, Kortekamp and Zyprian, 2003, Cadle-Davidson, 2008).

In susceptible cultivars, downy mildew infection rapidly struck the leaves, causing yellowish oily spots on the superior leaf surface and massive sporulation on the underside. Resistant genotypes are also affected, but proliferation is rapidly blocked by a combination of

constitutive and post-infection resistance mechanisms (Polesani et al., 2010; Gessler et al., 2011; Malacarne et al., 2011).

In the last 50 years, research on grapevine downy mildew has focused on the pathogen life cycle and epidemiology (Gessler *et al.*, 2011), in addition to the genetic identification of host resistance loci for the establishment of molecular markers (Töpfer *et al.*, 2011). In order to better understand the infection process, it is necessary to ponder both sides: the attacking strategy of the biotrophic pathogen as well as the defense reaction of the host plant (Zeledon, 2016).

The introgression of genetic factors is a key in breeding for resistance, waiting to the pathogen flexibility found in accessions of American and Asian wild *Vitis* spp. An arrangement of multiple resistance loci from different origins is highly recommended to reduce the chance of accidentally selecting for pathogen strains that overcome the plant defense mediated by only a single locus (Zyprian, 2015).

The term physiological race is used to denote variants of a phytopathogenic species (bacteria, fungi or nematodes) that cause disease in a variety of one host species, but not in another (Camargo, 2011). The concept of race arose with the gene-for-gene theory (Flor, 1947), where each host resistance gene encounters a corresponding gene in the pathogen that gives it the ability to cause disease. According to Peressotti et al. (2010), the presence of a resistance gene (R) in the plant and its corresponding avirulence (*Avr*) gene in the pathogen leads to the activation of plant defense and consequently to resistance (often associated with a hypersensitive response, HR).

Many authors have studied the possibility of formation of physiological races in *P. viticola* from resistance to fungicides (Gay-Bellile et al., 1983; Corio-Costet et al., 2011). It has been reported that the breakdown of resistance can occur due to the adaptability of the pathogen to the host (Kast, 2001).

An interaction gene-a-gene was designed for the kid-recognition process observed in the "Bianca" cultivar, since the Rpv3 resistance site was mapped to a set of NBS-LRR receptor genes (Bellin et al., 2009). The resistance to a hypersensitivity response (HR) of this cultivar was surpassed by a *P. viticola* isolate, which probably carries mutations in its avirulence (*Avr*) genes (Peressotti et al., 2010). The resistance phenotype in Rpv3 was established by the combination of loci containing the CC-NBS-LRR and TIR-NBS-LRR genes on *Vitis* genome (Velasco et al., 2007).

Peressotti et al., 2010 related the breakdown of resistance of the Bianca cultivar to the emergence of a *P. viticola* isolate (isolated SL,

from the Czech Republic), which specifically surpasses the Rpv3 gene (Resistance to *Plasmopara viticola*)—the main resistance gene of the Bianca cultivar. The chromosome 18, corresponding to the resistance derived from North American wild species, introduced from Seyve Villard (Welter et al., 2007; Bellin et al., 2009). A breakdown of resistance found by Peressotti et al. (2010), shows that the R-Avr interaction is highly specific and sufficient to avoid plant defense activation. The authors reported that the SL isolate prevents detection of the R gene due to a mutation in the Avr gene corresponding to the locus Rpv3.

The limited information on *P. viticola* isolates is mainly due to the restricted use of resistant varieties planted in the main producing regions of the world, where most of the vineyards are occupied by varieties susceptible to *V. vinifera*.

The discrimination of strains with varying degrees of virulence is an essential step for the phenotypic characterization of *P. viticola*. This can facilitate the monitoring of new, particularly virulent phenotypes of the pathogen, consequently improving the possibilities for applying control measures. Additionally, the leaf disc bioassay for virulence estimation provides the opportunity to screen for specific host-pathogen combinations which may possibly help to identify new sources of resistance for breeding new cultivars. Nevertheless, when using the leaf disc bioassay on a broader range of pathogen isolates, it became clear that sporulation and necrosis should be treated as independent features in the evaluation system (Zeledon et al., 2016)

The ability to detect and measure genetic diversity of populations is indispensable for the management and efficient use of genetic resources. Molecular techniques based on DNA analysis have been successfully applied in several areas of Mycology, enabling the development of rapid, sensitive and specific methods in the diagnosis of phytopathogens, as well as the detection and measurement of genetic diversity.

The objective of this work was to characterize by means microsatellite markers, *P. viticola* isolates occurring in the region of Trentino Alto Adige, Italy, and, through cross-inoculation to a panel of grapevine varieties, determine if there are different aggressiveness levels of *P. viticola* isolates.

Material and methods

***P. viticola* isolates collection and propagation**

Between 2011 and 2015, seven isolates of *P. viticola* were collected in Trentino Alto Adige region (Italy) in five vineyards and in the greenhouse of the Fondazione Edmund Mach (FEM). The isolates were collected from leaves infected by *P. viticola*, in the stage of oil spots. To allow DNA extraction and cross-inoculations, the isolates were multiplied by artificial inoculation on the detached leaves of the susceptible varieties ‘Chardonnay’ and ‘Pinot Noir’ according to Brown et al., 1999. The leaves of the two varieties were collected from plants growing in a greenhouse. Sporangia were harvested by suction through a vacuum pump, weighed and frozen at -20°C (Gobbin, 2004). The host grapevine variety and the location where the isolates were collected are described in **Table 1**.

Table 1. Source host, location and date of collection of the *Plasmopara viticola* isolates used in the molecular characterization and controlled cross-inoculations.

Isolate	Source host	Location	Year
PVL_2011	Chardonnay	San Michele all'Adige, abandoned vineyard without fungicide treatment	2011
PVL_2012	several <i>V. vinifera</i> grapevines	San Michele all'Adige, FEM Giaroni vineyard with fungicide treatment	2012
PVL_Storo	several <i>V. vinifera</i> grapevines	Storo (400 m s.l.m), vineyard with fungicide treatment	2013
PVL_PdP	Pinot Noir	San Michele all'Adige, FEM greenhouse with fungicide treatment	2013
PVL_2014	Chardonnay	San Michele all'Adige, vineyard with fungicide treatment	2014
PVL_Regent	Regent	San Michele all'Adige, FEM Inferno vineyard without fungicide treatment	2014
PVL_Orietta	Pinot Gris	San Michele all'Adige, FEM Inferno vineyard without fungicide treatment	2014
PVL_16-02-102	16-02-102	San Michele all'Adige, FEM Inferno vineyard without fungicide treatment	2014

The Storo vineyard is located at 409 meters above sea level, while the vineyards located in San Michele all'Adige are 228 meters above sea level; these locations are approximately 86km distant from each other (Figure 1). The *P. viticola* inoculum, named PVL-2012, derived from a collection on ancient *V. vinifera* susceptible varieties in an untreated field.

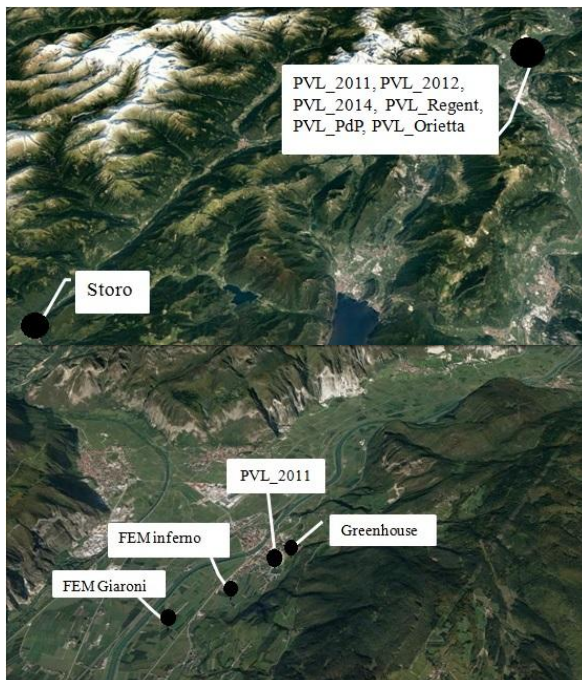


Figure 1. Local of lesion collection of *Plasmopara viticola*, in the region of Trentino Alto Adige, Italy.

Molecular characterization of P. viticola isolates

DNA extraction was performed using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Basel, Switzerland) from freeze-dried sporangia, following the methodology described by Gobbin, (2004). To increase the amount of DNA per sample, the Whole Amplification Genome (WGA) method was used, by GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma, St. Louis, MO).

The isolates were genotyped with 41 microsatellite markers specifically designed for *P. viticola* (Gobin et al., 2003, Rouxel et al., 2012) (Table 2). Initially to optimize the genotyping of the isolates, all primers were combined into multiplexes. However, due to difficulties on amplification and data interpretation, most of the primer pairs were used in simplex. Exceptions were the primers BER, CES and GOB; as well as ISA and REX that were combined into two multiplexes, respectively.

PCR for the two multiplexes were done using the Qiagen Multiplex PCR kit (Qiagen Basel, Switzerland), following the

manufactory instructions. For the simplexes, the PCR reaction was performed in 12,5 µl of final volume containing: 2.5 µl of 2x buffer, containing 1,5 MgCl₂; 1 µl of 0,8 mM Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs), 1 µl of a dye-labeled forward primer and an unlabeled reverse primer (10 mM); 1.5 U HotStar Taq Polymerase (Qiagen Basel, Switzerland) and 2µl of DNA solution (not quantified).

PCR cycles were performed in a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) under the following conditions: 15 min at 95°C; 35 cycles of 40s at 95°C, 90s at the appropriate annealing temperature (Table 2) and 60s at 72°C and a final extension of 30min at 60°C. Ten microliters of PCR products were migrated on agarose gel (1%) with a MassRuler Low Range DNA Ladder 100 bp (Thermo Fischer Scientific). After electrophoresis, gels were exposed to an X-ray film (BIO-RAD, Universal Hood II) to visualize the amplicons. Those presenting irregular amplification or multiple banding patterns were discarded. The remaining loci were analyzed as follows: 0.5 µl of PCR products (diluted at 1:90) was mixed with 9.45 µl of formamide and 0.5 µl of GeneScan 500 LIZ (internal lane size standard) and the samples were sent to the Genomics Platform from the Centro Ricerca e Innovazione, for automated genotyping in a capillary sequencer.

Alleles were scored using the GeneMapper v4.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA). Finally, 35 primer pairs with clearly interpretable PCR products were retained for the genetic analysis. The simulation of parentage analysis was estimated using Cervus v3.0; the isolates were grouped in a phylogenetic tree according to the Jaccard distance, using the UPGMA clustering algorithm, with the Vegan package (Oksanen et al., 2017) in R Core Team 3.3.2 software (2016).

Table 2. Primers sequence, repeat type, annealing temperature and allele size range of the 41 microsatellite loci employed in the genetic analysis of *Plasmodium viticola* isolates

Locus	Primer forward sequence	Primer reverse sequence	Repeat type	Annealing T (°C)	Size range alleles
BER	AATGCAATGGTCTTCACTCG	CTCTGCGGTAAGCCTGTC	Perfect (TC)n	60	179-185
CES	CTTGTCCGTAGTAAAGCGTG	GCTGTACTTACAACCTCATCAG	Compound (TC)n(AC)n	60	143-186
GOB	CTTTGGAAGTTATACCATGCTACC	TTGAGAAATCGCACAGCTTA	Compound (CT)n(CTAT)n	60	210-434
ISA	AATTAGCGCATGGACGTT	GAGAAGTTCCGCCAAGTACA	Perfect (TC)n	60	118-144
REX	CGTGTGCGATAGCAAACTT	TTGCATTCGCACCTCCCTTAC	Compound (TC)n(AC)n	60	164
Pv61	TCTTCAGGTAGATGCGACCA	GGTGACTCCTCGGACGAATA	(CA)9	54	181-187
Pv65	C.TTTGGCCACGTCATAGTT	CGCTTTTCGGTAGTCCATTA	(TC)9	57	196-202
Pv67	GCATTGAGCAGACACCTTGA	GAGCGATAAGACCACAATAGTGA	(AC)9	54	348-368
Pv74	GCAACGTTGTGCAAGCTTTA	GCATTATGATGGAGCTCACG	(AG)7	54	176-182
Pv76	CTGGTTGCTGATGCACTGAC	GGCCGTGACTAAGTCGTTGT	(TC)7	57	136-140
Pv83	TGCAGCATTGTTTCATCCAT	ACACGGTACTTTGCGTTCCCT	(TG)6	54	238-242
Pv87	CGTGCATTTAAACACAGG	CTCACAGGACGACTGGACA	(CT)6	54	152-154
Pv88	AATACCAAAAATGGCGTCA	ACTCTCTTGGCCAGCACCATC	(GT)6	54	202-208
Pv91	ACCAGCCTTTGCGAAGATAA	TGAAAGTTACGTGTCGCACC	(TG)6	54	142-146
Pv93	TAGCACCGGACTAGCGGTAT	TGTACCCTGTTGCCCTCTTC	(GT)6	54	147-151
Pv96	TAGTCTTACAGATTTCCGCGT	ATCATCTGAAGGCCAAGAAA	(CA)6	54	172
Pv100	TGATAAGATACCGCACAGGC	TTGTTTGAAGCCTGAACG	(TA)6	54	231
Pv101	AACACGGCGCCAAAGTATTA	GGGCATTAACGTGCAAAAT	(CTT)6	54	263-266
Pv102	GATCGCCTTTTTCGAATGTCT	AAAGGAGTCAACATGCTCGC	(CT)6	54	273
Pv103	TGACCTACCACCCATTTACCA	ACGGTCAAGTCAAAAGCAGT	(TG)6	54	277-299
Pv104	CTACGCTCGAGGATGACACA	GACATTTGCCGACCTAAGAT	(CA)6	54	321-32
Pv124	AACGACAGACGGATTTCTGC	GACCTCGAGCGCTTTGA	(AG)6	57	139-142
Pv126	CTCTCTGCGAGGACGTTTTT	GCCGTCTTTCACGTTCTAGC	(GAC)10	50	182-206
Pv127	TTGAAAACCGCGATAGGAAC	GAACTGCCAGTTCGGATTGT	(CA)9	54	213-223
Pv133	AACGACAGACGGATTTCTGC	CGACCTCGTCTTCACTTTCC	(AG)6	54	178-181
Pv134	CATGCTCACGTAGACCTCCA	AATGACAGAGCTCCCATAACG	(AG)6	54	220-226
Pv135	GGTGCTCTGCTTCGACACTT	CGCCACACAAAGTCAACTTTC	(TTC)10	57	217-220
Pv139	GTTTCTGCTGAACAGAGGCG	ATCTCTCGCCAGAAATGAC	(CTT)10	57	161-164
Pv137	AAGTGGGACACATCAAGCGT	TGGCAATAAGTTTATGCTCTG	(AT)9	57	243-256
Pv138	CGTGATCATGACGTTTGTCT	CGACGAATCAGGACAAAGAT	(TA)9	57	225-235
Pv139	GACCCGGACAAATGGACTCT	CCGCCATGTATTGAACAGTG	(AC)8	57	126-133
Pv140	GCTTGAGAGAAGATGGAAACGC	CCAGAAAGGTTGATACGAGA	(TA)9	57	172-201
Pv141	ACGACGACATGAGCTGTAGC	GAAGGTGGTGTCTATGGGTTT	(TC)9	57	190-192
Pv142	TTATGCCACGCAAACTCTCTG	AGGGCGAAATACGAGAGTGA	(CT)11	57	209-219
Pv143	CCTGAATAAAGCAACACGCA	TTGCGAGCAAAATGTACGAC	(AT)8	57	121-135
Pv144	ACCAAGAATCGACCTAACG	GTCTCGCTGTTTGTGCGGTTA	(AT)12	57	161-192
Pv145	GACCTTGAAGGAAGCCATCCA	CTCTCTCCAAGTTCGTCTGG	(AGA)6	57	204
Pv146	CTCGGACCTTGAAGAACGAC	ACGTGGCCTAGGTTCAACAG	(GAG)7	57	242-245
Pv147	TGCACTACGAGTCCGAGAGG	TTCTAGCTCGACGAAGACC	(TCGACT)8	57	189-219
Pv148	CGACCTATGTTTCGCCATTT	GAGTGTCTGTAGAAGGCGTCT	(ACA)6	57	134-137

Grapevine host materials

Twelve host varieties/genotypes were used for the cross-inoculations with four *P. viticola* isolates. The hosts were divided into two groups: susceptible (SUS) and resistant or partially resistant (R or PAR) to *P. viticola*, containing different QTLs conferring resistance to *P. viticola* (Rpv). The SUS hosts were ‘Pinot Noir’ and ‘Muscat Ottonel’; the R or PAR host are ‘Bronner’, ‘Muscaris’ and ‘Cabernet Cortis’ (Rpv10; Blasi 2010 and Schwander et al. 2012); ‘16-02-102’ (Rpv1); ‘MW14’, ‘Bianca’, ‘Regent’ and ‘Rupestris du Lot’ (Rpv3); ‘Jasmin 8/1’ (Rpv12); ‘Riparia Gloire d’Montepellier’ (Rpv5+Rpv6).

Controlled cross-inoculations of P. viticola

Four isolates (PVL-2014, PVL-Orietta, PVL-Regent and PVL-16-02-102) collected in the Trentino Alto Adige region (Table 1) were used for cross-inoculation with the panel of 12 grapevine varieties. The fourth and fifth leaves under the shoot apex of all hosts were detached and rinsed with distilled water. Eight leaf discs of 2cm of diameter (four from each leaf) were excised from the two leaves, with a cork borer and plated onto damp filter paper in Petri dishes with the abaxial side up. The leaf discs were sprayed with a *P. viticola* inoculum suspension at 100,000 sporangia ml⁻¹ concentration, while the four remaining discs were treated with a mock solution. Petri dishes were incubated at 21°C in dark conditions for 48h in a growth chamber and then placed under light with a photoperiod of 16/8h (light/dark) for 7 days (Bellin et al., 2009). The susceptible varieties ‘Pinot Noir’ and ‘Muscat Ottonel’ leaf discs were employed as a positive control.

Disease severity (DIS), sporulation density (SD) and necrosis appearance (N) were visually analyzed as independent variables using an optimized scale OIV 452-1 descriptor (OIV, 2009; Peressotti et al., 2010) on the 4th and 7th days post-infection (dpi). Classes were named 1, 3, 5, 7 and 9 from the most susceptible (1) to the totally resistant phenotype (9), identified by absence of sporulation. Pictures of leaf discs were taken from 4 to 7 dpi using a digital camera (Canon EOS40D) in optimized artificial light conditions at constant focal length. Pictures were taken removing the lid from the Petri dishes and each picture included the 4 leaf discs from the same genotype. Images were stored in jpeg format and processed using the open source software *ImageJ* version 1.43q (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) with a semi-automatic quantification of sporulation (Peressotti et al., 2011). Finally, based on the latter analysis, the AUDPC (Area Under Disease Progression Curve) (Madden et al., 2007) was also calculated, in order to assess the progression of the disease during the time (SHANNER and FINEY, 1977).

Tests of significance were performed using factor analysis (4 isolates x 12 genotypes) and the means compared by Tukey test ($\alpha = 0.05$). The ASSISTAT software, version 7.7 (SILVA, 2014) were used for the data analysis.

Results and Discussion

In our study we used 41 microsatellite markers to genotype seven different isolates of *P. viticola*. From them, 35 revealed reliable information and were used in the genetic analysis. Overall, 55 alleles

were detected with the 35 microsatellite markers, ranging from one to four alleles per locus, with a mean number of alleles per locus of 1.57. Only seven loci (20%) detected polymorphism between the seven isolates, with a mean number of alleles per locus of 2,43. From the monomorphic markers, 18 were homozygous and 10 heterozygous. From the seven isolates, only the isolates PVL-2011 and PVL 2012 shared the same alleles for all markers; all the others are divergent in at least one locus.

The genetic relationship between the isolates is demonstrated at the dendrogram (Figure 2). Overall, the genetic divergence was low, and the seven isolates were distributed in two main groups, with a Jaccard Distance between groups of 0,20. The first group corresponded to the isolates Pvl-Orietta and Pvl-PdP, which has shown about 85 % of similarity to each other. The second group split into two sub-groups: the first composed of the isolates Pvl_2014 and Pvl_Regent, sharing about 93% of similarity; and the second subgroup was composed of Pvl_2011 and Pvl_2012 that are identical, and Pvl_Storo that showed about 90% of similarity with the two others.

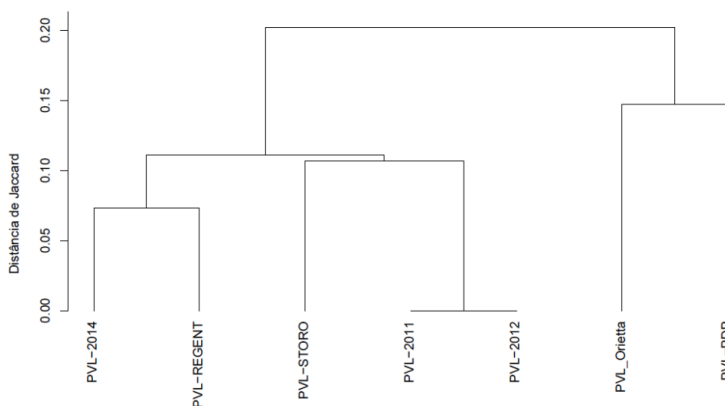


Figure 2. Dendrogram of Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) cluster analysis based on Jaccard distance, demonstrating the genetic relationship between seven *Plasmopara viticola* isolates, collected in Trento, Italy, genotyped with 35 microsatellite markers.

The genetic diversity of *P. viticola* detected by DNA polymorphism analysis was considered high in a considerable part of the vineyards in France, Italy, Switzerland and Germany (Stark-Urnau et al.,

2000; Gobbin et al., 2003a, 2003b, Scherer and Gisi (2006). A high genetic diversity of the pathogen was also detected by researchers in studies conducted in South Africa and Greece (Koopman et al., 2007; Rumbou and Gessler, 2007). In contrast, low genetic diversity was detected in isolates collected in the Greek Isles (Rumbou & Gessler, 2006), North America (Michigan, Virginia, New York) and Europe (France – Gironde and Vacluse and Germany – Rhine Valley) (Delmotte et al., 2006; Rouxel et al., 2012; Fontaine et al., 2013). A large-scale study of *P. viticola* in Europe (Gobbin et al., 2006), using 8,991 isolates collected in 5 countries (France, Switzerland, Italy, Germany and Greece) concluded that the samples showed high genetic and genotypic diversity, structured into five groups, based on geographic origin.

The high genetic diversity found in previous studies is based only on four microsatellite markers (ISA, BER, CES and GOB); from which, only the markers GOB and CES revealed high heterozygosity (He) and high Polymorphic Information Content (PIC). One or few haplotypes appeared more frequently in all cases, prevailing in the populations studied. Delmotte et al. (2006) used seven different microsatellite markers (Pv7, Pv13, Pv14, Pv16, Pv17, Pv31, Pv39) and discovered low genetic diversity in populations of *P. viticola*.

Four isolates (PVL-2014, PVL-Orietta, PVL-Regent and PVL-16-02-102) collected in the Trentino Alto Adige region were used for cross-inoculation with a panel of 12 grapevine varieties (2 susceptible and 10 resistant or partially resistant to *P. viticola*). The first two were isolated from susceptible grapevine varieties, while the two latter were collected from partially resistant varieties (Table 1).

PVL-2014, PVL-Regent and PVL-Orietta were genetically divergent (Figure 2). The isolate PVL-16-02-102 was not genotyped with the microsatellite markers. All isolates tested revealed good capacity for severity and dense sporulation in the susceptible grapevines studied. However, there are significant differences regarding isolate aggressiveness when all host varieties are considered together (Table 3).

Table 3. Disease severity, sporulation density and severity of necrosis for four isolates of *Plasmopara viticola* at four and seven days post inoculation. The values represent the mean of 12 grapevine varieties inoculated with the isolates.

Isolates	4 dpi				7dpi											
	DIS	SD	IP	N	DIS	SD	IP	N								
PVL-2014	7,68	a	7,66	a	7,55	ns	8,17	ns	6,77	a	5,93	ns	6,16	a	8,27	a
PVL-Regent	7,88	a	7,57	a	7,56		8,61		5,23	b	5,10		5,01	b	7,71	ab
PVL-Orietta	7,21	ab	7,19	ab	7,03		8,25		5,17	b	5,70		5,28	ab	7,23	b
PVL-16-02-102	6,33	b	6,41	b	6,55		8,52		6,08	ab	5,41		5,61	ab	7,70	ab
C.V.%	12,63		14,91		13		4,98		20,34		19,35		19,27		6,62	

Interaction genotype*sample not significant. DIS: disease severity; SD: sporulation density; IP: integrated parameter $\sqrt{\text{DIS} \times \text{SD}}$; N: intensity of necrosis. Means with the same letter do not differ significantly ($P > 0.05$). Results obtained from 12 discs per genotype, with three replicates. ^bThe means were compared using Tukey's test. For the statistical analysis the data were transformed by $X = \sqrt{X}$

At 4 dpi the isolate PVL-16-02-102 showed a higher disease severity (DIS) and sporulation density (SD), with the lowest means – for all varieties – of 6.33 and 6.42, respectively. For both variables, the isolate PVL-16-02-102 only did not differ significantly from the isolate PVL-Orietta (Table 3). At 7 dpi the isolates PVL_Orietta, PVL_Regent and PVL-16-02-102 were the most aggressive, but the latter did not differ from the PVL-2014 (Table 3). Considering 4dpi and 7dpi, the isolate PVL-2014 was the least aggressive in the panel of 12 grapevine varieties. For the necrosis presence (N) the differences between the isolates are not evident in 4dpi, however at 7dpi the results suggest that the isolate PVL-2014 induced less necrosis on the genotypes, however it is not significantly divergent from PVL-Regent and PVL-16-02-102 (Table 3).

The adaptation of pathogens to a particular environment or host genotype results from a complex pattern of coevolved quantitative traits which define the evolutionary strategy of pathogens in these conditions (Delmas et al., 2016). We found that PVL_16-02-102 in 4dpi was one of the most aggressive isolates; it was isolated from the genotype '16-02-102', which carries the resistance QTL *Rpv1*, in an untreated vineyard. In 7dpi, however, PVL_Regent demonstrated the most aggressiveness; it was collected in an untreated vineyard and its host was 'Regent'—a variety which carries the resistance QTL *Rpv3*. This combination of factors possibly made the isolate fit better than the others, and this in turn ended up developing a greater aggressiveness.

Our results were similar to those found by Delmas et al. (2016) which showed that pathogen isolates, collected from partially resistant hosts, were significantly more aggressive (i.e. greater quantitative pathogenicity) than the isolates collected from susceptible hosts. This genetic adaptation was observed, regardless of the resistant host inoculated, and involved the main pathogenicity traits of *P. viticola*.

Increases in the aggressiveness of adapted isolates may have important consequences for epidemics and asexual propagation of the pathogen on partially resistant hosts (Iacono et al., 2012). Delmas et al. (2016) explains that regardless of the resistance erosion resultant from the adaptation of *P. viticola* isolates, it is essential to consider that the results of the study also indicated that grapevine varieties still efficiently controlled the pathogen by significantly decreasing its sporulation on leaves.

Generally the resistance of plants can be described as a quantitative trait, with variations in the degree of resistance, which can be high or low. (Young, 1996). Alternatively, the susceptibility can be defined as the host plant's absence or slow response (Kranz, 2003). As a consequence, in susceptible plants the pathogen is capable of having a successful severity, forms of parasitism structures such as haustoria, colonize the host tissue and complete its infection cycle (Boso and Kessemeyer, 2008).

Significant differences were also recorded in the mean disease severity (DIS), sporulation density (SD) and necrosis presence (N) among the 12 genotypes inoculated with the four isolates ($P < 0.05$). However, the interaction genotype x days post-inoculation had no significant effect on these variables ($P > 0.05$) (Table 4).

Table 4. Mean values of disease severity, sporulation density and severity of necrosis for each genotype obtained by the inoculation of the isolates PVL_2014, PVL_Regent, PVL_Orietta and PVL_16-02-102 in leaf discs bioassays under laboratory conditions.

Genotype	4dpi				7dpi			
	DIS	SD	IP	N	DIS	SD	IP	N
16-02-102	5,23 d	4,81 d	4,92 e	8,96 a	3,20 d	2,53 e	2,61 e	8,36 abc
Bianca	7,42 abcd	7,32 abcd	7,3 abcd	8,03 ab	5,34 bcd	5,58 bcd	5,37 cd	7,13 bcd
Bronner	8,73 a	8,73 a	8,73 a	6,86 c	8,75 a	8,66 a	8,69 ab	6,02 d
Cabernet Cortis	6,50 abcd	6,96 abcd	6,7 abcde	8,25 ab	4,34 cd	4,57 cde	4,25 cde	7,50 abc
Jasmin8/1	8,11 ab	8,32 ab	8,25 ab	8,70 ab	5,93 abcd	6,57 abc	6,2 abc	7,80 abc
Muscat Ottonel	8,40 a	8,40 a	8,26 ab	8,74 ab	4,80 cd	3,74 de	3,93 cde	8,62 a
Muscaris	6,58 abcd	6,33 abcd	6,28 bcde	8,64 ab	8,13 ab	8,27 ab	8,19 ab	7,37 abc
MW14	5,86 bcd	5,34 cd	5,46 de	8,81 ab	4,15 cd	2,71 e	3,14 de	8,45 ab
Pinot Noir	5,78 cd	5,78 bcd	5,8 cde	8,78 ab	3,80 cd	2,99 e	3,08 de	8,64 a
Rupestris du Lot	8,10 abc	8,23 ab	8,14 abc	7,77 bc	6,28 abc	5,74 bcd	5,8 bc	7,60 abc
Regent	8,65 a	8,66 a	8,52 ab	8,56 ab	6,09 abc	6,09 abcd	5,99 bc	7,05 cd
Riparia GdM	7,95 abc	7,62 abc	7,73 abc	8,53 ab	8,95 a	8,95 a	8,95 a	8,20 abc
C.V. %	12,63	14,91	13	4,98	20,34	19,35	19,27	6,62

Interaction genotype * dpi not significant. DIS: disease severity; SD: sporulation density; IP: integrated parameter $\sqrt{\text{DIS} \times \text{SD}}$; N: severity of necrosis. Means with the same letter do not differ significantly ($P > 0.05$). Results obtained from 12 discs per genotype, with three replicates. ^b Means compared with Tukey's test. For the statistical analysis the data were transformed by $X = \sqrt{X}$

There were significant differences between the genotypes for DIS, SD, IP and N at 4 and 7dpi. As expected, the 'Pinot Noir' showed one of the highest susceptibility to the isolates tested. Contrasting results were obtained for 'Muscat Ottonel'. This variability in susceptibility may have several causes and mechanisms (anatomical, biochemical, molecular, etc.). Alonso-Villaverde et al. (2011) indicated that such differences among *V. vinifera* varieties could be due to certain anatomical or histological features of some clone's leaf mesophyll; in general, more resistant varieties usually have a thinner and differently arranged lacunar parenchyma layer. Gindro et al. (2006) found that the variability in susceptibility among *Vitis* clones and species is the consequence of biochemical and histological differences.

From the genotypes carrying resistance loci, 'Bronner' and 'Regent' revealed the highest level of resistance to the disease (the highest values of DIS and SD) at 4dpi. However they do not differ significantly from the genotypes 'Bianca', 'Cabernet Cortis', 'Jasmin 8/1', 'Muscaris', 'Rupestris du Lot' and 'Riparia GdM'. The most susceptible were '16-02-102' and 'MW14', but they did not differ from 'Bianca', 'Cabernet Cortis' and 'Muscaris' (Table 4).

At 7dpi ‘Bronner’ continues showing the highest level of resistance (DIS: 8.75 and SD: 8.66), together with ‘Riparia Gloire de Montepellier’, ‘Regent’, ‘Rupestris du Lot’, ‘Muscaris’ and ‘Jasmin 8/1’. The genotype ‘16-02-102’ and ‘MW14’ showed values of DIS and SD similar to the susceptible varieties ‘Pinot Noir’ and ‘Muscat Ottonel’, demonstrating a high susceptibility to the isolates tested. Although ‘Cabernet Cortis’ showed higher absolute value for DIS and SD, the values did not differ significantly from the further genotypes (Table 4).

The results of the present study show that differences in susceptibility to downy mildew exist between the grapevine varieties tested, as previously reported by several authors (Boso and Kassemeyer, 2008; Boso et al., 2006, 2011; Alonso-Villaverde et al., 2011); and also, differences in susceptibility between distinct sources of resistance of *Vitis* (Gindro et al., 2006; Staudt and Kassemeyer, 1995; Yu et al., 2012).

The varieties ‘Bronner’, ‘Muscaris’, ‘Regent’, ‘Rupestris du Lot’, ‘Jasmin 8/1’ and ‘Riparia GdM’ demonstrated a good level of resistance to the attack of *P. viticola*. ‘Bronner’ and ‘Muscaris’ carry the resistance QTL *Rpv10* – located on chromosome 9, initially introgressed from *Vitis amurensis*, a wild species of the Asian *Vitis* gene pool – which provides a high resistance level to downy mildew (Blasi et al., 2010, Schwander et al., 2012).

The variety Regent, carries the QTL *Rpv3*, located on chromosome 18, introgressed from multiple North American grapevines ancestors (Welter et al. 2007; Bellin et al., 2009, Zyprian et al., 2009, Di Gaspero et al., 2012); it provides a hypersensitive response (HR) which starts during the initial stages of pathogen infection, restricting mycelium growth in the mesophyll, and reducing the release of sporangiophores (Casagrande et al., 2011).

According to Schwander et al., (2012) the QTL *Rpv10* seems to be superior to the *Rpv3* locus in promoting a higher level of resistance to downy mildew. In our study we made this observation when we compared the performance of ‘Bronner’ and ‘Muscaris’ with that of ‘Regent’, specially at 7dpi, where ‘Bronner’ and ‘Muscaris’ maintained higher level of resistance to *P. viticola*. However, ‘Bianca’ and ‘16-02-102’ (*Rpv3*), as well as ‘Cabernet Cortis’ (*Rpv10*), revealed inferior resistance when compared to the further genotypes described. It could be that these two genotypes lost some minor QTLs during the breeding process. In addition, the level of the host response could be affected by the genetic background as well.

The genotype '16-02-102', although containing the resistance QTL *Rpv1*, localized in the chromosome 12 and introgressed from wild American species (*Muscadinia rotundifolia*) (Merdinoglu et al., 2003); showed one of the highest levels of susceptibility for variables DIS and SD at 4dpi and 7dpi (similar to the susceptible variety 'Pinot Noir'). Our results suggested that the haplotypes of *Rpv1* present in the genotype '16-02-102' were not able to contain the pathogen's progress, leading to low degrees of resistance for these genotypes.

The North American *Vitis* species are recognized to be very resistant to *P. viticola*. This oomycete native of North America has been present during the evolutionary history of the *Vitis* species in that region, exerting a selective strain to develop resistance mechanisms against the pathogen. 'Riparia GdM' (*Vitis riparia*) was the only one able to totally block the sporulation of the selected isolates of *P. viticola*. The variety, which has *Rpv5+Rpv6* pyramiding, showed an increased resistance at 7dpi compared to 4dpi, indicating that additional resistant mechanisms had inhibited pathogen development in a later stage. Several loci that confer resistance to *P. viticola* have been reported as having this species as donor (Moreira et al., 2011; Díes-Navajas et al., 2008). Nevertheless, sporulation in *V. riparia* has previously been reported by other researches (Staudt and Kassemeyer, 1995), showing that the pathogen response of this species may be different depending on the accession used (Unger et al., 2007). This had been observed by Boso and Kassemeyer (2008) studying the hybrid 'Solaris' (*Rpv10*), when some long hyphae with haustoria developed but also the reduced hyphae length and number of haustoria at a later stage.

Delmas et al. (2016) found that the moderately resistant varieties still efficiently controlled the pathogen (mean rates of spore production 74% lower than those on susceptible 'Cabernet sauvignon') but that their resistance had been quickly wrinkled due to the adaptation of pathogen genotypes. Molecular markers showed that the adaptation of *P. viticola* to the different partially resistant varieties was not due to the emergence and spread of an exclusive clonal genotype with superior aggressiveness as reported in other plant pathogenic oomycetes (Ahmed et al., 2012; Cooke et al., 2012).

On whole leaf discs of all cultivars and genotypes tested responded with necrotic lesions after inoculation, but the severity (DIS) and severity of necrosis was significantly lower on susceptible genotypes than on hybrids that displayed higher resistance to the disease. The highest amount of necrosis in the leaf disc test occurred in

‘Cabernet Cortis’, whereas in the hybrid ‘16-02-102’, severity and severity of necrosis was significantly lower.

The leaf discs of varieties ‘Bronner’, ‘Regent’ and ‘Bianca’ showed the highest intensity of necrosis. According to Ryals et al. (1996), a plant’s successful defense against invading pathogens depends on early detection of the pathogens and the initiation of the proper signaling processes to start a multi-cascade defense response. The necrosis which were formed in *Vitis* species and the hybrids as response to infection with *P. viticola*, indicates a successful defense response, once it has been described for some resistant genotypes of grapevine (Dai et al. 1995, Busam et al., 1997, Kortekamp et al., 1998, Brown et al., 1999, Kortekamp and Zyprian, 2003, Unger et al., 2007) and may be attributed to a hypersensitivity reaction (HR) causing programmed cell death (PCD) around the infection site. The high frequency of necrotic lesions that were found on the highly resistant Bronner and the low frequency of lesions on susceptible genotypes is further evidence that HR plays an important role in resistance of grapevine to *P. viticola*. Probably, HR affects the further development of *P. viticola* in a very early stage, before the development of haustoria.

Asiatic species have been previously characterized by sporulation suppression while reacting with strong necrosis (Boso and Kessmeyer, 2008; Denzer et al., 1995). Despite this, it has been reported that stronger necrotic reaction correlates to higher susceptibility in crosses of *V. vinifera* with *V. amurensis* (Pariaud et al., 2009). Gómez-Zeledon et al., 2016 studying *A. japonica*, shows that hosts with stronger resistance might block the sporulation of the pathogen without showing necrosis. This kind of reaction, which would correspond to a non-host resistance, is more durable than the one conferred by R genes. Type I non-host resistance (performed by plant defense mechanisms) would be ideal for breeding because it does not involve a hypersensitive reaction (Merdinoglu et al., 2003). These results are of special interest, since species closely related to *V. vinifera* constitute potential sources of resistance genes against downy mildew e.g. *Muscadinia rotundifolia* (Gómez-Zeledon et al., 2015).

In Figure 3, the progress curve of the disease is shown for the 12 grapevine varieties in response to the inoculation with the four isolates of *P. viticola*. The isolate PVL-2014 seems to be the least aggressive, since the AUDCP curves are lower for all the 12 grapevine varieties tested. It the different response of the grapevine varieties is also visible, depending on the isolate.

The susceptible variety 'Pinot Noir', as expected, showed one of the highest AUDPC for all the isolates tested. From the partial resistant varieties, '16-02-102' (Rpv1) and 'MW14' (Rpv3) showed the highest AUDPC. The genotypes carrying Rpv10 ('Bronner', 'Cabernet Cortis' and 'Muscaris'), Rpv12 ('Jamin 8/1') and Rpv5+Rpv6 showed low AUDPC curve for the four isolates. It could be related, that none of the isolates were collected from a host containing these resistance loci. Interestingly, the genotypes 'Bianca' and 'Regent', which possessed the Rpv3 resistance loci, responded differently to the isolates. Both were highly resistant to the isolates PVL-2014, PVL-Orietta and PVL-06-02-108, but showed a higher susceptibility to the isolate PVL-Regent, which was collected from the host 'Regent'. It could indicate an adaptation of the isolate to the Rpv3 locus. In both cases the amount of disease decrease at 7 dpi, suggesting that the defense response is retarded with this isolate. This result could be associated with the pathogen recognition as well. 'Rupestris du Lot' is a wild grape, therefore its higher resistance expressed by the isolate PVL-Regent could be associated with other resistance QTL or genetic background.

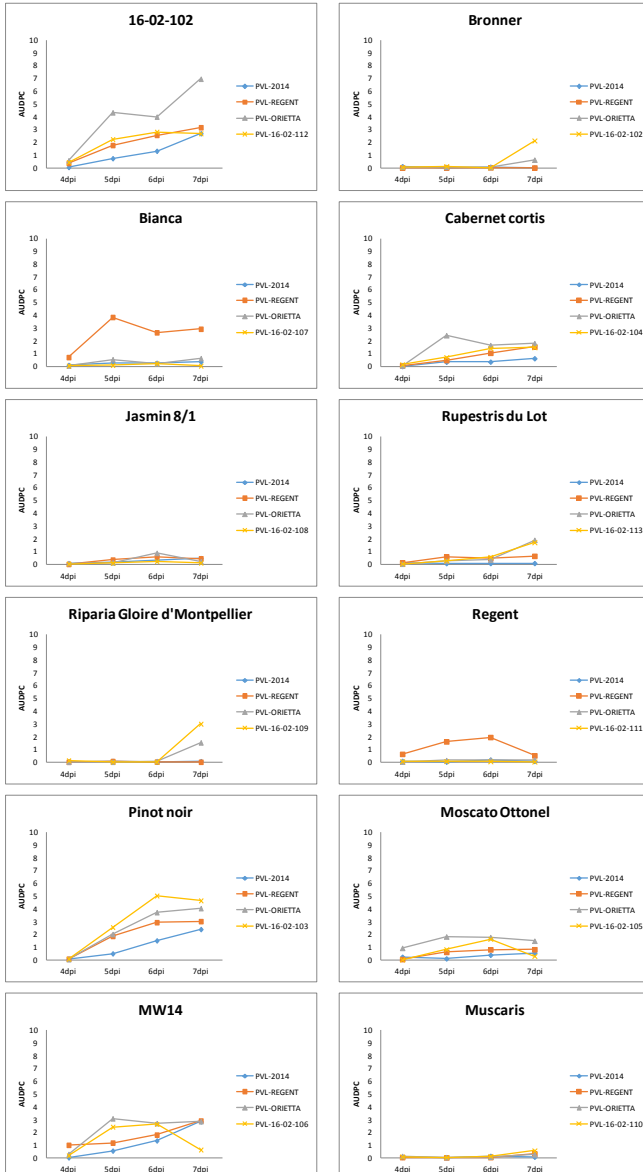


Figure 3. Area Under the Diseases Progress Curve of 12 grapevine varieties or breeding lines inoculated with four different isolates of *Plasmopara viticola*, from four to seven days after inoculation (dpi).

Conclusions

This study demonstrates that even in a very limited geographical area of Trento Province - Italy, and with a limited number of isolates of *Plasmopara viticola* it is possible to find genetic variability; additionally, those isolates reveal different aggressiveness in a panel of grapevine varieties or breeding lines, and that specific interaction between isolate and host may occur.

References

- Ahmed, S., D. T. De Labrouhe, Delmotte, F. (2012). Emerging virulence arising from hybridisation facilitated by multiple introductions of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. **Fungal Genetics and Biology**, 49:847–855
- Alonso-Villaverde V, Voinesco F, Viret O, Spring JL, Gindro K. (2011). The effectiveness of stilbenes in resistant *Vitaceae*: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. **Plant Physiol Biochem**, 49:265-274.
- Antonovics, J., Thrall, P.H. (1994). The cost of resistance and the maintenance of genetic polymorphism in host-pathogen systems. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 257:105–10
- Bellin, D., Peressotti, E., Merdinoglu, D., Wiedemann-Merdinoglu, S., Adam-Blondon, A.F., Cipriani, G. et al. (2009). Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine ‘Bianca’ is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site, **Theoretical and Applied Genetics**, 120, 163–176.
- Boso, S., Kassemeyer, H.H. (2008). Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew. **Vitis**, 47, 39–49.
- Boso, S., Martínez, M.C., Unger, S., Kassemeyer, H.-H., (2006). Evaluation of foliar resistance to downy mildew in different cv. Albariño clones. **Vitis**, 4, 23e27.
- Brown, M., Moore, J.N., Fenn, P., McNew, R.W., 1999. Comparison of leaf disc, greenhouse, and field screening procedures for evaluation of grape seedlings for downy mildew resistance. **Hort Scienc**, 34, 331–333.

BUSSAN, G.; KASSEMAYER, H. H.; MATERN, U. (1997). Differential expression of chitinases of *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. **Plant Physiology**, 115, 1029-1038.

Cadle-Davidson, L. (2008). Variation within and between *Vitis* spp. for foliar resistance to the downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. **Plant Disease Journal**, 2008, 92:1577-1584.

Cooke, D. E., L. M. Cano, S. Raffaele, R. A. Bain, L. R. Cooke, G. J. Etherington, K. L. Deahl et al. (2012). Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen. **PLoS Pathogens** 8:e1002940.

Corio-Costet, M-F., Dufour, M-C., Cigna, J., et al. (2011). Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. **European Journal of Plant Pathology** 129, 315-329.

Dai, G. H., Andary, C., Mondolot-Cosson, L., Boubals, D., (1995). Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 46, 177–188.

Day, P. R. (1974) Genetics of Host-Parasite Interaction (Freeman, San Francisco), pp. 1-238.

Delmas, C.E.L., Fabre, F., Jolivet, J., Mazet, I.D., Cervera, S.R., Delière, L., Delmotte, F. (2016). Adaptation of a plant pathogen to partial host resistance: selection for greater aggressiveness in grapevine downy mildew. **Evolutionary Applications**, 9, 709–725.

Delmotte, F., Chen, W.J., Richard-Cervera, S., Greif, C., Papura, D., Giresse, X., Mondor-Genson, G., Corio-Costet, M.F. (2006). Microsatellite DNA markers for *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew of grapes. **Molecular Ecology Notes**, 136, 363–371.

Denzer H, Staudt G, Schlosser E. (1995). The behavior of *Plasmopara viticola* on resistant and susceptible grapevine varieties. **Vitis**, 34:113-117.

- Díez-Navajas AM, Wiedemann-Merdinoglu S, Greif C, Merdinoglu D (2008). Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the tissue level. **Phytopathology**, 98: 776-780.
- Doumayrou, J., A. Avellan, R. Froissart, and Y. Michalakis (2013). An experimental test of the transmission–virulence trade-off hypothesis in a plant virus. **Evolution**, 67:477–486.
- Fischer, B.M., Salakhutdinov, I., Akkurt, M., Eibach, R., Edwards, K.J., Topfer, R., Zyprian, E.M., (2004). Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. **Theoretical and Applied Genetics**, 108, 501–515.
- Flor, H.H. (1947). Inheritance of reaction to rust in flax. **Journal of Agricultural Research** 74:241-262.
- Flor, H.H. (1971). Current status of gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, 9:275–96
- Fontaine, M. C., F. Austerlitz, T. Giraud, F. Labbe, D. Papura, S., Richard-Cervera, and F. Delmotte (2013). Genetic signature of a range expansion and leap-frog event after the recent invasion of Europe by the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. **Molecular Ecology**, 22:2771–2786.
- Froissart, R., J. Doumayrou, F. Vuillaume, Alizon, S., Michalakis, Y. (2010). The virulence–transmission trade-off in vector-borne plant viruses: a review of (non-) existing studies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 365: 1907–1918.
- Gay-Bellile, F.; Lacouture, J.; Sarrazin, J.F.; Courlit, Y. and Menard, E. (1983). Le point sur le mildiou de la vigne. les fongicides systémiques. les souches résistantes. **Progres Agricole et Viticole** 100:83-89.
- Gessler, C., Pertot, I., Perazzolli, M., (2011). *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. **Phytopathologia Mediterranea**, 50, 3–44.
- Gindro, K., Pezet R., Viret, O., (2003). Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to

Plasmopara viticola infections. **Plant Physiology and Biochemistry**, 41, 846–853.

Gobbin D, Pertot I, Gessler C (2003) Identification of microsatellite markers for *Plasmopara viticola* and establishment of high throughput method for SSR analysis. **European Journal of Plant Pathology**, 109: 153-164.

Gobbin, D., Rumbou, A., Linde, C.C., Gessler, C., (2006). Population genetic structure of *Plasmopara viticola* after 125 years of colonization in European vineyards. **Molecular Plant Pathology**, 7, 519–531.

Gobbin, D., Pertot, I., Gessler, C., (2003a). Identification of microsatellite markers for *Plasmopara viticola* and establishment of high throughput method for SSR analysis. **Eur J Plant Pathology**, 109, 153–164.

Gobbin, D., Pertot, I., Gessler, C., (2003b). Genetic Structure of a *Plasmopara viticola* population in an isolated Italian mountain vineyard. **Journal Phytopathology**, 151, 636–646.

Gómez-Zeledón J.G., Becker, S., Spring, O. (2014). Analysis of putative effectors in grapevine downy mildew strains of different virulence. **In: Proceedings of the 7th International Workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildew.**

Gómez-Zeledón, J., Kaiser, M., Spring, O. (2015) Effector gene expression in *Plasmopara viticola* strains with different virulence against a tolerant host. **In: Proceedings of the 36th New Phytologist Symposium/Cell biology at the plantmicrobe interface.**

Heraudet, V., L. L. Salvaudon, Shykoff, J.A. (2008). Trade-off between latent period and transmission success of a plant pathogen revealed by p henotypic correlations. **Evolutionary Ecology Research** 10:913–924.

Iacono, G., Bosch, F., Paveley N. (2012). The evolution of plant pathogens in response to host resistance: factors affecting the gain from deployment of qualitative and quantitative resistance. **Journal of Theoretical Biology** 304:152–163.

- Kast, W. (2001) Inter-isolate variation of virulence of *Plasmopara viticola* on resistant vine varieties. **In:** Proceedings of the IOBC / WPRS Working Group.
- Koopman, T.; Linde, C.C.; Fourie, P.H. & Mcleod, A. (2007). Population genetic structure of *Plasmopara viticola* in the Western Cape Province of South Africa. **Molecular Plant Pathology** 8:723-736.
- Kortekamp A, Zyprian E (2003). Characterization of Plasmopara-resistance in grapevine using in vitro plants. **Journal of Plant Physiology**,160:1393-1400.
- Kortekamp, A., Wind, R., Zyprian, E., (1998). Investigation of the interaction of *Plasmopara viticola* with susceptible and resistant grapevine varieties. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 105, 475e488.
- Kranz, J. (2003). Comparative Epidemiology of Plant Diseases. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New-York.
- Lannou, C. (2012). Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. **Phytopathology**, 50:319–338.
- Madden, L.V., Hughes, G., and van den Bosch, F. (2007). The Study of Plant Disease Epidemics. **The American Phytopathological Society**, APS Press St. Paul, Minnesota.
- Malacarne, G.; Vrhovsek, U.; Zulini, L.; Cestaro, A.; Stefanini, M.; Mattivi, F.; Delledonne, M.; Velasco, R.; Moser, C. (2011). Resistance to *Plasmopara viticola* in a grapevine segregating population is associated with stilbenoid accumulation and with specific host transcriptional responses. **BMC Plant Biology**, 11:114.
- Merdinoglu D, Wiedemann-Merdinoglu S, Coste P, Dumas V, Haetty S, et al. (2003). Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. **Acta Horticulturae**, 603: 451-456.
- Millardet, A. (1881). Notes sur les vignes am_ericaines et opuscles divers sur le même sujet. F_eret and Fils, Bordeaux.

Moreira FM, Madini A, Marino R, Zulini L, Stefanini M, et al. (2011) Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (*Vitis* spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. **Tree Genetics and Genomes**, 7:153-167.

OIV – Organization Internationale de la Vigne et du Vin. (2009) **Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis** (OIV, Paris, 504).

Oksanen, J., Guillaume Blanchet, F., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solyoms, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H. (2017). **Vegan: 3Community Ecology Package**. R package version 2.4-2.

Pariaud B, Ravigné V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, et al. (2009) Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. **Plant Pathology** 58: 409-424

Pariaud, B., Berg, F., Bosch, F., Powers, S., Kaltz, O., Lannou, C. (2013). Shared influence of pathogen and host genetics on a trade-off between latent period and spore production capacity in the wheat pathogen, *Puccinia triticina*. **Evolutionary Applications** 6:303–312.

Peressotti, E., Wiedemann-Merdinoglu, S., Delmotte, F., Bellin, D., Di Gaspero, G., Testolin, R., et al. (2010). Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. **BMC Plant Biology** 10:147. doi: 10.1186/1471-2229-10-147

Peressotti, E., Duchene, E., Merdinoglu, D., Mestre, P. (2011). A semiautomatic non-destructive method to quantify grapevine downy mildew sporulation. **Journal of Microbiological Methods** 84:265–271.

Polesani, M., Bortesi, L., Ferrarini, A., Zamboni, A., Fasoli, M., Zadra, C., Lovato, A., Pezzotti, M., Delledonne, M., Polverari, A. (2010). General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. **BMC Genomics** 11, 117.

R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. **In: R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

- Rouxel, M., D. Papura, M. Nogueira, V. Machefer, D. Dezette, S. Richard-Cervera, S. Carrere et al. (2012). Microsatellite markers for characterization of native and introduced populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. **Applied and Environmental Microbiology** 78:6337–6340.
- Rumbou, A. and Gessler, C. (2006). Particular structure of *Plasmopara viticola* populations evolved under Greek island conditions. **Phytopathology**, 96, 501–509.
- Rumbou, A., Gessler, C. (2007). Greek epidemics of grapevine downy mildew are driven by local oosporic inoculum: a population biology approach. **J Biol Res** 7, 3–18.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.M., Willits, M.G., Molina, Steiner, A. H., Hunt, M.O. (1996). Systemic acquired resistance, **Plant Cell** 8, 1809e1819
- Scherer, E., Gisi, U. (2006). Characterization of genotype and mating type in European isolates of *Plasmopara viticola*. **J Phytopathol** 154: 489-495.
- Stark-Urnau, M., Seidel, M., Kast, W.K., Gemmrich, A.R. (2000). Studies on the genetic diversity of primary and secondary infections of *Plasmopara viticola* using RAPD/PCR. **Vitis** 39, 163–166.
- Staudt, G., Kassemeyer, H. (1995). Evaluation of downy mildew resistance in various accessions of wild *Vitis* species. **Vitis** 34: 225-228.
- Töpfer, R., Hausmann, L. and Eibach, R. (2011). Molecular breeding. In: Genetics, Genomics and Breeding of Grapes (Adam-Blondon, A.F., Martinez-Zapater, J.M. and Kole, C., eds), pp. 160–185. Enfield: Science Publishers
- Unger S, Büche C, Boso S, Kassemeyer, H.H. (2007). The course of colonization of two different *vitis* genotypes by *Plasmopara viticola* indicates compatible and incompatible host-pathogen interactions. **Phytopathology** 97: 780-786.

Viennot-Bourgin, G. (1949). *Les Champignons Parasites des Plantes Cultivées*. Librairies de l'Académie de Médecine, Paris.

Young, N. D.; (1996). QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology*, 34, 479-501.

Yu, X., Tang, J., Wang, Q., Ye, W., Tao, K., Duan, S., et al. (2012). The RxLR effector Avh 241 from *Phytophthora sojae* requires plasma membrane localization to induce plant cell death. *New Phytologist*, 196, 247–260.

Zyprian, E., Simon, S., Moreno-Sanz, P., Grando, M.S., Moser, T., Fechter, I., Schwander, F., Bonow-Rex, M., Rex, F., Eibach, R. and Töpfer, R. (2015). QTL Analysis of Pathogen Resistance Factors and Ripening Time Traits in a Genetic Map from Grapevine Breeding Line Gf.GA-47-42 Crossed to 'Villard Blanc' in XIth Int. Conf. on Grapevine Breeding and Genetics. *Acta Horticulturae*. 1082, ISHS 2015.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A piramidação dos loci de resistência ao míldio é essencial para controlar o progresso da doença nas condições ambientais do sul do Brasil. A caracterização molecular do patógeno em diferentes regiões vitícolas bem como o acompanhamento da interação patógeno-hospedeiro, são informações essenciais para os programas de melhoramento genético de videira a fim de traçar diferentes estratégias de cruzamento e piramidação de genes para o desenvolvimento de variedades com resistência durável ao longo dos anos.

Embora numerosos estudos tenham sido conduzidos sobre a interação entre as espécies *Plasmopora viticola* e *Vitis* nos últimos anos, muitas questões ainda permanecem sem resposta. Quais fatores são capazes de dificultar o crescimento das hifas em espécies resistentes? Como os genes resistentes exercem sua atividade? É apenas um gene ou a combinação deles que confere a resistência? Quais fatores permitem que *Plasmopora viticola* supere a reação de defesa das variedades resistentes? Quantas raças do patógeno existem no Brasil e qual o grau de resistência das variedades brasileiras?

Este trabalho poderá auxiliar nos demais estudos sobre este patógeno e seu efeito sobre genótipos considerados resistentes nos programas de melhoramento genético de videira brasileiros.

REFERÊNCIAS

- ADAM-BLONDON, A.F., ROUX, C., CLAUX, D., BUTTERLIN, G., MERDINOGLU, D., THIS P. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. **Theoretical and Applied Genetics**, 109: 1017–1027. 2004.
- AGRIOS, G.N. 2005. **Plant Pathology**. 5th ed. Elsevier Academic Press. San Diego.
- AKKURT M., WELTER, L., MAUL, E., TOPFER, R., ZYPRIAN, E. Development of SCAR markers linked to powdery mildew (*Uncinula necator*) resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L. and *Vitis* sp.). *Molecular Breeding* 19, 103–11, 2007.
- ALLEWELDT, G., POSSINGHAM, J. V. Progress in grapevine breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, 75: 669-673. 1988.
- ALZATE-MARIN, A.L., CERVIGNI, G.D.L., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. **Fitopatologia Brasileira**, 30(4): 333-342. 2005.
- AZOFEIFA-DELGADO, Á. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. **Agronomía Mesoamericana**, 17(2): 221-242. 2006.
- BARKER, C.L., DONALD, T., PAUQUET, J., RATNAPARKHE, A., BOUQUET, A., ADAM-BLONDON, A.F., THOMAS, M.R., DRY, I. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. **Theoretical and Applied Genetics**, 111:370–377. 2005.
- BEDENDO, I.P. 2011. Míldios. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. & BERGAMIN FILHO (Eds.). Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. 4ª Ed. Agronômica Ceres. Piracicaba. p.467-471.
- BELLIN, D., PERESSOTTI, E., MERDINOGLU, D., WIEDEMANN-MERDINOGLU, S., ADAM-BLONDON, A.F., CIPRIANI, G., MORGANTE, M., TESTOLIN, R., DI GASPERO, G. Resistance to

Plasmopara viticola in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localized necrosis at the infection site. **Theoretical and Applied Genetics**, 120:163–176. 2009

BERED, F., NETO, J.F.B., CARVALHO, F.I.F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, 27(2): 513-520. 1997

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

BONNETT, D.G., REBETZKE, G.J, SPIELMEYER, W. Strategies for efficient implementation of molecular markers in wheat breeding. **Molecular Breeding**, 15:75–85, 2005.

BORGHEZAN, M.; GAVIOLI, O.; PIT, F. A.; SILVA, A. L. Comportamento vegetativo e produtivo da videira e composição da uva em São Joaquim, Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 398-405, 2011.

BOSO, S. & KASSEMAYER, H.H. Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew. **Vitis** 47:39-49, 2008.

BRIGHENTI, E.; TONIETTO, J. O clima de São Joaquim para a viticultura de vinhos finos: Classificação pelo sistema CCM Geovitícola. **In: XVIII Congresso Brasileiro de Fruticultura**. Anais. CD-ROM. Florianópolis, 4p. 2004.

BRIGHENTI, A.F.; BRUGHENTI, E.; BONIN, V.; RUFATO, L. Caracterização fenológica e exigência térmica de diferentes variedades de uvas viníferas em São Joaquim, Santa Catarina – Brasil. **Ciência Rural**, v.43, n.7, jul, 2013.

BRIGHENTI, A.F.; DA SILVA, A.L.; BRIGHENTI, E.; PORRO, D.; STEFANINI, M. Desempenho de variedades autóctones italianas em condições de elevada altitude no Sul do Brasil. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.49, n.6, p.465-474, jun. 2014.

BRIGHENTI, A.F.; MALINOVSKI, L.I.; STEFANINI, A.; VIEIRA, H.J.; SILVA, A.L. Comparação entre as regiões vitícolas de São Joaquim-SC, Brasil e SAN Michele all'Adige- TN, Itália. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 37, n. 2, p. 281-288, Junho 2015.

BROWN, J.K. Durable Resistance of Crops to Disease: A Darwinian Perspective. **Annual Review of Phytopathology**, Vol.53:1-634, 2015.

BURDON, J.J., BARRET, L.G., REBETZKE, G., THRALL, P.H. Guiding deployment of resistance in cereals using evolutionary principles. Evolutionary applications, Vol. 7:6. 2014.

BURIN, V. M.; SILVA, A. L.; MALINOVSKI, L.I.; ROSIER, J. P.; FALCÃO, L. D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Characterization and multivariate classification of grapes and wines of two Cabernet Sauvignon clones. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 474-481, 2011

CADLE-DAVIDSON, L. Variation within and between Vitisspp. for foliar resistance to the downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. Plant Disease Journal, 92:1577-1584. 2008.

CAFFI, T., ROSSI, V., AND BUGIANI, R. Evaluation of a warning system for controlling primary infections of grapevine downy mildew. **Plant Disease Journal**, 94:709-716. 2010.

CALIARI, V. Uva e Vinho. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2015-2016. Disponível em: http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/publicacoes/Sintese_2016.pdf. Acesso em: 10 jan. 2017.

CAMARGO, U.A., RITSCHER, P.S. New table and wine grape cultivars: world scenario with emphasis on Brazil. **Acta Horticulturae**, The Hague, n.785, p.89-95, 2008.

CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p. 144-149, 2011

CARANTA, C., THABUIS, A., PALLOIX, A. Development of a CAPS marker for the *Pvr4* locus: A tool for pyramiding potyvirus resistance genes in pepper. **Genome**, 42: 1111–1116. 1999

CARCAMO, C., PROVEDO, I., ARROYO-GARCÍA, R. Detection of polymorphism in ancient Tempranillo clones (*Vitis vinifera* L.) using microsatellite and retrotransposon markers. **Iranian journal of biotechnology**, 8 (1): 1-6. 2010.

CASAGRANDE, K., FALGINELLA, L., CASTELLARIN, S.D., TESTOLIN, R., DI GASPERO, G. Defence responses in Rpv3-dependent resistance to grapevine downy mildew. **Planta**, 234:1097–1109. 2011.

CHAVARRIA, G., SANTOS, H.P. Manejo de videiras sob cultivo protegido. **Ciência Rural**, 39(6): 1917-1924. 2009.

CHAVARRIA, G.; SANTOS, H.P.; SÔNEGO, O.R.; MARODIN, G.A.B.; BERGAMASCHI, H.; CARDOSO, L.S. Incidência de doenças e necessidade de controle em cultivo protegido de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n.3, p.477-482, 2007.

COLLARD, B.C.Y., JAHUFER, M.Z.Z., BROUWER, J.B., PANG E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, 142: 169–196. 2005.

CRUZ, M. Oídio de la vid. Pp. 361-380. Em: Stadnik, M. J. e Rivera, M.(Edts). **Oídios**, 2001.

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

CSIZMAZIA, J., BEREZNAI, L. A szőlő Plasmopara viticola és a *Viteus vitifolii elleni* rezisztencia nemesítés eredményei. Orsz Szőlő Bor Kut Int E ´vko´nyve, Budapest:191–200, 1968.

DEKKERS, J.C.M., HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nature Reviews Genetics**, 3:22–32, 2002.

DELMOTTE, F., CHEN, W.J., RICHARD-CERVERA, S., GREIF, C., PAPURA, D., GRESSE, X., MONDOR-GENSON, G., CORIO-COSTET, M.F. (2006). Microsatellite DNA markers for *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew of grapes. **Molecular Ecology Notes**, 136, 363–371.

DI GASPERO, G., CIPRIANI, G., MARRAZZO, M.T., ANDREETTA, D., PRADO-CASTRO M.J., PETERLUNGER, E., TESTOLIN, R. Isolation of (AC)_n-microsatellites in *Vitis vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection. **Molecular Breeding**, 15:11–20. 2005.

DI GASPERO, G., CATTONARO, F. Application of genomics to grapevine improvement. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, 16: 122–130. 2010.

DI GASPERO, G., COPETTI, D., COLEMAN, C., CASTELLARIN, S.D., EIBACH, R., KOZMA, P. Selective sweep at the Rpv3 locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, 124, 277–286, 2012.

DOLIGEZ, A., ADAM-BLONDON, A.F., CIPRIANI, G., DI GASPERO, G., LAUCOU, V., MERDINOGLU, D., MEREDITH, C.P., RIAZ, S., ROUX, C., THIS, P. An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. **Theoretical and Applied Genetics**, 113:369–382. 2006.

DUBCOVSKY, J. Marker-assisted selection in public breeding programs: the wheat experience. **Crop Science**, 44:1895–1898, 2004.

EAGLES, H.A., BARIANA, H.S., OGBONNAYA, F.C., REBERTZKE, G.J., HOLLAMBY, G.J., HENRY, R.J., HENSCHKE, P.H., CARTER, M. Implementation of markers in Australian wheat breeding. **Australian Journal of Agricultural Research**, 52:1349–1356, 2001.

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

ELLIS, J., LAGUDAH, E., SPIELMEYER, W., DODDS, P. The past, present and future of breeding rust resistant wheat. **Frontiers Plant Science**, 5:641, 2014.

EMBRAPA. Embrapa Uva e Vinho, Sistema de Produção: Uvas viníferas para processamento em regiões de Clima Temperado, 2012. Disponível em:
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/tabclima.htm>.> Acesso em: 10 jan. 2016.

FALCÃO, L.D.; REVEL, G.; PERELLO, M.C. et al. Survey of Seasonal Temperatures and Vineyard Altitude Influences on 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine, C13-Norisoprenoids, and the Sensory Profile of Brazilian Cabernet Sauvignon Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.3605-3612, 2007.

FALCONER, D.S., MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**, 4th edn. Longman, Essex, 1996.

FALEIRO, F. Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FERREIRA, C.F., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., NIETSCHKE, S., JÚNIOR, T.J.P., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência à raça 63.39 DA mancha-angular do feijoeiro. **Bragantia**, 58(2): 247-252. 1999.

FISCHER, B.M., SALAKHUTDINOV, I., AKKURT, M., EIBACH, R., EDWARDS, K.J., TÖPFER, R., ZYPRIAN E.M. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. **Theoretical and Applied Genetics**, 108: 501–515. 2004.

FRANCIA, E., TACCONI, G., CROSATTI, C., BARABASCHI, D., BULGARELLI, D., DALL'AGLIO, E., VALE, G. Marker assisted selection in crop plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 82: 317–342. 2005.

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

GARZÓN, L.N.; BLAIR, M.W.; LIGARRETO, G.A. Uso de selección asistida con marcadores para resistencia a antracnosis en frijol común. **Agronomía Colombiana**, 25 (2): 207-214. 2007.

GENTA, W., TESSMANN, D.J., ROBERTO, S.R., VIDA, J.B., COLOMBO, L. A., SCAPIN, C.R., RICCE, W.S., CLOVIS, L.R. Manejo de mildio no cultivo protegido de videira de mesa 'BRS Clara'. **Pesquisa agropecuária brasileira**, 45(12): 1388-1395. 2010.

GESSLER, C., PERTOT, I., PERAZZOLLI, M. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. **Phytopathologia Mediterranea**, 50, 3–44, 2011,

GILL-LANGARICA, H.R.;MAYEK-PÉREZ, N. Los marcadores moleculares en el mejoramiento genético de la resistencia a enfermedades del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): aplicaciones y perspectivas. **Revista Mexicana de Fitopatología**, 26 (2):164-179. 2008.

GINDRO, K, PEZET, R., VIRET, O. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. **Plant Physiology Biochemistry**, 41:846–853, 2003.

GINDRO, K., SPRING, J.L, PEZET, R. Histological and biochemical criteria for objective and early selection of grapevine cultivars resistant to *Plasmopara viticola*. **Vitis** 45:191–196, 2006.

GINDRO, K., ALONSO-VILLAVERDE, V., VOINESCO, F., SPRING, G.L., VIRET, O., DUBUIS, P.H. Susceptibility to downy mildew in grape clusters: New microscopical and biochemical insights. **Plant Physiology and Biochemistry**, 52,140-146, 2012.

GIOVANNINI, E. Fitossanidade: pragas. In: GIOVANNINI, E. Uva agroecológica. Porto Alegre: Renascença, 2001. 136 p.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-test cross mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, **Pittsburgh**, n. 137, p. 1121-1137, 1994.

GÓMEZ-ZELEDON, J., KAISER, M., SPRING, O. An Extended Leaf Disc Test for Virulence Assessment in *Plasmopara viticola* and Detection of Downy Mildew Resistance in *Vitis*. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, 7:15, 2016.

GUPTA, P., KUMAR, J., MIR, R., AND KUMAR, A. Marker-assisted selection as a component of conventional plant breeding. **Plant Breeding Review**, 33, 145–217, 2010.

HAMADA, E., GHINI, R., ROSSI P., ; JÚNIOR M.J.P., FERNANDES, J.L. Climatic risk of grape downy mildew (*Plasmopara viticola*) for the state of São Paulo, Brazil. **Scientia Agricola**, 65: 60-64. 2008.

HITTALMANI, S., PARCO, A., MEW, T.V., ZEIGLER, R.S., HUANG, N. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, 100:1121–1128. 2000.

IBRAVIN – Instituto Brasileiro do Vinho. Disponível em: <http://www.ibravin.org.br>. Acesso em: 25 Janeiro. 2014.

JOSHI, R.K., NAYAK, S. Gene pyramiding-A broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crops. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, 5(3): 51-60. 2010.

JÜRGES, G.; KASSEMAYER, H.H.; DURRENBERGER, M.; DUGGELIN, M. & NICK, P. 2009. The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. **Plant Biology**, 11:886-898.

KELLY, J.D.; AFANADOR, L.; HALEY, S.D. Pyramiding genes for resistance to bean common mosaic virus. **Euphytica**, 82:207-212.1995

KELLY, J., AFANADOR, L., HALEY, S., MIKLAS, P. Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento del frijol. **Agronomía Mesoamericana**, 5: 1-7. 1994.

KENNELLY, M.M.; GADOURY, D.M.; WILCOX, W.F.; MAGAREY, P.A. & SEEM, R.C. 2007. Primary infection, lesion productivity, and

survival of sporangia in the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. **Phytopathology**, 97:512-522.

KHIAVI, H.K., SHIKHLINSKIY, H., AHARI, A.B., AKRAMI, M. Evaluation of different grape varieties for resistance to powdery mildew caused by *Uncinula necator*. **African Journal of Agricultural Research**, 7(29): 4182-4186. 2012.

KIEFER, B.; RIEMANN, M. & BUCHE, C. 2002. The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. **Planta**, 215:387-393.

KORTEKAMP, A.; WIND, R.; ZYPRIAN, E. 1998. Investigation of the interaction of *Plasmopara viticola* with susceptible and resistant grapevine cultivars. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 105:475-488.

KORTEKAMP, A., WELTER, L., VOGT, S., KNOLL, A., SCHWANDER, F., TÖPFER, R., ZYPRIAN, E. Identification, isolation and characterization of a CC-NBS-LRR candidate disease resistance gene family in grapevine. **Molecular Breeding**, 22(3): 421-432. 2008.

LEÃO, P.C.S., BRANDÃO, E.O., GONÇALVES, N.P.S. Caracterização agrônômica e molecular do clone Itália Muscat no submédio do vale do São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 33 (1): 297-302. 2011.

LEAO, P. C. de S.; BORGES, R. M. E. **Melhoramento genético da videira**. Documentos online 224. Petrolina: EMBRAPA Seminário. 61p. 2009

LENZI, L., CARUSO, C., BIANCHEDI, P.L., PERTOT, I., PERAZZOLLI, M. Laser microdissection of grapevine leaves reveals site-specific regulation of transcriptional response to *Plasmopara viticola*. *Plant Cell Physiology Journal*. 57, 69–81, 2016.

LESTER, E. Objectives and perspectives in plant disease control. **Plant Pathology**, n. 1, p. 3-14, 1984.

LIMA, M.F.; LOPES, D.B.; TAVARES, S.C.C.H.; TESSMANN, D.J. & MELO, N.F. 2009. Doenças e alternativas de controle. *In*: SOARES,

J.M. & LEÃO, P.C.S. (Eds.). A vitivinicultura no semiárido brasileiro. **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília DF. p. 541-596.

LIU, J., LIU, D., TAO, W., LI, W., WANG, S., CHEN, P., CHENG, S.,GAO, D. Molecular marker facilitated pyramiding of different genes for powdery mildew resistance in wheat. **Plant Breeding**, 119, 21-24. 20004

LUSSER,M.,PARISI,C.,PLAN,D.,AND RODRÍGUEZ-CEREZO,E. Deployment of new biotechnologies in plant breeding. **Nature Biotechnology**, 30, 231–239. 2012.

MALINOVSKI, L. I; WELTER, L. J.; BRIGHENTI, A. F.; VIEIRA, H. J; GUERRA, M. P.; DA SILVA, A, L. Highlands of Santa Catarina/Brazil: A region with high potential for wine production. **ISHS. Acta Horticulturae**, v. 931, p.433-440, 2012.

MAPHOSA M., TALWANA H. AND TUKAMUHABWA P. Enhancing soybean rust resistance through Rpp2, Rpp3 and Rpp4 pair wise gene pyramiding. **African Journal of Agricultural Research**, 7(30): 4271-4277. 2012.

MARTÍNEZ, L., CAVAGNARO, P., MASUELLI, R. Caracterización molecular de variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) de calidad enológica por marcadores microssatélites. **Revista de Facultad de Ciencias Agrarias**, UNCuyo 38(1): 77-86. 2006.

MARTÍNEZ, L.E., CAVAGNARO, P.F., MASUELLI, R.W., ZÚÑIGA, M. SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties. **Plant Science**, 170: 1036–1044. 2006a.

MATASCI, C.L., GOBBIN D., SCHÄRER, H.J., TAMM L., GESSLER, C. Selection for fungicide resistance throughout a growing season in populations of *Plasmopara viticola*. **European Journal of Plant Pathology**, 120:79–83. 2008.

McDONALD,B.A. Using dynamic diversity to achieve durable disease resistance in agricultural ecosystems. **Tropical Plant Pathology**, 39, 191–196. 2014.

- MELLO, L.M.R. 2013. Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2012. Bento Gonçalves RS. Embrapa Uva e Vinho. **Comunicado Técnico** 137.
- MELLO, L.M.R. *Panorama da Vitivinicultura brasileira*. 2014. Bento Gonçalves RS. Embrapa Uva e Vinho. **Comunicado Técnico** 175.
- MERDINOGLU, D., BUTTERLIN, G., BEVILACQUA, L., CHIQUET, V., ADAM-BLONDON, A.F., AND DECROOCQ, S. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. **Molecular Breeding**, 15: 349–366. 2005.
- MICHELMORE, R.W., CHRISTOPOULOU, M., CALDWELL, K.S. Impacts of resistance gene genetics, function, and evolution on a durable future. **Annual Review Phytopathology**, 51, 291–319. 2013.
- MILACH, S.C.K., CRUZ, R.P. Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais. **Ciência Rural**, 27(4): 685-689. 1997.
- MIN, J., CHUNYU, Z. KHALID, H. NAN, L., QUAN, S., QING, M., SUWEN, W., FENG, L. Pyramiding resistance genes to northern leaf blight and head smut in maize. **International journal of agriculture & biology**, 14: 430–434. 2012.
- MUNDT, C.C. Durable resistance: a key to sustainable management of pathogens and pests.** *Infection, Genetics and Evolution*, **27**, 446–455, 2014.
- MUNIZ, J.N., SIMON, S., BRIGHENTI, A.F., MALINOVSKI, L.I., PANCERI, C.P., VANDERLINDE, G., WELTER, J., DAL ZOTTO, D., SILVA, A.L. Viticultural performance of Merlot and Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*s) cultivated in high altitude regions of southern Brazil. **Journal of Life Sciences**, 9, 399-410, 2015.
- NASCIMENTO-GAVIOLI, M.C.A., TENFEN-AGAPITO, S.Z., NODARI, R.O., WELTER, L.J., SANCHEZ MORA, F.D., SAIFERT, L., SILVA, A.L., GUERRA, M.P. Proteome of *Plasmopara viticola*-infected *Vitis vinifera* provides insights into grapevine Rpv1/Rpv3 pyramided resistance to downy mildew. **Journal of Proteomics**, 151, 264–274, 2017.

NELSON, R.R. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. **Ann. Rev. Phytopathol** 16:359-378. 1978.

OCHSSNER, I., HAUSMANN, L. TÖPFER, R. Rpv14, a new genetic source for *Plasmopara viticola* resistance conferred by *Vitis cinérea*. **Vitis**, 55, 79–81, 2016.

OLIVEIRA P.R.D., SCOTTON, D.C., NISHIMURA, D.S., FIGUEIRA, A. Análise da diversidade genética por AFLP e identificação de marcadores associados à resistência a doenças em videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 27(3): 454-457. 2005.

OLIVEIRA, E.J., PÁDUA, J.G., ZUCCHI, M.I., VENCOVSKY, R., VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, 29 (2): 294-307. 2006.

OLMO, H. P. The potential role of (*vinifera x rotundifolia*) hybrids in grape variety improvement. **Experientia**, 42: 921-926. 1986.

PARLEVLLET, J.E. “Identification and evaluation of quantitative resistance,” in **Plant Disease Epidemiology–Genetics, Resistance and Management**, 215–248. 1989.

PATERSON, A.H., TANKSLEY, S.D., SORRELLS, M.E. DNA markers in plant improvement. **Advances in Agronomy**, 46:39–90, 1991.

PAUQUET, J., BOUQUET, A., THIS, P., ADAM-BLONDON, A. F. Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene Run1 in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics**, 103: 1201-1210. 2001.

PEDERSEN, W. L., LEATH, S. Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. **Annual Review of Phytopathology**, 26:369-378, 1988.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L., MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences Journal**, 4, 439-473.2007

PERESSOTTI, E., WIEDEMANN-MERDINOGLU, S., DELMOTTE, F., BELLIN, D., DI GASPERO, G., TESTOLIN, R. Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. **BMC Plant Biology** 10:147, 2010.

PERUCH, L.A.M., BRUNA E.D. Relação entre doses de calda bordalesa e de fosfito potássico na intensidade do míldio e na produtividade da videira cv. 'Goethe'. **Ciência Rural**, 38(9): 2413-1418. 2008.

PEZET R, GINDRO K, VIRET, O., SPRING, J.L. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. **Physiological and Molecular Plant Pathology** P 65:297–303, 2004.

FERRI, C. P.; POMMER, C. V. Quarenta e oito anos de melhoramento da videira em São Paulo, Brasil. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 52, n. 1, p. 107-122, 1995.

POLESANI, M., DESARIO, F., FERRARINI, A., ZAMBONI, A., PEZZOTTI, M., KORTEKAMP, A. cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. **BMC Genomics** 9:142, 2008.

POLESANI, M., BORTESI, L., FERRARINI, A., ZAMBONI, A., FASOLI, M., ZADRA, C., LOVATO, A., PEZZOTTI, M., DELLEDONNE, M., POLVERARI, A. General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. **BMC Genomics** 11, 117, 2010.

POMMER, C. V.; TERRA, M. M., PIRES, E. J. P. Cultivares, melhoramento e fisiologia. In: POMMER, C. V. (Ed.). Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p. 109-319.

PORTER, D.R., BURD, J.D., SHUFRAN, K.A., WEBSTER, J.A. Efficacy of Pyramiding Greenbug (Homoptera: Aphididae) Resistance Genes in Wheat. **Journal of Economic Entomology**, 93(4):1315-1318. 2000.

RAGAGNIN, V.A., ALZATE-MARIN, A.L., SOUZA, T.L.P.O., ARRUDA, K.M.A., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro ao *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, 28: 591-596. 2003.

RAMMING, D. W., GABLER, F., SMILANICK, J., CADLE-DAVIDSON, M., BARBA, P., MAHANIL, S., CADLE-DAVIDSON, L. A single dominant locus, Ren4, confers rapid non-race-specific resistance to grapevine powdery mildew. **Phytopathology**, 101:502-508. 2011.

REISCH, B.I. & PRATT, C. 1996. Grapes. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). Fruit breeding: vine and small fruits. New York: John Wiley 2:297-370.

REX CONSORTIUM. MINI REVIEW Combining selective pressures to enhance the durability of disease resistance genes REX Consortium. **Frontiers in Plant Science**, 7:1916. 2016

REYNIER, A. Manual de Viticultura. Mundi-Prensa. 5ta ED. Bilbao, España. 1995, 407 p.

RIAZ, S., DANGL, G.S., EDWARDS, K.J., MEREDITH, C.P. A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**, 108:864–872. 2004.

ROBBINS, M.D., CASLER, M.D., STAUB, J.E. Pyramiding QTL for multiple lateral branching in cucumber using inbred backcross lines. **Molecular Breeding**, 22:131–139. 2008.

ROSSBERG, D. Surveys on the use of pesticides in practice in 2011. **Journal für Kult** 65: 141-151, 2013.

SACCO, A., DI MATTEO, A., LOMBARDI, N., TROTTA, N., PUNZO, B., MARI, A., BARONE, A. Quantitative trait loci pyramiding for fruit quality traits in tomato. **Mol Breeding**, 31:217–222. 2013.

SANTOS-NETO, J.R.A. Melhoramento da videira. **Bragantia**, 14(23): 237-267. 1955.

SCHUCK, M.R.; MOREIRA, F.M.; GUERRA, M.P.; VOLTOLINI, J.A.; GRANDO, M.S.; SILVA, A.L. Molecular characterization of grapevine from Santa Catarina, Brazil, using microsatellite markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 44(5): 487-495. 2009.

SCHUCK, M.R., MOREIRA, F.M., VOLTOLINI, J.A., GUERRA, M.P., RANDO, M.S., SILVA, A.L. Identificação molecular da uva 'goethe' de Urussanga-SC por marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 32 (3): 825-831. 2010.

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

SEFC, K.M., LOPES, M.S., LEFORT, F., BOTTA, R., ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A., IBÁÑEZ, J., PEJIC, I., WAGNER, H.W., GLÖSSL, J., STEINKELLNER, H. Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, 100:498–505. 2000.

SHI, A., CHEN, P., LI, D., ZHENG, C., ZHANG, B., HOU, A. Pyramiding multiple genes for resistance to soybean mosaic virus in soybean using molecular markers. **Molecular breeding**, 23:1. 2009.

SHIMANO I.S.H., SENTELHAS, P.C. Risco climático para ocorrência de doenças fúngicas da videira no Sul e Sudeste do Brasil. **Revista Ciência Agronômica** 44(3): 527-537. 2013.

SINGH, R.P., HODSON, D.P., HUERTA-ESPINO, J., JIN, Y., BHAVANI, S., NJAU, P. The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. **Annual Review of Phytopathology**, 49, 465–481, 2011.

SOUZA, J. S. I. **Uvas para o Brasil**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1996. 791p.

TAPIERO, A.L.; ARISTIZÁBAL, D.; LEVY, M. Exclución de linajes como estrategia para la obtención de resistencia durable en el arroz a Pyricularia grisea Sacc. en Colombia.

Revista Corpoica, 4(1): 15-28.2003.

TARANA, B.; BUCHWALDT, L.; TULLU, A.; BANNIZA, S.; WARKENTIN, T.D.; VANDENBERG, G. A. Using molecular markers to pyramid genes for resistance to ascochyta blight and anthracnose in lentil (*Lens culinaris* Medik). **Euphytica**, 134: 223 – 230. 2003.

TERRAL, J.F.; TABARD, E.; BOUBY, L.; IVORRA, S.; PASTOR, T.; FIGUEIRAL, I.; PICQ, S.; CHEVANCE, J.B.; JUNG, C.; FABRE, L.; TARDY, C.; COMPAN, M.; BACILIERI, R.; LACOMBE, T.; THIS, P. Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. **Annals of Botany**. 105: 443 – 455. 2010.

TEIXEIRA, A.H.C.; SOUZA, R.A.; RIBEIRO, P.H.B.; REIS, V.C.S.; SANTOS M.G.L. Aptidão agroclimática da cultura da videira no Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** 6(1): 107-111. 2002.

THIS, P.; JUNG, A.; BOCCACCI, P.; BORREGO, J.; BOTTA, R.; COSTANTINI, L.; CRESPIAN, M.; DANGL, G.S.; EISENHELD, C.; FERREIRA-MONTEIRO, F.; GRANDO, S.; IBÁÑEZ, J.; LACOMBE, T.; LAUCOU, V.; MAGALHÃES, R.; MEREDITH, C.P.; MILANI, N.; PETERLUNGER, E.; REGNER, F.; ZULINI, L.; MAUL, E. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, 109: 1448–1458. 2004

THIS, P., LACOMBE, T., THOMAS, M.R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. **TRENDS in Genetics**, 22(9): 511-519. 2006.

TROGGIO, M., MALACARNE, G., COPPOLA, G., SEGALA, C., CARTWRIGHT, D.A., PINDO, M., STEFANINI, M., MANK, R., MOROLDO, M., MORGANTE, M., GRANDO, M.S. VELASCO, R. A Dense Single-Nucleotide Polymorphism-Based Genetic Linkage Map of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Anchoring Pinot Noir Bacterial Artificial Chromosome Contigs. **Genetics**, 176: 2637–2650. 2007.

TWARDOWSKA, M., MASOJC, P., MILCZARSKI, P. Pyramiding genes affecting sprouting resistance in Rye by means of marker assisted selection. **Euphytica**, 143: 257–260. 2005.

VENUTI S, COPETTI D, FORIA S, FALGINELLA L, HOFFMANN S, BELLIN, D., CINDRIC, P., KOZMA, P., SCALABRIN, S., MORGANTE, M., TESTOLIN, R., DI GASPERO G. Historical introgression of the downy mildew resistance gene Rpv12 from the asian species *Vitis amurensis* into grapevine varieties. **PLoS ONE**, 8(4): e61228. doi:10.1371/journal.pone.0061228. 2013.

VIGNANI, R., BOWERS, J.E., MEREDITH, C. P. Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of *Vitis vinifera* ‘Sangiovese’. **Scientia Horticulturae**, 65:163- 169. 1996.

VU, Q., QUINTANA,R., FUJITA,D., BERNAL,C.C., YASUI,H., MEDINA,C.D., Responses and adaptation by *Nephotettix virescens* to monogenicand pyramided ricelines with Grh-resistance genes. Entomologia Experimentalis et Applicata **150, 179–190, 2014.**

WANG, J., CHAPMAN, S.C., BONNETT, D.G., REBETZKE, G.J., CROUCH, J. Application of population genetic theory and simulation models to efficiently pyramid multiple genes via marker-assisted selection. **Crop Science**, 47:580–588, 2007.

WANG, J., CHAPMAN, S.C., BONNETT, D.G., REBETZKE, G.J. Simultaneous selection of major and minor genes: use of QTL to increase selection efficiency of coleoptile length of wheat (*Triticum aestivum* L.) **Theoretical Applied Genetics**, 119:65–74, 2009.

WANG,Y., CHENG,X., SHAN,Q., ZHANG,Y., LIU,J., GAO,C., Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. **Nature Biotechnology**, 32, 947–951, 2014.

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

WIEDEMANN-MERDINOGLU S., PRADO E., COSTE P., DUMAS V., BUTTERLIN G., BOUQUET A., MERDINOGLU D. 2006. Genetic Analysis of Resistance to Downy Mildew from *Muscadinia rotundifolia*. **9th International Conference on Grapevine Breeding and Genetics**, Udine, Italy.

WINKLER, A. J. **Viticultura**. 6ed. México: Compañía Editorial Continental, Tradução por Guillermo A. Fernandez de Lara, 791 p., 1980.

WONG, F.P.; BURR, H.N. & WILCOX, W.F. 2001. Heterothallism in *Plasmopara viticola*. **Plant Pathology**, 50:427-432.

WU, L., WANG, C. Application of molecular marker assisted selection in gene pyramiding and selection of new cultivars. **Journal of Northeast Agricultural University**. 18(1): 79-84. 2011.

WULFF, B.B., MOSCOU, M.J. Strategies for transferring resistance into wheat: from wide crosses to GM cassettes. **Frontier Plant Sciences**, 5:10.3389, 2014.

YANG, L., WANG, W., YANG, W., WANG, M. Marker-assisted selection for pyramiding the *waxy* and *opaque-16* genes in maize using cross and backcross schemes. **Molecular Breeding**, 31:767-775. 2013.

YOUNG, N.D. A cautiously optimistic vision for marker-assisted selection. **Molecular Breeding** 5:505-510, 1999.

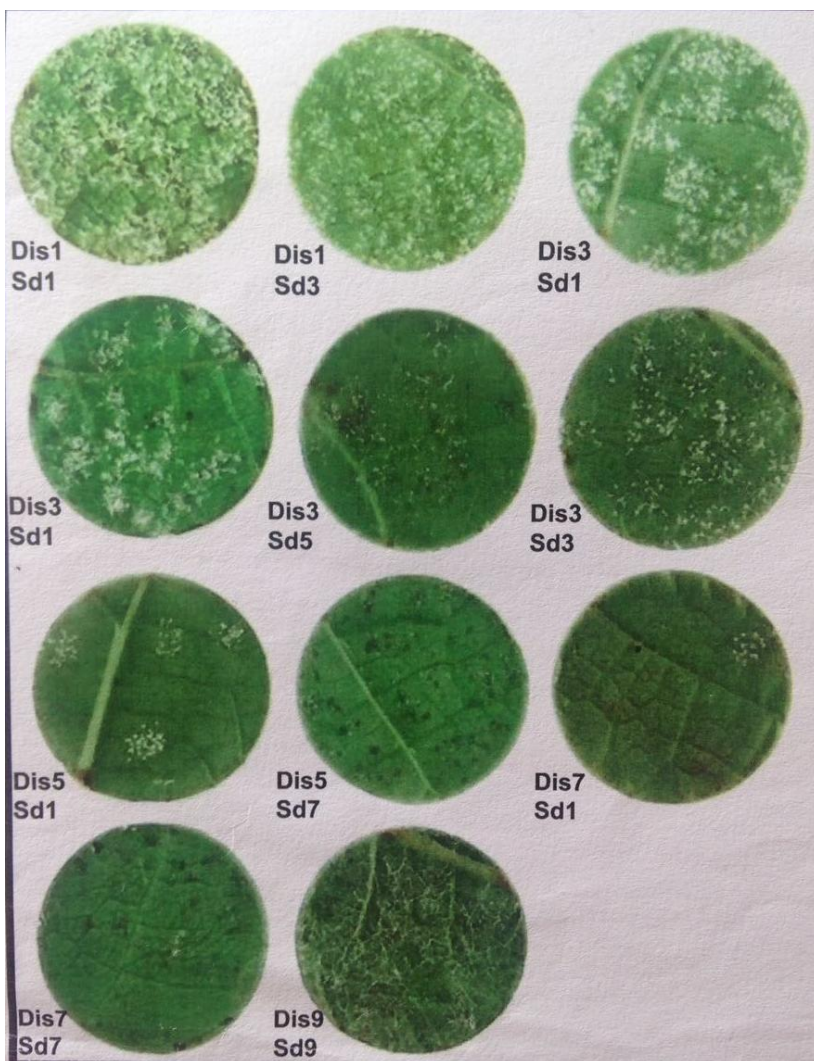
YU, Y., ZHANG, Y., YIN, L., LU, J. The mode of host resistance to *Plasmopara viticola* infection of grapevines. **Phytopathology**, 102, 1094-1101, 2012.

ZHANG, W. L., YANG, W. P., CHEN, Z. W., WANG, M. C., YANG, L. Q., CAI, Y. L. Molecular Marker-Assisted Selection for *o2* Introgression Lines with *o16* Gene in Corn. **Acta Agronomica Sinica**, 36:1302-1309. 2010.

APÊNDICE A – Genótipos de videira e respectivos QTL's de resistência a *Plasmopara viticola*

Genotype	QTL
Pinot Noir	/
Muscat Ottonel	/
Bronner	Rpv10
Muscaris	Rpv10
16-02-102	Rpv1
MW14	Rpv3
Bianca	Rpv3
Regent	Rpv3
Rupestris du Lot	Rpv3
Jasmin 8/1	Rpv12
Rip. Glorie d'Montp.	Rpv5+Rpv6
Cabernet Cortis	Rpv3+Rpv10

Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

ANEXO A – Escala de notas para avaliação de disquetes foliares

Fonte: OIV-452-1, adaptado por Buonassissi et al. (não publicado).