**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Características estruturais e químicas foliares de *Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L. e sua relação com a resposta à antracnose da videira

Larissa Fernanda Muniz

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2019**

**Larissa Fernanda Muniz
Engenheira Agrônoma**

Características estruturais e químicas foliares de *Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L. e sua relação com a resposta à antracnose da videira

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. **BEATRIZ APPEZZATO DA GLÓRIA**

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Muniz, Larissa Fernanda

Características estruturais e químicas foliares de *Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L. e sua relação com a resposta à antracnose da videira / Larissa Fernanda Muniz. - - Piracicaba, 2019.

49 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Elsinoë ampelina* 2. Videira 3. Histopatologia 4. Compostos fenólicos
5. Anatomia foliar I. Título

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e iluminar meus passos.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP e ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas por proporcionar a realização do curso de Mestrado.

À Prof^a. Dr^a. Beatriz Appezzato da Glória, pela dedicação na orientação e por ser exemplo de pesquisadora e docente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – CAPES/DS) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – n° 130354/2018-0) pela concessão das bolsas de estudos, as quais possibilitaram a realização desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro através do projeto Temático n° 2013/240039 e à Prof^a. Dr^a. Lilian Amorim, coordenadora do projeto pela oportunidade de participar da sua equipe.

Ao Programa de Pós Graduação em Fitopatologia e ao Dr. Ricardo Feliciano dos Santos pela concessão dos materiais necessários às inoculações realizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio Lima de Aguiar e a Mrs. Gislene Roberta Manarim do Laboratório de Tecnologia em Sucroderivados (Hugot) pela parceria na realização das análises bioquímicas.

À Mrs. Marli Soares, técnica do Laboratório de Anatomia Vegetal (LAnVeg) – ESALQ/USP, pela dedicação no auxílio laboratorial e pela amizade.

À Maria Solizete Granziol, secretária do Programa, pela atenção prestada no decorrer do curso.

Aos colegas de trabalho Dr. João Paulo Rodrigues Marques, Dr^a. Magda Andréia Tessmer e Dr^a. Aline Bertolosi Bombo, pelo exemplo profissional e amizade.

Aos colegas do LAnVeg pela amizade.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica Professor Dr. Elliot Watanabe Kitajima – ESALQ/USP, pelo uso dos equipamentos.

Aos meus pais, José Fernando e Eliana, pelo amor e apoio.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. Videira	9
2.2. Viticultura no Brasil	10
2.3. Anatomia <i>Vitis</i>	11
2.4. Antracnose da videira	12
2.5. Relações entre caracteres vegetais e a ocorrência de doenças	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Material botânico	15
3.2. Isolado	15
3.3. Inoculação conidial	16
3.4. Microscopia de luz	16
3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	17
3.6. Análises estatísticas	17
3.7. Análises bioquímicas	18
3.7.1. Compostos fenólicos totais	18
3.7.2. Flavonóides	18
3.7.3. Clorofila a, b e total	18
3.7.4. Atividade de peroxidase	19
3.7.5. Atividade de polifenoloxidase	19
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	33
REFERÊNCIAS	39
APÊNDICES	47

RESUMO

Características estruturais e químicas foliares de *Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L. e sua relação com a resposta à antracnose da videira

A antracnose da videira tem como agente causal o fungo *Elsinoë ampelina* Shear, o qual ataca tecidos tenros da parte aérea causando lesões necróticas e comprometendo o desenvolvimento da planta com consequente queda na quantidade e qualidade dos frutos produzidos. Cultivares de *Vitis* apresentam diferentes níveis de susceptibilidade à antracnose. Uma vez que características anatômicas e químicas podem atuar como mecanismos de resistência a patógenos, o presente estudo propõe comparar caracteres histológicos e bioquímicos em folhas jovens de *Vitis labrusca* 'Niagara Rosada' (NR, susceptível), *Vitis vinifera* 'Thompson Seedless' (TS, susceptível) e *V. vinifera* 'Pinot Noir' (PN, resistente). As análises anatômicas foram realizadas em folhas saudáveis aos 4 e 11 dias após o brotamento (DAB) e em folhas lesionadas com 11 DAB, enquanto os compostos bioquímicos foram quantificados em folhas saudáveis aos 4 e 11 DAB. Os caracteres analisados foram: índice estomático, densidade de idioblastos cristalíferos, espessura da cutícula da face adaxial, espessura da parede periclinal externa e altura das células epidérmicas de ambas as faces, espessura do mesofilo total, do parênquima paliádico e do parênquima lacunoso, o conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides e de clorofila *a*, *b* e total, bem como a atividade de peroxidase e de polifenoloxidase. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística. A cultivar TS apresentou índice estomático maior nas duas idades avaliadas em comparação com o genótipo resistente PN, a qual apresentou maior espessura de cutícula nas duas idades e de mesofilo total aos 11 DAB. Os parâmetros quantitativos das amostras inoculadas apresentaram redução significativa em relação às não inoculadas, com exceção da área foliar de PN, a qual não foi significativamente menor. Para NR e TS, 100% das amostras inoculadas apresentaram várias lesões expandidas, enquanto PN apenas 60% das folhas analisadas apresentaram poucas lesões bem delimitadas e de formato circular. A cultivar resistente PN apresentou forte reação positiva a compostos fenólicos bem como o maior conteúdo desses compostos na idade 11 DAB, enquanto a cultivar susceptível TS apresentou reação muito fraca e a menor concentração. O conteúdo de flavonoides foi maior em PN em relação à TS nas duas idades avaliadas, e NR apresentou o valor mais baixo aos 4 DAB, quando é altamente susceptível. A atividade de polifenoloxidase aos 11 DAB foi maior na cultivar PN, intermediária em NR e mais baixa em TS. A análise de todos os parâmetros anatômicos e bioquímicos avaliados indica que a maior resistência da cultivar PN esteja relacionada ao menor índice estomático, à cutícula mais espessa, ao conteúdo mais elevado de compostos fenólicos totais e de flavonoides, bem como a maior atividade enzimática de polifenoloxidase.

Palavras-chave: *Elsinoë ampelina*; Videira; Histopatologia; Compostos fenólicos; Anatomia foliar

ABSTRACT

Structural and chemical leaf characteristics of *Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L. and their relation to the response to grapevine anthracnose

Grapevine anthracnose is caused by the fungus *Elsinoë ampelina* Shear, which attacks tissues of the aerial part causing necrotic lesions, compromising plant growth with consequent decrease in quantity and quality of the fruits produced. *Vitis* cultivars show different levels of susceptibility to anthracnose. Anatomical and genetic characteristics can act as a resistance mechanism against pathogens, therefore, this study proposes to compare histological and biochemical characteristics in young leaves of *Vitis labrusca* 'Niagara Rosada' (NR, susceptible), *Vitis vinifera* 'Thompson Seedless' (TS, susceptible) and *V. vinifera* 'Pinot Noir' (PN, resistant). The anatomical analyses were performed on healthy leaves at 4 and 11 days after budding (DAB) and at 11 DAB on lesioned leaves, while biochemical compounds were quantified on healthy leaves at 4 and 11 DAB. The features analyzed were: stomatal index, idioblasts density, adaxial face cuticle thickness, external periclinal wall thickness, epidermal cell height of both faces, total mesophyll thickness, palisade parenchyma and spongy parenchyma, total phenolic compounds content, flavonoids, chlorophyll a, b, and total, and peroxidase and polyphenoloxidase activity. The data were submitted to the statistical analysis. The TS cultivar had a higher stomatal index at both ages evaluated compared to the PN resistant genotype, which presented greater cuticle thickness at leaf ages and total mesophyll at 11 DAB. The quantitative parameters of the inoculated samples presented a significant reduction in relation to the non-inoculated, except for the PN leaf area, which was not significantly lower. For NR and TS, 100% of the inoculated samples presented several expanded lesions, whereas PN only 60% of the analyzed leaves showed few lesions well delimited and circular in shape. The resistant cultivar PN showed strong positive reaction to phenolic compounds as well as the highest content of these compounds at 11 DAB, while the TS susceptible cultivar presented very weak reaction and the lowest concentration. The content of flavonoids was higher in PN compared to TS at both ages evaluated, and NR presented the lowest flavonoid content at 4 DAB, when it was highly susceptible. The polyphenoloxidase activity at 11 DAB was higher in the PN cultivar, intermediate in NR, and lower in TS. The analyses of all the anatomical and biochemical parameters indicate that the higher resistance of the PN cultivar is related to the lower stomatal index, thicker cuticle, higher content of total phenolic compounds and flavonoids, as well as higher enzymatic activity of polyphenoloxidase.

Keywords: *Elsinoë ampelina*; Grapevine; Histopathology; Phenolic compounds; Leaf anatomy

1. INTRODUÇÃO

No século XVI, colonizadores portugueses introduziram a videira na capitania de São Vicente, localizada no atual Estado de São Paulo. A viticultura expandiu-se para outras regiões do país com cultivares de *Vitis vinifera* até o século XIX e, após esse período, houve a introdução de 'Niagara Branca' (*Vitis labrusca* x (*V. labrusca* x *V. vinifera*)) e o surgimento de 'Niagara Rosada' por mutação somática natural (Sousa, 1959). Posteriormente, novas cultivares adaptadas ao clima tropical e subtropical, em especial de *V. labrusca*, foram desenvolvidas por pesquisadores brasileiros com a utilização de engenharia genética (Camargo et al., 2011; Maia & Ritschel, 2015). Hoje, a produção de uva no Brasil está concentrada nos estados do Rio Grande do Sul, Pernambuco, São Paulo, Bahia, Santa Catarina e Paraná, com produção de 1.400.222 toneladas (IBGE, 2019). As principais regiões vitícolas do Sul e Sudeste brasileiro apresentam condições climáticas favoráveis para a sobrevivência e disseminação de patógenos fúngicos, impondo dificuldades no cultivo (Tonietto, 2003; Sônego et al., 2005).

A antracnose da videira, causada pelo fungo *Elsinoë ampelina* Shear (Shear, 1929), é uma das principais doenças ocorrentes em regiões úmidas e ocasiona severos danos à cultura (Amorim & Kuniyuki, 1997). O patógeno ataca toda parte aérea do vegetal, principalmente tecidos verdes e tenros, causando lesões necróticas que comprometem o desenvolvimento da planta e acarretam em perdas na produção (Sônego et al., 2005). Cultivares de *Vitis* apresentam diferentes graus de susceptibilidade à antracnose (Fennell, 1948; Jamadar, 2007; Kono et al., 2013), sendo as variedades de uvas de mesa mais susceptíveis à doença quando comparadas com as de uva para vinho (Hart et al., 1993; Kono et al., 2013).

A resistência do hospedeiro a um fitopatógeno é dada pela capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou subsequente atividade do patógeno em seus tecidos, tornando caracteres anatômicos e bioquímicos possíveis mecanismos de defesa e fazendo com que existam diferentes níveis de resistência a patógenos (Pascholati & Dalio, 2018). Variações morfológicas, estruturais e bioquímicas são encontradas em folhas de membros do gênero *Vitis*, podendo ser inerentes da cultivar, decorrentes de estresses bióticos e, ou abióticos e também por diferenças comportamentais a níveis fisiológicos (Boso et al., 2010; Murria et al., 2018a). Esses estudos mostraram que cultivares de videira apresentaram características foliares

que poderiam indicar maior ou menor susceptibilidade ao ataque de microrganismos, tornando de suma importância estudos histológicos e químicos que possibilitem relacionar o nível de resistência à antracnose com as características dos tecidos vegetais e compostos bioquímicos. No entanto, a despeito da importância da doença antracnose da videira, poucos são os estudos sobre a histologia do patossistema envolvendo folhas de videira e *Elsinoë ampelina* (Braga et al., 2019).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi estudar a anatomia quantitativa e a superfície foliar de folhas saudáveis e inoculadas com *Elsinoë ampelina*, bem como compostos bioquímicos de folhas saudáveis de *Vitis vinifera* 'Thompson Seedless' e 'Pinot Noir' e *V. labrusca* 'Niagara Rosada' visando identificar características estruturais e químicas que possam auxiliar no entendimento dos diferentes níveis de susceptibilidade ao agente causal da doença antracnose entre as cultivares.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Videira

A videira pertence à família Vitaceae, a qual é composta por 19 gêneros, sendo *Vitis* o que apresenta importância, tanto econômica quanto social e histórica, possuindo 108 espécies e dentre elas, todas as videiras de produção comercial (Nascimento-Gavioli, 2014). A videira apresenta porte arbustivo e sarmentoso (do latim *viere* = fixar), necessitando de um tutor para sua sustentação. O predomínio do gênero é em regiões de clima temperado e subtropical do hemisfério Norte (Keller, 2010). A videira europeia possui grande importância, sendo a espécie *Vitis vinifera* a mais plantada mundialmente, atendendo ao mercado de vinhos finos, espumantes e de frutas frescas. As cultivares americanas, no geral, apresentam resistência a filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*), e devido a essa característica, são utilizadas em todo mundo como porta-enxertos.

Dados históricos relatam que colonizadores portugueses introduziram a videira no Brasil em 1532, na então capitania de São Vicente, hoje Estado de São Paulo. A partir desse evento e com introduções posteriores, a viticultura expandiu-se para outras regiões do país, com cultivares de *Vitis vinifera* procedentes de Portugal e Espanha, até o século XIX. A cultivar ‘Niagara Branca’ (*Vitis labrusca* x (*V. labrusca* x *V. vinifera*)) foi introduzida, em 1894, por meio de bacelos vindos do Alabama (Estados Unidos), trazidos por Benedito Marengo (Sousa, 1959), e ‘Niagara Rosada’ surgiu por mutação somática natural, em 1933, na cidade de Jundiaí (São Paulo).

Atualmente, dentre as variedades de *Vitis vinifera*, ‘Thompson Seedless’ apresenta grande importância na região Nordeste, uma vez que é considerada a uva apirênica mais importante no mundo e por ser um dos principais genitores para obtenção de novas cultivares (Soares & Leão, 2009). Os cultivos de ‘Pinot Noir’, variedade também vinífera, podem ser encontrados na região Sul do país, agregando valor nas áreas onde é cultivada (Mello et al., 2017). Algumas espécies americanas, como *Vitis labrusca*, são utilizadas como porta-enxerto ou como copa para a produção de frutos para mesa, sucos e vinhos comuns, uma vez que a resistência a pragas e doenças é maior quando comparada as espécies europeias

(Keller, 2010). ‘Niagara Rosada’ é a principal variedade de *V. labrusca* cultivada para o consumo *in natura* (Mello, 2016).

2.2. Viticultura no Brasil

A produção de uva no Brasil na safra de 2019 foi de 1.400.222 toneladas e esteve concentrada nos estados do Rio Grande do Sul, Pernambuco, São Paulo, Bahia, Santa Catarina e Paraná, sendo São Paulo o terceiro maior produtor brasileiro, com aproximadamente 130 mil toneladas produzidas em uma área de 7.130 hectares (IBGE, 2019).

O Estado de São Paulo é o maior produtor de uva ‘Niagara Rosada’ (*Vitis labrusca* L.), principal variedade de uva americana para consumo *in natura*, sendo quase a totalidade da área plantada destinada à sua produção (Mello, 2016). Seu cultivo no Estado se deve pelo maior preço de revenda decorrente do menor custo de produção (Techhio et al., 2011), por necessitar de menos tratamentos culturais, como o raleio de bagas, e maior resistência a algumas doenças fúngicas (Fracaro & Pereira, 2004) quando comparada às cultivares viníferas, reduzindo custos (Costa et al., 2012).

As cultivares de *Vitis vinifera* L., também conhecidas como uvas europeias, são plantadas em maiores concentrações nas regiões Sul – Serra Gaúcha, Serra do Sudeste e Campanha, e Nordeste – Vale do São Francisco, para fabricação de vinhos e uvas de mesa, respectivamente (Silva & Alves, 2014). A cultivar ‘Pinot Noir’, encontrada na região Sul do país, é utilizada para elaboração de vinhos finos e espumantes, compreendendo produção de aproximadamente 3.132 toneladas em 442 hectares e apresenta agregação de valor nas áreas onde é cultivada (Mello et al., 2017). No semiárido nordestino, destaca-se a produção da cultivar ‘Thompson Seedless’ (Carneiro & Coelho, 2007). As condições climáticas ocorrentes na região (tropical semiárido) possibilitam a produção durante todo ano (até duas safras e meia por ano) (Carneiro & Coelho, 2007), viabilizando a exportação na entressafra de outras regiões produtoras do mundo (Souza Leão, 2005), constituindo vantagem e relevância, uma vez que, ainda hoje, é considerada a uva apirênica mais importante no mundo, e por ser um dos principais genitores para obtenção de novas cultivares (Soares & Leão, 2009).

Uma vez que a videira é afetada por doenças que podem causar severos danos na planta com consequente queda na produção, a ocorrência dessas torna-se uma das principais dificuldades, e o controle fundamental para o sucesso do cultivo. As principais regiões vitícolas do Sul e Sudeste do Brasil são caracterizadas por apresentarem umidade e temperaturas elevadas, conjuntamente com precipitações frequentes durante o ciclo vegetativo da videira. O Estado de São Paulo apresenta verão úmido e inverno seco (Tonietto, 2003), favorecendo a sobrevivência e disseminação de patógenos e impondo maiores dificuldades no cultivo, principalmente no que se refere aos patógenos fúngicos da parte aérea (Sônego et al., 2005).

2.3. Anatomia *Vitis*

As folhas de membros do gênero *Vitis* podem apresentar variações morfoestruturais decorrentes de estresses bióticos, abióticos e também por diferenças comportamentais a níveis fisiológicos (Boso et al., 2010). No entanto, na literatura existem trabalhos que descrevem a anatomia foliar de representantes do gênero, possibilitando o estabelecimento de um padrão estrutural ocorrente (Swanepoel & Villiers, 1987; Teixeira et al., 2009; Boso et al., 2010; Alonso-Villaverde et al., 2011; Monteiro et al., 2013).

As folhas de *Vitis* são hipostomáticas, com estômatos apenas na face abaxial do limbo foliar, podendo esses estarem posicionados acima, no mesmo nível ou abaixo das demais células epidérmicas (Swanepoel & Villiers, 1987; Monteiro et al., 2013). Tricomas também são encontrados em membros do gênero, ocorrendo variação no tipo e densidade entre as faces adaxial e abaxial e entre espécies (Swanepoel & Villiers, 1987; Boso et al., 2010; Monteiro et al., 2013), sendo algumas praticamente glabras. Em vista frontal, as células epidérmicas da face adaxial e abaxial apresentam formato retangular ou ligeiramente poligonal, paredes retas ou pouco sinuosas, e podem ou não apresentar ornamentações cuticulares (Monteiro et al., 2013).

Em seção transversal, a epiderme das duas faces da folha é uniestratificada com células epidérmicas de formato poligonal, providas de parede periclinal externa fina e recobertas por cutícula delgada. O mesofilo é dorsiventral (ou bifacial) com parênquima paliádico composto por 1-2 camadas de células alongadas e

justapostas, e parênquima lacunoso composto por 4-5 camadas de células que podem apresentar arranjo mais ou menos compacto (Boso et al., 2010; Alonso-Villaverde et al., 2011; Monteiro et al., 2013). Os membros do gênero também podem apresentar idioblastos cristalíferos entre as células do mesofilo (Monteiro et al., 2013).

2.4. Antracnose da videira

A doença antracnose da videira é causada pelo fungo *Elsinoë ampelina* (anamorfo *Sphaceloma ampelinum* de Bary) Shear (Shear, 1929).

O patógeno tem como centro de origem o continente europeu (Shear, 1929; Mirica, 1994), mas se espalhou pelo mundo (Mirica, 1994; Amorim & Kuniyuki, 1997) e hoje ocorre na maioria das regiões produtoras de uva (Amorim & Kuniyuki, 1997).

Elsinoë ampelina é capaz de sobreviver em restos culturais do solo e nas lesões dos sarmentos, onde pode formar escleródios que funcionam como fonte de inóculo por mais de dois anos (Brook, 1992). Devido às características necrotróficas de infecção e destruição dos tecidos verdes e jovens, como folhas, gavinhas, pecíolos, inflorescências, ramos e frutos (Sônego et al., 2005) causa grandes danos à cultura da videira.

Os sintomas iniciais da doença são pontos circulares ou angulares ligeiramente deprimidos, de coloração castanho-escura (Sônego et al., 2005). Conforme avança a doença, as lesões podem coalescer, causando desfolha precoce (Santos et al., 2018a), afetando diretamente a atividade fotossintética e provocando redução do crescimento da planta e da produção de frutos.

Cultivares de *Vitis* spp. mostram diferentes graus de susceptibilidade a antracnose (Fennell, 1948; Jamadar, 2007; Kono et al., 2013), sendo as variedades de mesa mais susceptíveis à doença quando comparadas com as de vinho (Hart et al., 1993; Kono et al., 2013). Kono et al. (2013) classificaram a cultivar 'Pinot Noir' e 'Thompson Seedless' como tendo alto e baixo grau de resistência, respectivamente. Fennell (1948) e Kono et al. (2013) classificaram a espécie *V. labrusca* como resistente ao patógeno, porém Santos et al. (2018a) verificaram que, nas condições ocorrentes no Brasil, a cultivar 'Niagara Rosada' apresentou alta susceptibilidade, sendo os tecidos jovens os mais susceptíveis.

2.5. Relações entre caracteres vegetais e a ocorrência de doenças

A resistência do hospedeiro a um microrganismo patogênico pode ser definida, sob o aspecto fisiológico, como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos (Pascholati & Dalio, 2018). A interação entre os patógenos e os tecidos do hospedeiro faz com que existam diferentes níveis de resistência as doenças, em função das variações morfológicas ou anatômicas bem como das variações bioquímicas e fisiológicas (Vanderplank, 1984).

Vários caracteres foliares atuam como mecanismos estruturais na defesa contra o ataque de patógenos, por exemplo, a cutícula, os tricomas, estômatos, fibras e os vasos condutores (Pascholati & Dalio, 2018). Nas cultivares de videiras verifica-se que a espessura foliar, o formato e a densidade de tricomas e os estômatos são caracteres morfológicos foliares que podem indicar maior ou menor susceptibilidade ao ataque de patógenos (Boso et al., 2010; Monteiro et al., 2013).

A cutícula é uma estrutura complexa que desempenha funções primordiais para a sobrevivência da planta (Kerstiens, 1996; Riederer, 2006), como o controle da transpiração, da perda e absorção de solutos polares e da troca de gases, bem como o transporte de substâncias lipofílicas, repelência de água e partículas e atenuação da radiação UV e fotossinteticamente ativa (Riederer, 2006). Cutículas mais espessas nem sempre apresentam correlação com maior resistência a patógenos, porém sua estrutura, composição química e também sua espessura podem influenciar diretamente na penetração do patógeno e dificultar o processo de infecção (Agrios, 2005), tornando-se o primeiro obstáculo ao microrganismo (Pascholati & Dalio, 2018).

Altos níveis de pilosidade e de ceras epicuticulares podem interferir no processo de colonização de fungos que demandam mais umidade dificultando o processo germinativo dos esporos, devido ao menor acúmulo de água sobre a superfície foliar (Agrios, 2005; Jerba et al., 2005). Já os ferimentos e aberturas naturais atuam como vias de penetração de patógenos no hospedeiro, tornando o número, distribuição e morfologia dos estômatos importantes fatores no processo de infecção fúngica (Agrios, 2005; Boso et al., 2010; Gurjar et al., 2015).

O espessamento parietal e o grau de lignificação das paredes das células epidérmicas também podem interferir no processo de infecção por fungos, pois

paredes mais espessas e lignificadas geralmente são mais resistentes à ação desses microrganismos com consequente contenção no processo de colonização (Agrios, 2005; Pascholati & Dalio, 2018).

Os tecidos parenquimáticos também podem atuar na maior ou menor resistência a patógenos, de acordo com sua organização e características celulares (Silva et al., 2005). Mesófilos mais densos e com poucos espaços intercelulares podem dificultar o crescimento micelial (Boso et al., 2010). Souza (2008) relacionou a resistência do clone de eucalipto “A” a parâmetros que podem dificultar a penetração do fungo *Puccinia psidii* e a sua colonização nos tecidos do hospedeiro: a maior espessura das cutículas abaxial e adaxial, maior espessura do parênquima paliçádico adaxial, maior porcentagem de parênquima paliçádico, maior número e área de cavidades oleíferas e menor espessura e porcentagem de parênquima lacunoso.

Alguns casos de resistência podem ser explicados por mecanismos estruturais, porém a bioquímica é um fator chave para a imunidade e/ou maior resistência (Gurjar et al., 2015; Murria et al., 2018a). Os mesmos autores constataram que o nível de resistência ou susceptibilidade de genótipos de videira está correlacionado com alguns parâmetros bioquímicos, como: quantidade de clorofila *a*, *b* e total, de carotenoides, açúcares solúveis totais, proteínas totais, aminoácidos livres, compostos fenólicos totais e atividades das enzimas peroxidase e polifenoloxidase. Dessa forma, esses agentes devem ser avaliados de forma conjunta, uma vez que a estrutura/anatomia, a bioquímica e a genética estão interligadas e agem associadamente no processo de defesa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material botânico

Foram utilizadas mudas certificadas de *Vitis vinifera* L. cultivares ‘Thompson Seedless’ e ‘Pinot Noir’, sob porta-enxerto SO4 e *Vitis labrusca* L. ‘Niagara Rosada’ sob porta-enxerto IAC766, mantidas em casa de vegetação na ESALQ, USP. Para cada cultivar foram analisados 10 indivíduos.

Folhas sadias (não inoculadas) foram coletadas com quatro dias após o brotamento (dab) e com 11 dab. A inoculação conidial foi feita em folhas com 4 dab, as quais foram coletadas para as análises com 7 dias após a inoculação (dai), completando então 11 dab. Para as análises foram utilizadas uma folha por indivíduo, totalizando 10 repetições por cultivar. A área foliar das folhas sadias e inoculadas foi mensurada antes de fixá-las para os demais procedimentos. A fim de verificar se havia alterações no padrão cuticular foram analisadas outras três folhas de cada cultivar nas duas idades.

Para a quantificação dos compostos bioquímicos foi utilizado 1g de folhas de cada tratamento para obtenção do extrato requerido para as análises.

3.2. Isolado

Foi utilizado o isolado AVBR118 de *Elsinoë ampelina* previamente caracterizado por análise filogenética e morfológica (Santos et al., 2018c). Fragmentos do micélio foram repicados para placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Água (BDA) (Difco, USA) e mantidos no escuro por 7 dias para seu crescimento.

Como *E. ampelina* apresenta crescimento lento e não esporula em meio de cultura (Santos et al., 2018c), para induzir a esporulação e obter os conídios foi utilizada uma metodologia adaptada de Hyun et al. (2015), descrita por Santos et al. (2018b). Fragmentos de colônia cultivada em BDA (4 x 4 cm) foram transferidos e macerados em placa de Petri esterilizada, resultando em fragmentos menores que 2 mm. Esses fragmentos foram transferidos para um balão cônico de 125 mL contendo 40 mL de água destilada e esterilizada, incubados em agitador orbital (Tecnal) a 200 rpm em temperatura ambiente (22 – 25 °C), por 7 dias no escuro. A

suspensão obtida foi filtrada em duas camadas de gaze para retirar impurezas, e a concentração final da suspensão foi ajustada para 10^5 conídios/mL com auxílio da câmara de Neubauer.

3.3. Inoculação conidial

Folhas com 4 dab das três cultivares foram inoculadas por aspersão da suspensão conidial sobre toda a superfície foliar adaxial e abaxial. As plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida no escuro por 48 horas a 25 °C, e com umidade relativa próxima a 100%. Após esse período, as plantas foram transferidas para casa de vegetação e as folhas foram coletadas com 7 dai, completando 11 dab.

3.4. Microscopia de luz

As folhas foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965; modificado com tampão fosfato pH 7,2), submetidas a bomba de vácuo para a retirada do ar contida nos tecidos. Após a fixação, as regiões laterais do terço mediano da lâmina foliar foram separadas para a técnica de diafanização. Para as demais análises estruturais (quantitativas ou não), a região central do terço mediano da lâmina foliar sadia e a região de contato entre a área da lesão e a área não lesionada foram desidratadas em série etílica (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%) e infiltradas em hidróxi-etilmetacrilato (Leica Historesin®) conforme recomenda o fabricante. Os blocos foram seccionados transversalmente a 5-7 µm de espessura em micrótomo rotatório Leica RM 2045 com o auxílio de navalha de aço do tipo C. Em seguida, as lâminas foram depositadas sobre uma placa aquecedora a 40 °C para a secagem e fixação das seções na lâmina. As seções foram coradas com azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato-citrato a pH 4-6 (Sakai, 1973), montadas entre lâmina e lamínula com resina sintética “Entellan” para as análises anatômicas usuais e, para os testes histoquímicos, as seções foram submetidas a corantes e reagentes específicos. Para a localização de paredes suberificadas e cutinizadas e também a detecção de substâncias lipofílicas foi utilizado Sudan IV glicerinado (Jensen, 1962); para evidenciar compostos fenólicos, o cloreto férrico (Johansen, 1940) e para mucilagem e substâncias pécticas, o vermelho de rutênio (Johansen, 1940).

Para a contagem de estômatos, células epidérmicas ordinárias e dos idioblastos cristalíferos foi empregada a técnica de diafanização (Daudi & O'Brien, 2012). As amostras foram fervidas em solução contendo álcool etílico absoluto, ácido acético glacial e glicerina (3:1:1) e, posteriormente, coradas com safranina.

Foram analisados os seguintes caracteres estruturais quantitativos: índice estomático (contagem dos estômatos e das células epidérmicas), densidade dos idioblastos cristalíferos, espessura da cutícula da face adaxial, espessura da parede periclinal externa e a altura das células epidérmicas de ambas as faces, espessura do mesofilo total, do parênquima paliçádico e do parênquima lacunoso. Para cada parâmetro foram realizadas cinco medições ou contagens por folha, a fim de se obter uma média do indivíduo.

As lâminas obtidas foram analisadas com o auxílio do microscópio de luz e as imagens capturadas com câmera de vídeo Leica DC 300F acoplada ao microscópio Leica DMLD com as escalas das fotomicrografias diretamente impressas nas mesmas. As medições e contagens, bem como a medida da área foliar foram obtidas utilizando o Software Image J (Rasband, 2006).

3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para as análises da superfície foliar ao MEV, as folhas foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), desidratadas em série etílica (10, 30, 50, 70, 90 e 100%), secas ao método do ponto crítico de CO₂ (Horridge & Tamm, 1969), montadas sobre suportes de alumínio e cobertas com uma camada de ouro de 30 a 40 nm, no equipamento Balzers modelo SCD 050. As observações e as eletromicrografias foram feitas ao microscópio eletrônico de varredura modelo Jeol IT 300, operado a 20 kV, com as escalas das eletromicrografias diretamente impressas nas mesmas.

3.6. Análises estatísticas

A partir dos dados quantitativos obtidos foram feitas análises estatísticas para a comparação das médias através do teste de Tukey ($p < 0,05$). A análise foi realizada no software SASM – Agri (Canteri et al., 2001).

3.7. Análises bioquímicas

3.7.1. Compostos fenólicos totais

A metodologia empregada foi Julkunen-Tiitto (1985) com modificações, onde a 1000 μL de extrato metanólico de folhas de videira foi adicionado 500 μL de solução Folin-Ciocalteu, preparada na proporção 1:10 de reagente Folin e água destilada. Após 40 minutos a temperatura ambiente, foi adicionado 2,5 mL de carbonato de sódio 20% (m/v). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV Mini-1240 (Shimadzu; Kyoto, Japan) em comprimento de onda de 725 nm. As concentrações de fenólicos totais das amostras foram realizadas em triplicata (repetição analítica) e determinadas em relação a curva de concentrações de 0 a 20 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de solução de ácido tânico 0,1 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$.

3.7.2. Flavonóides

As análises foram realizadas pelo método proposto por Mabry e colaboradores (1970) com modificações. Em 500 μL de extrato metanólico de folhas de videira foram adicionados 4,3 mL de etanol 70%, 100 μL de solução de cloreto de alumínio 2% em methanol e 100 μL de solução de acetato de sódio 1 $\text{mol}.\text{L}^{-1}$. As leituras foram realizadas após 40 minutos de espera em temperatura ambiente, em espectrofotômetro UV Mini-1240 (Shimadzu; Kyoto, Japan) em comprimento de onda de 415 nm. As concentrações de flavonóides das amostras foram realizadas em triplicata (repetições analíticas) e determinadas em relação a curva de concentrações de 0 a 5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de solução de rutina.

3.7.3. Clorofila a, b e total

O método utilizado foi de acordo com Whitham et al. (1971). Os experimentos foram feitos em triplicata (repetições analíticas), sendo realizadas leituras diretas de extratos metanólicos de folhas de videira nos comprimentos de onda 645, 652 e 663 nm em espectrofotômetro UV Mini-1240 (Shimadzu Inc.; Kyoto, Japão), a fim de determinar a concentração de clorofila a, b e total. Para o cálculo das concentrações de clorofila foram utilizadas equações, e os resultados obtidos expressos em mg de clorofila por grama de material fresco.

$$\text{Clorofila } a = \frac{((12,7 \times A_{663}) - (2,69 \times A_{645})) \times V}{1000 \times W}$$

$$\text{Clorofila } b = \frac{((22,9 \times A_{645}) - (4,68 \times A_{663})) \times V}{1000 \times W}$$

$$\text{Clorofila total} = \frac{A_{652} \times 1000 \times (V/1000 \times W)}{34,5}$$

A_{663} : absorbância a 663 nm; A_{645} : absorbância a 645 nm; A_{652} : absorbância a 652 nm; V: volume final de extrato etanólico de clorofila (mL); W: massa de matéria da planta (g).

3.7.4. Atividade de peroxidase

A determinação da atividade enzimática de peroxidase foi realizada a 25 °C, onde em tubo de ensaio foram adicionados 1,5 mL de guaiacol 1% e 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 mol.L⁻¹. O tubo então foi agitado e posteriormente incubado em banho-maria por 10 minutos. Após esse processo foram adicionados 400 µL de tampão de peróxido de hidrogênio e 100 µL do extrato em tampão fosfato de sódio monobásico 0,1 mol.L⁻¹ (pH = 6,7). As leituras foram realizadas em triplicata (repetições analíticas) em espectrofotômetro UV-Mini 1240 (Shimadzu; Tokio, Japão) a 470 nm por 5 minutos (Khan & Robinson, 1994; Holschuh, 2000).

3.7.5. Atividade de polifenoloxidase

Para a determinação da atividade enzimática de polifenoloxidase, 2,9 mL de solução de pirocatecol em tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ foi encubado em tubo de ensaio por 10 minutos em banho a 25 °C. Então foram adicionados 100 µL do extrato em tampão fosfato de sódio monobásico 0,1 mol.L⁻¹ (pH = 6,7) e a solução foi homogeneizada. As leituras foram realizadas em triplicata (repetições analíticas) em espectrofotômetro UV-Mini 1240 (Shimadzu; Tokio, Japão) a 420 nm e 25 °C por 5 minutos (Oktay et al., 1995; Lima et al., 2001).

4. RESULTADOS

Morfologia das folhas sadias (não inoculadas) de *Vitis* spp. 'Niagara Rosada' (NR), 'Thompson Seedless' (TS) e 'Pinot Noir' (PN) aos 4 e 11 dias após o brotamento (dab) (Fig. 1). A pilosidade foi mais densa na face abaxial do limbo foliar de NR aos 4 dab, conferindo aspecto acinzentado à folha (Fig. 1D), em relação aos 11 dab (Fig. 1J), e diferindo das demais cultivares que foram quase glabras (Fig. 1E, 1F, 1K e 1L). Os tricomas não glandulares de NR são de dois tipos: reclinados, longos, emaranhados (Fig. 2J) e eretos, pequenos, pontiagudos.

Em vista frontal, a epiderme da face adaxial das três cultivares aos 4 dab apresentou células de formato retangular ou ligeiramente poligonal, paredes retas e poucas ornamentações cuticulares (Fig. 2A-C). Na face abaxial, as células epidérmicas apresentaram paredes onduladas (Fig. 2E-F). Em TS os estômatos ocorreram acima das células epidérmicas, no mesmo nível e abaixo dessas (Fig. 2E). Já em PN essa diferença de posição dos estômatos foi menos acentuada e perceptível (Fig. 2F), podendo ser observados estômatos pouco acima do nível das células epidérmicas e no mesmo nível dessas. Em NR a alta pilosidade da face abaxial impossibilitou a descrição do arranjo dos estômatos e também das demais células epidérmicas (Fig. 2D).

As células epidérmicas das duas faces foliares aos 11 dab foram maiores quando comparadas aos 4 dab (Fig. 2G-I, 2K e 2L). Aos 11 dab, as células epidérmicas da face adaxial da folha apresentaram, em vista frontal, paredes sinuosas e estrias cuticulares (Fig. 2G-I), sendo as estrias mais evidentes em PN (Fig. 2I) e em NR (Fig. 2G). Em TS as estrias foram menos proeminentes (Fig. 2H).

A epiderme da face abaxial apresentou as características descritas para a epiderme foliar aos 4 dab quanto à ocorrência dos estômatos e contorno das paredes. No entanto, aos 11 dab a pilosidade foi menos densa na face abaxial de NR (Fig. 2J).

Análise quantitativa dos caracteres foliares das três cultivares aos 4 dab e aos 11 dab. A área foliar aos 4 dab foi maior em NR (7,63 cm²) em relação à TS (5,16 cm²), sendo que aos 11 dab essa relação inverte (NR = 45,18 cm² e TS = 73,16 cm²). PN apresentou valor intermediário de área foliar aos 4 dab (5,44 cm²) e o menor valor aos 11 dab (39,38 cm²).

A densidade de idioblastos ($n^{\circ}/0,307039 \text{ mm}^2$) variou entre as cultivares nas duas idades (Fig. 3A-F), sendo que aos 4 dab NR apresentou a maior densidade (19,88), seguida de TS (16,4) e PN (10,56), respectivamente. Aos 11 dab, a cultivar TS apresentou a maior densidade de idioblastos (10,88), e as cultivares NR (7,72) e PN (6,84) não diferiram entre si. Em ambas as idades foliares, TS (4 dab = 0,068 e 11 dab = 0,09) apresentou índice estomático significativamente maior que em PN (4 dab = 0,033 e 11 dab = 0,06). A alta pilosidade de NR impossibilitou a quantificação desse parâmetro para essa cultivar.

A espessura da cutícula da face adaxial da folha diferiu entre as cultivares e entre as idades analisadas. Aos 4 dab a cultivar PN apresentou cutícula mais espessa (1,3 μm) que as demais cultivares, as quais não diferiram entre si (TS = 0,89 μm e NR = 0,91 μm). Aos 11 dab, PN exibiu cutícula mais espessa (1,83 μm), porém NR apresentou valor mais próximo (1,64 μm) a PN e TS o menor valor (0,91 μm).

Em relação à espessura da parede periclinal externa da epiderme da face adaxial aos 4 dab (Fig. 3G-I), as cultivares não apresentaram valores muito discrepantes, porém NR apresentou a menor espessura (TS = 1,61 μm , PN = 1,59 μm e NR = 1,49 μm). Aos 11 dab (Fig. 3M-O), PN apresentou valor significativamente maior (2,07 μm), sendo seguida por NR (1,75 μm) e por último, com menor valor, TS (1,15 μm). A espessura da parede periclinal externa da epiderme da face abaxial aos 4 dab (Fig. 3G-I) foi maior em TS (1,24 μm), seguida de PN (1,07 μm) e NR (0,98 μm), sendo que aos 11 dab (Fig. 3M-O) o maior valor encontrado foi para PN (1,51 μm) e o menor valor para TS (0,87 μm).

A altura das células epidérmicas das faces adaxial e abaxial diferiram apenas aos 4 dab (Fig. 3G-I). TS (18,11 μm) e PN (17,68 μm) apresentaram, na face adaxial, células epidérmicas mais altas que em NR (14,75 μm). Já para a altura da epiderme abaxial as três cultivares diferiram entre si, sendo TS (12,36 μm) com o maior valor, seguida de PN (11,09 μm) e NR (8,31 μm).

O mesofilo total, na idade 4 dab (Fig. 3G-I), foi mais espesso em TS (72,42 μm) e PN (70,26 μm) quando comparado a NR (59,57 μm). Aos 11 dab (Fig. 3J-L), PN (82,93 μm) apresentou mesofilo mais espesso que as demais (TS = 75,23 μm e NR = 77,82 μm), as quais não diferiram entre si. Para a espessura do parênquima paliçádico (PP) e do parênquima lacunoso (PL) aos 4 dab (Fig. 3G-I), TS apresentou o maior valor (PP = 26,8 μm e PL = 46,44 μm) e NR o valor mais baixo (PP = 22,31

μm e PL = 38,16 μm). Aos 11 dab (Fig. 3J-L), PN (36,75 μm) e NR (34,84 μm) apresentaram parênquima paliçádico significativamente mais espesso que TS (28,25 μm), e para o parênquima lacunoso não houve diferença significativa entre as cultivares.

Figura 1. Visão geral de folhas saudáveis (não inoculadas) de *Vitis* spp. 'Niagara Rosada' (NR), 'Thompson Seedless' (TS) e 'Pinot Noir' (PN) aos 4 e 11 dias após o brotamento. Face adaxial (ad) e abaxial (ab). Barras = 1 cm.

Figura 2. Eletromicrografias de varredura da epiderme foliar de *Vitis* spp. 'Niagara Rosada' (NR), 'Thompson Seedless' (TS) e 'Pinot Noir' (PN), nas idades 4 e 11 dias após o brotamento. Face adaxial (ad) e abaxial (ab). Setas brancas: estômato posicionado acima do nível das demais células epidérmicas; setas pretas: estômato posicionado no mesmo nível das demais células epidérmicas; pontas de setas: estômato posicionado abaixo no nível das demais células epidérmicas. Barras: A-C, E-I, K-L = 20 μ m; D e J = 50 μ m.

Figura 3. Fotomicrografias da vista frontal (A-F) e seções transversais (G-O) de folhas de *Vitis* spp. 'Niagara Rosada' (NR), 'Thompson Seedless' (TS) e 'Pinot Noir' (PN), aos 4 e 11 dias (d) após o brotamento. Elipse = idioblasto contendo ráfides; Pp = parênquima paliçádico; Sp = parênquima lacunoso; Ead = epiderme adaxial; Eab = epiderme abaxial. Barras: A-F = 50 μ m; G-L = 10 μ m; M-O = 5 μ m

Nas cultivares NR (Fig. 4A e 4B) e TS (Fig. 4E e 4F), 100% das folhas inoculadas apresentaram várias lesões expandidas, porém em PN apenas 60% das amostras analisadas apresentaram poucas lesões bem delimitadas e de formato circular (Fig. 4I e 4J). Nas seções transversais, entre a área lesionada e a não lesionada, é possível observar que em NR (Fig. 4C e 4D) e TS houve alteração anatômica gradual, em especial, em TS (Fig. 4G e 4H). No entanto, em PN (Fig. 4K e 4L) houve redução drástica na espessura foliar e alteração generalizada de todas as células com a perda de formato das mesmas.

Nas três cultivares, as folhas inoculadas com *Elsinõe ampelina* exibiram redução nos valores de todos os parâmetros quantitativos analisados quando comparadas com as folhas não inoculadas na mesma idade, exceto para a área foliar de PN na qual a redução não foi significativa (Tabela 1).

Embora o número e a extensão das lesões tenham sido distintos entre PN e as demais cultivares, as alterações causadas nos tecidos foliares foram similares (Fig. 5A-D). O fungo pode penetrar via estômato em PN e em TS (Fig. 5A), a pilosidade na face abaxial impossibilitou a observação em NR e, por via direta nas três cultivares (Fig. 5B). Na presença do fungo a epiderme exibiu degradação parietal, evidenciada pelo acúmulo de material péctico sob a cutícula distendida (Fig. 5B), a qual levou à redução na espessura da parede periclinal externa (Fig. 5B, Tabela 1). Houve também redução na espessura da cutícula (Tabela 1) a qual deixou de exibir as suas ornamentações (Fig. 5C), bem como na espessura do mesofilo e dos parênquimas clorofilianos (Tabela 1). Nos setores das lesões onde predominaram as estruturas do fungo, as alterações anatômicas foram mais acentuadas (Fig. 5D). A maioria das células epidérmicas, dos parênquimas clorofilianos, dos idioblastos cristalíferos e das células dos feixes vasculares, perderam o formato original resultante do colapso e, muitas vezes da ruptura celular (Fig. 5D).

Figura 4. Visão geral (A, E, I), eletromicrografias de varredura (B, F, J) e fotomicrografias de seções transversais (C, D, G, H, K, L) de folhas lesionadas de *Vitis* spp. 'Niagara Rosada' (NR), 'Thompson Seedless' (TS) e 'Pinot Noir' (PN), aos 11 dias após o brotamento inoculadas com *Elsinöe ampelina*. Nas seções transversais observa-se o limite (tracejado) entre os setores lesionados (alterados pelo fungo) e os setores não lesionados. Ead = epiderme adaxial; Eab = epiderme abaxial; Le = lesão; Pp = parênquima paliçádico; Sp = parênquima lacunoso. Barras: A e E = 1 cm; e I = 1 cm (inset 0,1 cm); B, C, F, G, J e K = 50 μ m; D, H e L = 20 μ m.

Figura 5. Fotomicrografias de seções transversais (A, B, D) e eletromicrografia de varredura (C) de folhas de *Vitis* spp. 'Thompson Seedless' (A-C) e 'Pinot Noir' (D). A. Penetração do fungo via estômato (seta). B. Observar a penetração do fungo entre duas células ordinárias da epiderme e, onde o fungo está presente, a degradação parietal com a liberação de material péctico (rosa púrpura). C. Alteração na epiderme abaxial. D. Alterações na lâmina foliar. Ead = epiderme adaxial; Eab = epiderme abaxial; Ct = cutícula; Id = idioblasto; St = estômato; Vb = feixe vascular. Barras: A e C = 3 μ m; B e D = 10 μ m.

Tabela 1. Medida dos caracteres foliares (média $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste Tukey ($p > 0,05$) para as cultivares de *Vitis* spp. 'Niagara Rosada' (NR), 'Thompson Seedless' (TS) e 'Pinot Noir' (PN) não inoculadas (ni) e inoculadas (i) com *Elsinöe ampelina*. Diferentes letras em uma mesma linha representam diferenças significativas entre os tratamentos para cada cultivar.

Parâmetros	NR ni	NR i	TS ni	TS i	PN ni	PN i
Área foliar (cm ²)	45,18 $\pm$ 5,22 a	25,87 $\pm$ 9,5 b	73,16 $\pm$ 14,34 a	28,58 $\pm$ 12,36 b	39,38 $\pm$ 7,2 a	26,27 $\pm$ 10,8 a
Espessura cutícula adaxial (μ m)	1,64 $\pm$ 0,32 a	0,92 $\pm$ 0,19 b	0,91 $\pm$ 0,13 a	0,48 $\pm$ 0,09 b	1,83 $\pm$ 0,32 a	1,0 $\pm$ 0,23 b
Espessura parede periclinal externa adaxial (μ m)	1,75 $\pm$ 0,31 a	0,67 $\pm$ 0,12 b	1,15 $\pm$ 0,2 a	0,81 $\pm$ 0,14 b	2,07 $\pm$ 0,37 a	0,7 $\pm$ 0,08 b
Espessura parede periclinal externa abaxial (μ m)	1,05 $\pm$ 0,15 a	0,62 $\pm$ 0,14 b	0,87 $\pm$ 0,12 a	0,63 $\pm$ 0,14 b	1,51 $\pm$ 0,21 a	0,60 $\pm$ 0,12 b
Altura células epidérmicas adaxial (μ m)	19,98 $\pm$ 2,27 a	9,32 $\pm$ 1,99 b	19,26 $\pm$ 3,23 a	7,96 $\pm$ 2,47 b	20,48 $\pm$ 2,45 a	12,82 $\pm$ 3,04 b
Altura células epidérmicas abaxial (μ m)	11,34 $\pm$ 1,98 a	6,83 $\pm$ 1,57 b	11,69 $\pm$ 1,77 a	7,14 $\pm$ 1,92 b	11,26 $\pm$ 1,1 a	8,89 $\pm$ 1,75 b
Espessura mesofilo (μ m)	77,82 $\pm$ 11,59 a	56,57 $\pm$ 8,22 b	75,23 $\pm$ 9,47 a	57,2 $\pm$ 7,28 b	82,93 $\pm$ 6,97 a	61,33 $\pm$ 14,14 b
Espessura parênquima paliçádico (μ m)	34,84 $\pm$ 3,62 a	18,82 $\pm$ 3,68 b	28,25 $\pm$ 4,29 a	18,79 $\pm$ 4,46 b	36,75 $\pm$ 5,93 a	19,07 $\pm$ 4,02 b
Espessura parênquima lacunoso (μ m)	44,11 $\pm$ 9,07 a	36,91 $\pm$ 6,47 b	47,64 $\pm$ 7,76 a	37,6 $\pm$ 5,74 b	47,38 $\pm$ 6,45 a	42,64 $\pm$ 11,32 b

A Figura 6 mostra a reação para o teste histoquímico com o cloreto férrico, o qual evidencia a existência de compostos fenólicos. Como pode ser observado, entre as três cultivares, NR apresentou reação positiva nos parênquimas clorofilianos nas duas idades não inoculadas (Fig. 6A e 6D). A cultivar PN também apresentou reação positiva, porém mais evidente aos 11 dab não inoculada (Fig. 6C e 6F). As folhas inoculadas das três cultivares apresentaram reação mais intensa quando comparadas às folhas não inoculadas (Fig. 6G-I), em especial, em TS (Fig. 6H), cuja reação ao cloreto férrico foi fraca nas folhas não inoculadas aos 4 (Fig. 6B) e 11 dab (Fig. 6E).

Figura 6. Fotomicrografias de seções transversais do limbo foliar de *Vitis* spp. 'Niagara Rosada' (NR), 'Thompson Seedless' (TS) e 'Pinot Noir' (PN), apresentando compostos fenólicos evidenciados por cloreto férrico, aos 4 dias (d) e 11 dias após o brotamento não inoculadas (dni) e inoculadas (di) com *Elsinöe ampelina*. Barras = 30 μ m.

O conteúdo de compostos fenólicos totais (mgTAE.g^{-1}) de folhas na idade 4 dab foi significativamente menor para NR (9,16) quando comparado com TS (16,38) e PN (16,64), as quais não diferiram entre si. Aos 11 dab, o conteúdo de compostos fenólicos totais de PN (19,79) foi significativamente maior que nas demais cultivares, as quais apresentaram valores muito inferiores e estatisticamente semelhantes, sendo o menor valor para TS (2,37).

Em folhas aos 4 dab, o conteúdo de flavonoides (mgRE.g^{-1}), foi maior para PN (1,05), diferindo de TS (0,69) e de NR (0,67). Aos 11 dab, as três cultivares apresentaram diferenças significativas, com o maior valor para PN (1,28), seguida de NR (0,70) e TS (0,15).

Em relação ao conteúdo de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total aos 4 dab não houve diferença significativa entre as cultivares, sendo que aos 11 dab a cultivar TS apresentou os maiores valores em relação às demais cultivares que não diferiram entre si. Os valores em mg.g^{-1} massa fresca foram os seguintes: clorofila *a* aos 4 dab (TS = 0,223; NR = 0,217; PN = 0,273) e aos 11 dab (TS = 0,621; NR = 0,497; PN = 0,497); clorofila *b* aos 4 dab (TS = 0,383; NR = 0,259; PN = 0,174) e aos 11 dab (TS = 0,303; NR = 0,243; PN = 0,229); clorofila total aos 4 dab (TS = 0,631; NR = 0,584; PN = 0,590) e aos 11 dab (TS = 1,041; NR = 0,751; PN = 0,811).

A atividade enzimática de peroxidase (U.ml^{-1}) em folhas aos 4 dab foi nula para todas as cultivares. Aos 11 dab, a cultivar TS (72,0) apresentou valor significativamente maior que PN (6,87), enquanto NR não apresentou atividade. A atividade da polifenoloxidase (U.ml^{-1}) em folhas aos 4 dab foi estatisticamente maior para a cultivar NR (82,73) e menor para TS (33,33), enquanto PN (44,4) apresentou valor intermediário. Aos 11 dab a cultivar PN (21,87) apresentou a maior atividade enzimática, diferindo de NR (4,93) e TS (5,53), as quais não diferiram entre si.

5. DISCUSSÃO

Como verificado em outros genótipos de *Vitis* (Swanepoel & Villiers, 1987; Kortekamp & Zyprian, 1999; Nunes, 2009; Boso et al., 2010, 2011; Najmaddin, 2014; Santos, 2014), a pilosidade nas folhas variou entre as cultivares analisadas, ou seja, quase glabras em *V. vinifera* TS e PN, ou com tricomas ocorrendo nas duas faces, em especial, na face abaxial em *V. labrusca* NR. Os tricomas verificados em NR são similares aos dois tipos descritos para o gênero *Vitis* (Nunes, 2009; Monteiro et al., 2013; Santos, 2014). Altos níveis de pilosidade, como aqui registrados em NR, podem interferir no processo de colonização de fungos dificultando o acesso a superfície e o processo germinativo dos esporos (Pascholati & Dalio, 2018). Murria (2017) constatou que cultivares de *V. vinifera* ‘Pusa Navrang’ e ‘Punjab MACS Purple’ densamente pilosas apresentaram maior resistência a *Elsinoë ampelina*, e que a cultivar glabra ‘Perlette’ apresentou tricomas apenas após ser inoculada, mostrando que essas estruturas poderiam atuar como mecanismos de resistência pré e pós-formados. No entanto, Boso et al. (2010) ao estudarem espécies de *Vitis* com diferentes graus de susceptibilidade a *Plasmopara viticola*, agente causal do míldio, constataram que não houve relação entre a susceptibilidade ao patógeno e a densidade de tricomas foliares. No presente estudo também parece não haver essa relação, pois TS e PN que possuem superfícies praticamente glabras nas duas idades analisadas apresentam diferentes graus de susceptibilidade a *E. ampelina* (Kono et al., 2013). Além disso, as folhas de NR apresentam maior susceptibilidade a *E. ampelina* aos 4 dab quando são densamente pilosas (Carisse & Morissette-Thomas, 2013; Barros et al., 2015). Nas três cultivares, bem como na interação *E. fawcettii* e *Citrus unshiu* ‘satsuma mandarin’ (Paudyal et al., 2017), o fungo pode infectar e causar lesões nas duas faces da folha.

Como verificado no presente estudo, a ornamentação cuticular varia entre os genótipos de *Vitis* (Teixeira et al., 2009; Boso et al., 2011) sendo muito poucos ou escassos os depósitos de cera epicuticular (Monteiro et al., 2013; Santos, 2014). Também a espessura da cutícula da face adaxial da folha diferiu significativamente entre as cultivares e entre as idades analisadas, sendo que a cultivar resistente PN apresentou cutícula mais espessa que a cultivar susceptível TS nas duas idades. A relação entre a maior espessura cuticular e a resistência a *Elsinoë ampelina* também

foi verificada em *V. vinifera* 'Punjab MACS Purple' (Murria, 2017) e em outros patossistemas (Hammer & Evensen, 1994; Souza, 2008).

Nas três cultivares de *Vitis* analisadas, bem como em outras videiras (Swanepoel & Villiers, 1987; Teixeira et al., 2009; Monteiro et al., 2013; Santos, 2014), as folhas são hipoestomáticas e apresentam até três tipos de estômatos em relação ao nível das demais células epidérmicas: abaixo, no mesmo nível e, ou acima dessas. Os estômatos podem atuar como vias de penetração de fungos fitopatogênicos, como observado neste estudo em PN e TS, tornando suas características de grande importância no contexto da interação planta-patógeno (Pascholati & Dalio, 2018). De fato, a cultivar susceptível TS apresentou índice estomático maior nas duas idades avaliadas em comparação com o genótipo resistente PN. Esse resultado confirma as observações já realizadas em outros genótipos de *Vitis* susceptíveis à antracnose os quais apresentavam maior índice estomático (Murria, 2017) e número de estômatos (Gurjar et al., 2015) quando comparados aos resistentes. Além da penetração via estômato em PN e TS, foi verificada a penetração via direta com alterações na cutícula já descritas para NR (Braga et al., 2019). A degradação cuticular em áreas próximas aos conídios também foi verificada na interação *Elsinoë fawcettii* e 'satsuma mandarin' (*Citrus unshiu*) (Paudyal & Hyun, 2015; Paudyal et al., 2017).

Nas três cultivares analisadas, as características da epiderme foram similares às descritas para o gênero *Vitis*, ou seja, epiderme uniestratificada, composta por células epidérmicas ordinárias com paredes finas nas faces adaxial e abaxial do limbo foliar (Salem-Fnayou et al., 2011; Monteiro et al., 2013), sendo as adaxiais mais altas que as abaxiais (Nunes, 2009). O espessamento parietal das células epidérmicas pode interferir no processo de infecção por fungos, restringindo a colonização por ser mais resistente à ação de fitopatógenos (Pascholati & Dalio, 2018). No entanto, na interação *E. ampelina* x *Vitis* spp. o espessamento da parede, bem como a altura das células epidérmicas, parecem não influenciar na infecção do patógeno, pois no momento da inoculação (4 dab), a cultivar susceptível TS apresentou o maior valor para as duas faces da folha. Hammer & Evensen (1994) também afirmaram que a parede celular não contribuiu para a inibição da penetração por *Botrytis cinerea* em pétalas de cultivar resistente de rosa, pois observaram que o micélio crescia entre a cutícula e a parede celular, e conseguia avançar conforme havia a degradação parietal decorrente da morte celular.

A distribuição dos idioblastos cristalíferos no mesofilo descrita para o gênero (Ifrim et al., 2012) foi confirmada no presente estudo. Os idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio são frequentemente associados a resistência a herbívoros (Franceschi & Nakata, 2005) e a doenças (Marques et al., 2014). Porém, não foi possível estabelecer uma relação entre a densidade de idioblastos com a susceptibilidade à antracnose uma vez que não houve diferença significativa entre as cultivares.

A compactação do mesofilo tem sido relacionada à resistência em alguns patossistemas do gênero *Vitis* por dificultar o crescimento micelial dos fungos (Murria, 2017; Navarro, et al., 2019). As cultivares de *Vitis vinifera* 'Punjab MACS Purple' e 'Pusa Navrang' com maior resistência a *Elsinoë ampelina* apresentaram parênquima lacunoso mais compacto que as mais susceptíveis (Murria, 2017). No presente estudo, todas as cultivares apresentaram uma camada de paliádico e 3-4 de lacunoso, sendo que aos 11 dab a cultivar resistente PN apresentou mesofilo mais espesso que as demais, as quais não diferiram entre si.

A morte e o colapso das células infectadas por *E. ampelina* nas três cultivares estudadas resultaram nos menores valores dos parâmetros quantitativos das amostras inoculadas em relação às não inoculadas. Na região totalmente lesionada houve necrose dos tecidos, impossibilitando a distinção entre os tecidos vegetais como já descrito em patossistemas envolvendo o gênero *Elsinoë* (Paudyal & Hyun, 2015; Paudyal et al., 2017; Murria et al., 2018c).

Embora Kono et al. (2013) tenham classificado a espécie *V. labrusca* como resistente, no presente estudo, todas as amostras analisadas apresentaram alta susceptibilidade, assim como observado por Barros et al. (2015) nas condições subtropicais do Brasil. Kono et al. (2014) constataram que, em genótipos resistentes, as lesões foliares são pequenas, pois possivelmente desenvolvem mecanismos que impedem o rápido avanço do fungo nas células do hospedeiro. De fato, na cultivar PN, considerada resistente (Kono et al., 2013) apenas 60% das amostras analisadas apresentaram poucas lesões circulares bem delimitadas, sendo que na área lesionada houve redução drástica da espessura foliar e alteração generalizada de todas as células, o que deve ter limitado o avanço do fungo em outros setores da lâmina foliar. No entanto, nas cultivares suscetíveis NR e TS (Kono et al., 2013), as lesões eram maiores e mais expandidas, observando-se o patógeno amplamente distribuído no tecido foliar. No patossistema *Elsinoë fawcettii* e *Citrus unshiu*

‘satsuma mandarin’ a colonização pelo patógeno é limitada pela instalação de uma camada de proteção resultante de hipertrofia e hiperplasia celulares (Paudyal & Hyun, 2015; Paudyal et al., 2017). Na interação *E. ampelina* e a cultivar resistente PN não há formação de barreiras físicas, sugerindo que a limitação do patógeno seja feita por outro mecanismo.

A resistência vegetal contra fitopatógenos pode estar associada aos compostos fenólicos, substâncias que apresentam atividade antimicrobiana, cuja síntese pode ser induzida ou aumentada após o processo de infecção (Pascholati & Dalio, 2018). De fato, as três cultivares apresentaram reação mais intensa para compostos fenólicos depois de inoculadas, como já havia sido relatado em outros estudos com espécies de *Vitis* em interações com patógenos (Taware et al., 2010; Murria et al., 2018a, 2018b, 2018c). Estudos com espécies de *Vitis* mostram que, quando não infectadas, cultivares mais resistentes a fitopatógenos apresentam maior conteúdo de fenólicos totais que cultivares susceptíveis (Taware et al., 2010; Gurjar et al., 2015; Murria et al., 2018a). Entre as viníferas estudadas, a cultivar resistente PN apresentou forte reação positiva a compostos fenólicos bem como o maior conteúdo desses compostos na idade 11 dab, enquanto a cultivar susceptível TS apresentou reação muito fraca e a menor concentração, confirmando a observação de que há decréscimo no teor de fenólicos quanto menor a resistência do genótipo a fitopatógenos (Gurjar et al., 2015; Murria et al., 2018a). Aos 4 dab não houve diferença na concentração de fenólicos entre as viníferas, fato já esperado, uma vez que na reação com o cloreto férrico não foi possível constatar grande diferença entre as cultivares. A cultivar resistente PN, quando inoculada, embora tenha apresentado lesão esta não se alastrou pelo tecido foliar como em TS provavelmente devido ao aumento na concentração de fenólicos totais. Flavonoides são compostos que agem na proteção contra fitopatógenos, podendo atuar como sinalizadores e/ou ter ação direta na defesa da planta (Treutter, 2005; Mierziak et al., 2014). Na interação entre cevada (*Hordeum vulgare* L.) e *Fusarium* sp. foi constatado que a resistência a esse patógeno estava relacionada ao acúmulo de flavonoides nos grãos (Skadhauge et al., 1997). Estudos com o gênero *Vitis* mostram que plantas infectadas apresentam incremento no teor de flavonoides, indicando sua participação na proteção do vegetal (Murria et al., 2018b, 2018c). É interessante notar que, nas duas idades analisadas, o conteúdo de flavonoides constitutivos foi maior na cultivar resistente PN quando comparado ao da cultivar

susceptível TS. Além disso, a cultivar NR apresentou o valor mais baixo de flavonoides aos 4 dab, momento em que é altamente susceptível.

O conteúdo de clorofilas tende a diminuir em cultivares infectadas devido à destruição dos pigmentos pelos patógenos e, ou pela redução na absorção de luminosidade (Lobato et al., 2009; Murria et al., 2018b, 2018c). Murria e colaboradores (2018a) avaliaram cultivares de *Vitis* com diferentes susceptibilidades à antracnose e observaram que o teor de clorofila *a*, *b* e total em folhas sadias foi maior em plantas resistentes e menor em susceptíveis. No entanto, Gurjar et al. (2015) ao analisarem o mesmo patossistema, observaram que o menor valor de clorofila total foi encontrado na cultivar resistente à doença. Também no presente estudo as folhas sadias da cultivar resistente PN apresentou menor teor de clorofila *a*, *b* e total quando comparada a cultivar susceptível TS aos 11 dab.

Peroxidase e polifenoloxidase são enzimas comumente relacionadas à defesa vegetal contra agentes patogênicos, por oxidarem fenóis a compostos altamente tóxicos aos microrganismos (Agrios, 2005). Genótipos resistentes a patógenos apresentam maiores atividades enzimáticas quando comparados aos genótipos menos resistentes, tanto na condição não inoculados (Madhavi et al., 2005; Gurjar et al., 2015; Murria et al., 2018a) quanto inoculados (Madhavi et al., 2005; Gurjar et al., 2015; Murria et al., 2018a, 2018b, 2018c). Aos 4 dab, nenhuma cultivar apresentou atividade de peroxidase, podendo a ação enzimática de proteção ter sido direcionada apenas para a rota da polifenoloxidase. É interessante notar que aos 11 dab, a atividade da enzima polifenoloxidase foi maior na cultivar resistente PN quando comparada com as demais, corroborando dados que mostram a possível ação da polifenoloxidase como mecanismo constitutivo (Gurjar et al., 2015; Murria et al., 2018a) de proteção a patógenos em genótipos de *Vitis*.

Em conclusão, a análise de todos os parâmetros anatômicos e bioquímicos avaliados indica que a maior resistência da cultivar PN esteja relacionada ao menor índice estomático, à cutícula mais espessa, ao conteúdo mais elevado de compostos fenólicos totais e de flavonoides e também a maior atividade enzimática de polifenoloxidase. Estudos mais detalhados sobre a constituição química da cutícula de genótipos de *Vitis* talvez possam esclarecer outros aspectos relacionados à resistência à antracnose como já demonstrado em outros patossistemas (Santos et al., 2019).

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. 2005. How plants defend themselves against pathogens. In: Plant Pathology. San Diego: Academic Press, 208-248.
- ALONSO-VILLAYERDE, V., BOSO, S., SANTIAGO, J.L., GAGO, P., RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.I., MARTÍNEZ, M.C. 2011. Leaf thickness and structure of *Vitis vinifera* L. cv. Albariño clones and its possible relation with susceptibility to downy mildew (*Plasmopara viticola*) infection. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 45(3): 161-169.
- AMORIM, L. & KUNIYUKI, H. 1997. Doenças da videira. In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN, A., CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. (Eds.) Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas. São Paulo. Agronômica Ceres, 736-757.
- BARROS, L.B., BIASI, L.A., CARISSE, O., MIO, L.L.M. de. 2015. Incidence of grape anthracnose on different *Vitis labrusca* and hibrid cultivars and rootstocks combination under humid subtropical climate. Australasian Plant Pathology, 44:397-403.
- BOSO, S., ALONSO-VILLAYERDE, V., SANTIAGO, J.L., GAGO, P., DÜRRENBARGER, M., DÜGGELIN, M., KASSEMAYER, H.H., MARTÍNEZ, M.C. 2010. Macro- and microscopic leaf characteristics of six grapevine genotypes (*Vitis* spp.) with different susceptibilities to grapevine downy mildew. Vitis, 49(1): 43-50.
- BOSO, S., GAGO, P., ALONSO-VILLAYERDE, V., SANTIAGO, J.L., MENDEZ, J., PAZOS, I., MARTÍNEZ, M.C. 2011. Variability at the electron microscopic level in leaves of members of the genus *Vitis*. Scientia Horticulturae, 128: 228-238.
- BRAGA, V.B., SANTOS, R.F. dos, AMORIM, L., APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. 2019. Histopathology of infection and colonisation of *Elsinoë ampelina* on grapevine leaves. European Journal of Plant Pathology. Available from <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01721-2>.
- BROOK, P.J. 1992. Epidemiology of grapevine anthracnose and downy mildew in Auckland, New Zealand vineyard. New Zealand Journal of Crop Protection and Horticultural Science, 20: 37-49.
- CAMARGO, U.A., TONIETTO, J., HOFFMANN, A. 2011. Progressos na viticultura brasileira. Revista Brasileira de Fruticultura, 33: 144-149.

- CANTERI, M.G., ALTHAUS, R.A., VIRGENS FILHO, J.S., GIGLIOTI, E.A., GODOY, C. 2001. SAMSAgri: Sistema para análise a separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. *Revista Brasileira de Agrocomputação*, 1: 18-24.
- CARISSE, O. & MORISSETTE-THOMAS, V. 2013. Epidemiology of Grape Anthracnose: Factors Associated with Defoliation of Grape Leaves Infected by *Elsinoë ampelina*. *Plant Disease*, 97: 222-230.
- CARNEIRO, W.M.A. & COELHO, M. do C.S.G. 2007. A vitivinicultura no nordeste brasileiro: características e perspectivas da atividade para a região. Sober – XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Londrina/PR, 21p.
- COSTA, T.V., TARSITANO, M.A.A., CONCEIÇÃO, M.A.F. 2012. Caracterização social e tecnológica da produção de uvas para mesa em pequenas propriedades rurais da região de Jales-SP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34(2): 766-773.
- DAUDI, A. & O'BRIEN, J.A. 2012. Detection of hydrogen peroxide by DAB staining in *Arabidopsis* leaves. *Bio-protocol*, 2(18): 1-4. Available from <http://www.bio-protocol.org/e263> [accessed 23 November 2018].
- FENNELL, J.L. 1948. Inheritance studies with the tropical grape. *Journal of Heredity*, 39: 54-56.
- FRACARO, A.A. & PEREIRA, F.M. 2004. Efeito do ethephon sobre a brotação e vigor dos ramos da videira 'Niagara Rosada' (*Vitis labrusca* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26(3): 399- 402.
- FRANCESCHI, V.R. & NAKATA, P.A. 2005. Calcium Oxalate in Plants: Formation and Function. *Annual Review of Plant Biology*, 56:41-71.
- GURJAR, P.S., SINGH, S.K., SINGH, A.K., VERMA, M.K. 2015. Field reaction and biochemical response of grape genotypes to anthracnose incidence under sub-tropical conditions. *International Journal of Natural Sciences*, 6 (2): 248-255.
- HAMMER, P.E. & EVENSEN, K.B. 1994. Defferences Between Rose Cultivars in Susceptibility to Infection by *Botrytis cinerea*. *Phytopathogy*, 84(11): 1305-1312.
- HART, K.H., MAGAREY, R.D., EMMETT, R.W., MAGAREY, P.A. 1993. Susceptibility of grapevine selections to black spot (anthracnose) *Elsinoë ampelina*. *Australian Grapegrower & Winemaker*, 352: 85-7.

- HOLSCHUH, H.J. 2000. Isolamento, purificação e caracterização bioquímica de peroxidase da carambola (*Averrhoa carambola*, L.). Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas.
- HORRIDGE, G.A. & TAMM, S.L. 1969. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliar motion. *Science*, 13: 871-818.
- HYUN, J.W., PAUDYAL, D.P., HWANG, R. 2015. Improved method to increase conidia production from isolates of different pathotypes of citrus scab pathogen *Elsinoë* spp. *Research in Plant Disease*, 21: 231-234.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2019. Banco de Dados Agregados. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA (Banco de Tabelas Estatísticas). Available from <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil> [accessed 27 March 2019].
- IFRIM, C., JIȚĂREANU, C.D., SLABU, C., MARTA, A.E. 2012. Aspects Regarding The Calcium Oxalate Crystals At The Grapevines Cultivated In Iași And Cotnari Vineyards. *Lucrări Științifice*, 55(2): 73-78.
- JAMADAR, M.M. 2007. Etiology, epidemiology and management of Anthracnose of grapevine. Thesis (Doctorate) – University of Agricultural Sciences, Dharwad, 140p.
- JENSEN, W.A. 1962. Botanical histochemistry: principle and practice. San Francisco: W.H. Freeman, 408p.
- JERBA, V. de F., RODELLA, R.A., FURTADO, E.L. 2005. Relação entre a estrutura foliar de feijoeiro e a pré-infecção por *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 40(3): 217-223.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill, 523p.
- JULKUNEN-TIITO, R. 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 33(2): 213-217.
- KARNOVSKY, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27: 137-138.
- KELLER, M. 2010. The Science of Grapevines - Anatomy and Physiology. Washington, USA: Elsevier.
- KERSTIENS, G. 1996. Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure-function relationships. *Trends in Plant Science*, 1: 125-129.

- KHAN, A.A. & ROBINSON, D.S. 1994. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. *Food Chemistry*, 49: 407-410.
- KONO, A., SATO, A., BAN, Y., MITANI, N. 2013. Resistance of *Vitis* germplasm to *Elsinoë ampelina* (de Bary) Shear evaluated by lesion number and diameter. *HortScience*, 48: 1433-9.
- KONO, A., NAKANO, M., SUZAKI, K., SATO, A., MITANI, N., BAN, Y. 2014. The Interaction of *Elsinoë ampelina* with *Vitis vinifera*. *Acta Horticulturae*, 1046: 121-126.
- KORTEKAMP, A. & ZYPRIAN, E. 1999. Leaf Hairs as a Basic Protective Barrier against Downy Mildew of Grape. *Journal of Phytopathology*, 147: 453-459.
- LIMA, E.D.P. de A., PASTORE, G.M., LIMA, C.A. de A. 2001. Purificação da enzima polifenoloxidase (PFO) de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) madura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21(1): 98-104.
- LOBATO, A.K.S., GONÇALVES-VIDIGAL, M.C., VIDIGAL FILHO, P.S., COSTA, R.C.L., CRUZ, F.J.R., SANTOS, D.G.C., SILVA, C.R., SILVA, L.I., SOUSA, L.L. 2009. Changes in photosynthetic pigment and carbohydrate content in common bean cultivars infected by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plant, Soil and Environment*, 55(2): 58-61.
- MABRY, T.J., MARKHAM, K.R., THOMAS, M.B. 1970. Reagents and procedures for the ultraviolet spectral analysis of flavonoids. In: _____. The systematic identification of flavonoids. New York: Springer-Verlag, 33-36.
- MADHAVI, K.J., SUJATHA, M., REDDY, D.R.R., RAO, C. 2005. Biochemical characterization of resistance against *Alternaria helianthi* in cultivated and wild sunflowers. *Helia*, 28(43): 13-24.
- MAIA, J.D.G. & RITSCHER, P.S. 2015. Novas cultivares de videira para elaboração de suco e para mesa. In.: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 14., 2015, Fraiburgo, SC. Anais...(v.2 - Resumos). Caçador: Epagri, 2: 81-90.
- MARQUES, J.P.R., AMORIM, L., SILVA-JÚNIOR, G.J., SPÓSITO, M.B., APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. 2014. Structural and biochemical characteristics of citrus flowers associated with defence against a fungal pathogen. *AoB Plants*, 7.

- MELLO, L.M.R. de, MACHADO, C.A.E., SILVA, S.M.R. da, ZANESCO, R. 2017. Dados cadastrais da viticultura do Rio Grande do Sul: 2013 a 2015. In: MELLO, L.M.R. de, MACHADO, A.C.E. (Eds) Cadastro Vitícola do Rio Grande do Sul – 2013 a 2015. Embrapa Uva e Vinho, 9-30. Available from <http://www.cnpuv.embrapa.br/cadastro-viticola/rs-2013-2015/dados/obracompleta.html> [accessed 25 January 2019]
- MELLO, L.M.R. de. 2016. Relatório da avaliação de impactos da uva Niagara Rosada para regiões tropicais – 2015. Embrapa Uva e Vinho, 14p.
- MIERZIAK, J., KOSTYN, K., KULMA, A. 2014. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules*, 19(10): 16240-16265.
- MIRICA, I. 1994. Anthracnose. In: PEARSON, R.C., GOHEEN, A.C. (Eds.). Compendium of grape diseases. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, 18-19.
- MONTEIRO, A., TEIXEIRA, G., LOPES, C.M. 2013. Comparative leaf micromorphoanatomy of *Vitis vinifera* spp. *vinifera* (Vitaceae) red cultivars. *Ciencia e Tecnica Vitivinicola*, 28(1): 19-28.
- MURRIA, S. 2017. Physiological and anatomical reaction of grape (*Vitis vinifera* L.) genotypes to anthracnose. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Básicas e Humanitárias, Universidade Agrícola de Punjab, Ludhiana.
- MURRIA, A., KAUR, N., ARORA, N., MAHAL, A.K. 2018a. Field reaction and metabolic alterations in grape (*Vitis vinifera* L.) varieties infested with anthracnose. *Scientia Horticulturae*, 235: 286-293.
- MURRIA, S., KAUR, N., ARORA, N.K. 2018b. Post Infectious Biochemical Changes Induced by Mealybug *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in Leaves of Superior Seedless Grapes. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 31(6): 1-7.
- MURRIA, S., KAUR, N., ARORA, A., ARORA, N.K. 2018c. Biochemical characterization of superior seedless variety of grape (*Vitis vinifera* L.) for resistance to anthracnose. *Indian Phytopathology*, 71(3): 399-405.
- NAJMADDIN, C. 2014. Leaf anatomy and palynological differences among selected cultivars of *Vitis vinifera* and *Parthenocissus quinquefolia* (Vitaceae). *Species*, 9(21): 6-12.

- NASCIMENTO-GAVIOLI, M.C.A. 2014. Proteômica e histopatologia associadas aos mecanismos de infecção e defesa da videira (*Vitis* sp.) ao patógeno *Plasmopara viticola* (Berk. & M. A. Curtis) Berl. & de Toni. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis.
- NAVARRO, B.L., MARQUES, J.P.R., APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B., SPÓSITO, M.B. 2019. Histopathology of *Phakopsora euvitis* on *Vitis vinifera*. European Journal of Plant Pathology. Available from <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01719-w>.
- NUNES, N.R. da S.B. de. 2009. Características morfo-anatómicas de cultivares tintas de videira (*Vitis vinifera* L.). Dissertação (Mestrado) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- OKTAY, M., KUFREVIOGLU, I., KOCAÇALISKAN, I., SAKIROGLU, H. 1995. Polyphenoloxidase from Amasya apple. Journal of Food Science, 60(3): 494-496.
- PASCHOLATI, S.F. & DALIO, R.J.D. 2018. Fisiologia do Parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., REZENDE, J.A.M. Manual de Fitopatologia Volume I: Princípios e Conceitos. 5ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 424-450.
- PAUDYAL, D.P. & HYUN, J.W. 2015. Physical Changes in Satsuma Mandarin Leaf after Infection of *Elsinoë fawcettii* Causing Citrus Scab Disease. The Plant Pathology Journal, 31(4): 421-427.
- PAUDYAL, D.P., HYUN, J.W., HWANG, R.Y. 2017. Infection and symptom development by citrus scab pathogen *Elsinoë fawcettii* on leaves of satsuma mandarin. European Journal of Plant Pathology, 148(4): 807-16.
- RASBAND, W.S. 2006. Image J, U. S. Nacional Institute of Health, Bethesda, Maryland.
- RIEDERER, M. 2006. Introduction: biology of the plant cuticle. In: RIEDERER, M., MÜLLER, C. Biology of the Plant Cuticle. Annual Plant Reviews, Vol. 23. Blackwell publishing, Oxford, UK., 1:1-10.
- SAKAI, W.S. 1973. Simple Method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. Stain Technology, 48: 247-248.
- SALEM-FNAYOU, A.B., BOUAMAMA, B., GHORBEL, A., MLIKI, A. 2011. Investigations on the Leaf Anatomy and Ultrastructure of Grapevine (*Vitis vinifera*) Under Heat Stress. Microscopy Research and Technique, 74:756-762.

- SANTOS, A.C.R. de F. 2014. Morfoanatomia foliar de onze cultivares de videira (*Vitis vinifera* L. subsp. *Vinifera*). Dissertação (Mestrado) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa.
- SANTOS, R.F., CIAMPI-GUILLARD, M., AMORIM, L., MASSOLA JÚNIOR, N.S., SPÓSITO, M.B. 2018a. Aetiology of anthracnose on grapevine shoots in Brazil. *Plant Pathology*, 67: 692-706.
- SANTOS, R.F., SPOSITO, M.B., AYRES, M.R., SOSNOWSKI, M. 2018b. In vitro production of conidia of *Elsinoë ampelina*, the causal fungus of grapevine anthracnose. *European Journal of Plant Pathology*, 152: 815-821.
- SANTOS, R.F.D., SPÓSITO, M.B., AYRES, M.R., SOSNOWSKI, M.R. 2018c. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Elsinoë ampelina*, the causal agent of grapevine anthracnose in Brazil and Australia. *Journal of Phytopathology*, 166(3): 187-198.
- SANTOS, I.B. dos, LOPES, M. da S., TSCHOEKE, B.A.P., VERSSANI, B.A.W., FIGUEREDO, E.F., CATALDI, T.R., MARQUES, J.P.R., SILVA, L.D., LABATE, C.A., QUECINE, M.C., BINI, A.P. 2019. The Eucalyptus cuticular waxes contribute in preformed defense against *Austropuccinia psidii*. *Frontiers in plant science*, 9: 1-13.
- SHEAR, C.L. 1929. The life history of *Sphaceloma ampelinum* de Bary. *Phytopathology*, 19: 673-679.
- SILVA, L.M., ALQUINI, Y., CAVALLET, V.J. 2005. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. *Acta Botanica Brasilica*, 19(1): 183-194.
- SILVA, M.C. da & ALVES, L.C. 2014. A Produção de Vinhos na América do Sul - Comparativo entre Brasil e os Países Produtores do Continente. V Encontro Semintur Jr. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 14p.
- SKADHAUGE, B., THOMSEN, K.K., WETTSTEIN, D.V. 1997. The role of the barley testa layer and its flavonoid content in resistance to *Fusarium* infections. *Hereditas*, 126: 147-160.
- SOARES, J.M. & LEÃO, P.C. de S. 2009. (Ed.). A vitivinicultura no Semiárido brasileiro. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 756 p.
- SÔNEGO, O.R., GARRIDO, L. da R., GRIGOLETTI JÚNIOR, A. 2005. Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil. Circular Técnica, Embrapa Uva e Vinho. Bento Gonçalves/RS, 32p.

- SOUSA, J.S.I. de. 1959. Mutações somáticas na videira Niágara. *Bragantia*, Campinas, 18(27): 387-415.
- SOUZA LEÃO, P.C. de. 2005. Características da uva 'Thompson Seedless' no Vale do São Francisco. Comunicado Técnico, 124. Petrolina: Embrapa/CPATSA, 8p.
- SOUZA, R.R.S. 2008. Caracterização anatômica quantitativa e composição de óleos essenciais em três estágios foliares de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu.
- SWANEPOEL, J.J. & VILLIERS, C.E. de. 1987. A Numerical-Taxonomic classification of *Vitis* spp. and Cultivars Based on Leaf Characteristics. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 8(2): 31-35.
- TAWARE, P.B., DHUMAL, K.N., OULKAR, D., PATIL, S., BANERJEE, K. 2010. Phenolic alterations in grape leaves, berries and wines due to foliar and cluster powdery mildew infections. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1:1-14.
- TEIXEIRA, G., MONTEIRO, A., NUNES, N., LOPES, C. 2009. Anatomia foliar de cultivares tintas de videira (*Vitis vinifera* L.). *Proceedings of VI Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas: XII Congreso Nacional [de la Sociedad Española] de Ciencias Hortícolas*, 839-843.
- TONIETTO, J. 2003. Clima. In: KUHN, G.B. (Ed) *Uvas para processamento: Produção. Aspectos Técnicos*. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Frutas do Brasil 34: 27-32.
- TREUTTER, D. 2005. Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis. *Plant Biology*, 7: 581-591.
- VANDERPLANK, J. E. 1984. *Disease Resistance in Plants*. 2ed., 194p.
- WHITHAM, F.H., BLAYDES, D.F., DEYLIN, R.M. 1971. *Experiments in Plant Physiology*. New York, D. VanNostrand Company, 55-58.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Medida dos caracteres foliares (média $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste Tukey ($p > 0,05$) para as cultivares de *Vitis* spp. ('Niagara Rosada', 'Thompson Seedless' e 'Pinot Noir') na idade 4 dias após o brotamento. Diferentes letras em uma mesma linha representam diferenças significativas entre as cultivares.

Parâmetros	'Niagara Rosada'	'Thompson Seedless'	'Pinot Noir'
Área foliar (cm ²)	7,63 $\pm$ 2,91 a	5,16 $\pm$ 1,05 b	5,44 $\pm$ 1,43 ab
Índice estomático		0,068 $\pm$ 0,02 a	0,033 $\pm$ 0,02 b
Idioblastos (/0,307039 mm ²)	19,88 $\pm$ 4,39 a	16,4 $\pm$ 4,54 b	10,56 $\pm$ 3,81 c
Espessura cutícula adaxial (μ m)	0,91 $\pm$ 0,1 b	0,89 $\pm$ 0,14 b	1,3 $\pm$ 0,16 a
Espessura parede periclinal externa adaxial (μ m)	1,49 $\pm$ 0,26 b	1,61 $\pm$ 0,22 a	1,59 $\pm$ 0,21 a
Espessura parede periclinal externa abaxial (μ m)	0,98 $\pm$ 0,18 c	1,24 $\pm$ 0,16 a	1,07 $\pm$ 0,16 b
Altura células epidérmicas adaxial (μ m)	14,75 $\pm$ 0,88 b	18,11 $\pm$ 1,61 a	17,68 $\pm$ 1,29 a
Altura células epidérmicas abaxial (μ m)	8,31 $\pm$ 1,18 c	12,36 $\pm$ 1,32 a	11,09 $\pm$ 1,15 b
Espessura mesofilo (μ m)	59,57 $\pm$ 4,48 b	72,42 $\pm$ 8,1 a	70,26 $\pm$ 8,58 a
Espessura parênquima paliçádico (μ m)	22,31 $\pm$ 2,46 c	26,8 $\pm$ 2,57 a	25,2 $\pm$ 3,67 b
Espessura parênquima lacunoso (μ m)	38,16 $\pm$ 3,84 b	46,44 $\pm$ 7,28 a	45,15 $\pm$ 6,17 a

APÊNDICE B. Medida dos caracteres foliares (média $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste Tukey ($p > 0,05$) para as cultivares de *Vitis* spp. ('Niagara Rosada', 'Thompson Seedless' e 'Pinot Noir') na idade 11 dias após o brotamento (não inoculadas). Diferentes letras em uma mesma linha representam diferenças significativas entre as cultivares.

Parâmetros	'Niagara Rosada'	'Thompson Seedless'	'Pinot Noir'
Área foliar (cm ²)	45,18 $\pm$ 5,22 b	73,16 $\pm$ 14,34 a	39,38 $\pm$ 7,2 b
Índice estomático		0,09 $\pm$ 0,03 a	0,06 $\pm$ 0,02 b
Idioblastos (/0,307039 mm ²)	7,72 $\pm$ 3,16 b	10,88 $\pm$ 4,29 a	6,84 $\pm$ 2,19 b
Espessura cutícula adaxial (μ m)	1,64 $\pm$ 0,32 b	0,91 $\pm$ 0,13 c	1,83 $\pm$ 0,32 a
Espessura parede periclinal externa adaxial (μ m)	1,75 $\pm$ 0,31 b	1,15 $\pm$ 0,2 c	2,07 $\pm$ 0,37 a
Espessura parede periclinal externa abaxial (μ m)	1,05 $\pm$ 0,15 b	0,87 $\pm$ 0,12 c	1,51 $\pm$ 0,21 a
Altura células epidérmicas adaxial (μ m)	19,98 $\pm$ 2,27 a	19,26 $\pm$ 3,23 a	20,48 $\pm$ 2,45 a
Altura células epidérmicas abaxial (μ m)	11,34 $\pm$ 1,98 a	11,69 $\pm$ 1,77 a	11,26 $\pm$ 1,1 a
Espessura mesofilo(μ m)	77,82 $\pm$ 11,59 b	75,23 $\pm$ 9,47 b	82,93 $\pm$ 6,97 a
Espessura parênquima paliçádico (μ m)	34,84 $\pm$ 3,62 a	28,25 $\pm$ 4,29 b	36,75 $\pm$ 5,93 a
Espessura parênquima lacunoso (μ m)	44,11 $\pm$ 9,07 a	47,64 $\pm$ 7,76 a	47,38 $\pm$ 6,45 a

APÊNDICE C. Conteúdo foliar de compostos fenólicos totais (mgTAE.g⁻¹), flavonoides (mgRE.g⁻¹), clorofila (mg.g⁻¹ massa fresca) a, b e total, atividades (U.ml⁻¹) de peroxidase e polifenoloxidase (média ± desvio padrão) e resultado do teste Tukey (p > 0,05) para as cultivares de *Vitis* spp. 'Niagara Rosada', 'Thompson Seedless' (TS) e 'Pinot Noir' (PN), aos 4 e 11 dias após o brotamento (dab) não inoculadas. Diferentes letras em uma mesma linha representam diferenças significativas entre os cultivares para cada tratamento.

Parâmetros	4 dab			11 dab		
	NR	TS	PN	NR	TS	PN
Compostos Fenólicos Totais	9,16 ± 0,71 b	16,38 ± 0,3 a	16,64 ± 1,13 a	5,25 ± 0,53 b	2,37 ± 0,30 b	19,79 ± 2,32 a
Flavonoides	0,67 ± 0,30 b	0,69 ± 0,09 b	1,05 ± 0,10 a	0,70 ± 0,07 b	0,15 ± 0,00 c	1,28 ± 0,15 a
Clorofila a	0,217 ± 0,05 a	0,223 ± 0,05 a	0,273 ± 0,01 a	0,497 ± 0,02 b	0,621 ± 0,03 a	0,497 ± 0,05 b
Clorofila b	0,259 ± 0,10 a	0,383 ± 0,04 a	0,174 ± 0,08 a	0,243 ± 0,05 b	0,303 ± 0,04 a	0,229 ± 0,03 b
Clorofila Total	0,584 ± 0,08 a	0,631 ± 0,10 a	0,590 ± 0,04 a	0,751 ± 0,03 b	1,041 ± 0,04 a	0,811 ± 0,02 b
Atividade Peroxidase	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	72,0 ± 10,51 a	6,87 ± 2,12 b
Atividade Polifenoloxidase	82,73 ± 24,73 a	33,33 ± 8,26 b	44,4 ± 10,61 ab	4,93 ± 1,17 b	5,53 ± 0,58 b	21,87 ± 6,02 a