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

Antracnose da videira: análise histopatológica da interação entre *Elsinoë ampelina* (de Bary) Shear e *Vitis labrusca* L. ‘Niagara Rosada’

Zélia Valente Braga

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

**Piracicaba
2020**

Zélia Valente Braga
Engenheira Agrônoma

Antracnose da videira: análise histopatológica da interação entre *Elsinoë ampelina* (de Bary) Shear e *Vitis labrusca* L. ‘Niagara Rosada’

Orientador:
Profa. Dra. **BEATRIZ APPEZZATO DA GLÓRIA**

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

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Braga, Zélia Valente

Antracnose da videira: análise histopatológica da interação entre *Elsinoë ampelina* (de Bary) Shear e *Vitis labrusca* L. 'Niagara Rosada' / Zélia Valente Braga. - - Piracicaba, 2020.

69 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. alterações bioquímicas 2. estruturas semelhantes à ascos 3. histopatologia 4. *Sphaceloma ampelinum* 5. videira . I. Título

Dedico

*A minha querida mãe Regina,
aos meus irmãos Danielle e Francisco
e a nossa Catarina.*

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela possibilidade da realização do curso de Doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro através do projeto Temático nº 2013/24003-9.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Finance Code 001, pela concessão das bolsas de estudos.

À Prof^a. Dr^a. Beatriz Appezato da Glória por toda paciência, generosidade e dedicação com que conduziu sua excelente orientação.

À Prof^a. Dr^a. Lilian Amorim por seu direcionamento, sugestões e correções.

Ao Dr. Ricardo Feliciano dos Santos pelo auxílio na condução dos experimentos fitopatológicos e correções.

Ao Prof. Dr. Cláudio Lima de Aguiar e a Ma. Gislene Roberta Manarim do Laboratório de Tecnologia em Sucroderivados (Hugot) pela realização das análises bioquímicas, estatísticas e correções.

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

A todo grupo de pesquisa do Laboratório de Anatomia vegetal da ESALQ/USP, especialmente a Ma. Marli Soares pelo agradável convívio e pelos treinamentos ministrados sempre com muito profissionalismo, respeito e sorrisos.

Ao Me. Alexandre Ferraro pela correção do Abstract, além de sua valiosa amizade e parceria durante esses quatro anos.

Aos amigos: Fábria Barbosa, Paul Lineker, Mariane Raposo, Vanessa Macedo e Ordinela Miranda que tornaram esta jornada mais feliz.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	9
REFERÊNCIAS	12
2. HISTOPATOLOGIA DA INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO DE <i>ELSINOË AMPELINA</i> EM FOLHAS DE <i>VITIS LABRUSCA</i> L. ‘NIAGARA ROSADA’.....	15
RESUMO.....	15
ABSTRACT	15
2.1. INTRODUÇÃO	16
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.2.1. Material vegetativo, isolado e inoculação	17
2.2.2. Análise do processo de infecção	18
2.2.2.1. Microscopia eletrônica de varredura	18
2.2.3. Análise do processo de colonização.....	19
2.2.3.1. Microscopia de luz e epifluorescência.....	19
2.2.3.2. Microscopia eletrônica de transmissão	19
2.3. RESULTADOS	20
2.4. DISCUSSÃO	25
REFERÊNCIAS	29
3. ASPECTOS MORFO-HISTOLÓGICOS E HISTOQUÍMICOS DAS LESÕES CAUSADAS POR <i>ELSINOË AMPELINA</i> EM GAVINHAS, CAULES E BAGAS DE <i>VITIS LABRUSCA</i> L. ‘NIAGARA ROSADA’	33
RESUMO.....	33
ABSTRACT	33
3.1. INTRODUÇÃO	34
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.2.1. Material vegetativo e isolado.....	36
3.2.2. Inoculação e coleta de amostra	36
3.2.3. Processo de colonização e reprodução	37
3.2.3.1. Microscopia de luz	37
3.2.3.2. Microscopia de epifluorescência.....	37
3.2.3.3. Microscopia eletrônica de varredura	38
3.3. RESULTADOS	38
3.4. DISCUSSÃO	45
REFERÊNCIAS	49
4. ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM FOLHAS DE <i>VITIS LABRUSCA</i> L. ‘NIAGARA ROSADA’ EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR <i>ELSINOË AMPELINA</i>.....	55
RESUMO.....	55
ABSTRACT	55
4.1. INTRODUÇÃO	56
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	57
4.2.1. Material vegetativo e inoculação	57
4.2.2. Extrato metanólico.....	58
4.2.3. Compostos fenólicos totais.....	59
4.2.4. Flavonoides totais	59
4.2.5. Clorofilas <i>a</i> , <i>b</i> e total.....	59
4.2.6. Atividades Enzimáticas.....	60
4.2.6.1. Atividade de peroxidase.....	60
4.2.6.2. Atividade de polifenoloxidase	60
4.2.7. Análises Estatísticas.....	61
4.3. RESULTADOS	61
4.4. DISCUSSÃO	63
REFERÊNCIAS	65
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69

Antracnose da videira: análise histopatológica da interação entre *Elsinoë ampelina* (de Bary) Shear e *Vitis labrusca* L. ‘Niagara Rosada’

RESUMO

A antracnose da videira é causada pelo ascomiceto *Elsinoë ampelina* Shear e causa sérios prejuízos a cultivares de uva de mesa, pois danifica a aparência das bagas comprometendo diretamente a comercialização. A despeito da importância dessa doença, até recentemente não havia estudos histopatológicos sobre o assunto que pudessem esclarecer como ocorre a infecção e a colonização nos tecidos, bem como entender as possíveis respostas de defesa da planta ao fungo. Portanto, os objetivos do presente estudo foram: i. Caracterizar os processos de infecção e colonização de *E. ampelina* em folhas jovens da videira ‘Niagara Rosada’; ii. Identificar os aspectos morfo-histológicos e histoquímicos das lesões causadas por *E. ampelina* em folhas, caules, gavinhas e bagas de ‘Niagara Rosada’; iii. Observar as alterações bioquímicas em folhas jovens de ‘Niagara Rosada’ em resposta à infecção por *E. ampelina*. Para as análises histopatológicas utilizaram-se técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. As avaliações bioquímicas incluíram alguns indicadores considerados importantes na defesa contra a antracnose, tais como: compostos fenólicos totais, flavonoides totais, clorofilas *a*, *b* e total e atividades enzimáticas de peroxidase e polifenoloxidase. As fases do processo de infecção (germinação e penetração) foram observadas apenas na lâmina foliar. A germinação dos conídios ocorreu 24 horas após a inoculação (hai), os quais emitiram de um a cinco tubos germinativos, sendo predominantemente um ou dois. Sob os tubos germinativos houve degradação cuticular. Estruturas semelhantes à apressórios foram raras e hifas monilioides e ramificadas foram observadas 48 horas após a inoculação. A penetração do patógeno ocorreu 24hai na forma direta e foi visualizada apenas na superfície adaxial devido à alta densidade de tricomas na superfície abaxial. O processo de colonização foi verificado em folhas, gavinhas, caules e bagas. Em todos os órgãos, a colonização ocorreu de forma inter e intracelular, inclusive no interior dos elementos traqueais que apresentam intensa alteração parietal. E, à medida que as lesões se tornavam mais necróticas, ocorria um acentuado colapso celular formando um tecido de aspecto ascostromático. Em todos os órgãos, a reprodução do patógeno ocorreu aproximadamente 15 dias após a inoculação, sendo identificada através da formação de células conidiogênicas na superfície da lesão. Curiosamente, essas células também foram visualizadas no lume dos elementos de vaso do caule, fato incomum para a espécie. Além das células conidiogênicas, na nervura central, em pecíolos, gavinhas e caules, também houve a formação de estruturas semelhantes a ascos imersas no tecido de aspecto ascostromático, sendo mais frequentes em pecíolos e gavinhas. Em bagas foi possível visualizar que as estruturas semelhantes a ascos eram bitunicadas e continham estruturas semelhantes a ascósporos com 2 a 3 células num arranjo aleatório. Tais estruturas eram hialinas providas de septos transversais e apresentaram tamanho médio de 11,0 µm de comprimento e 4,6 µm de largura. Quanto aos mecanismos estruturais de defesa, em folhas de ‘Niagara Rosada’ não foi verificada nenhuma alteração estrutural que pudesse ser atribuída à resposta de defesa da planta à infecção. Porém, em caules observou-se a formação de tilos nos elementos de vaso adjacentes às lesões. Em gavinhas, caules e bagas, sob a área lesionada, as células do parênquima exibiram hipertrofia seguida de hiperplasia celular, formando uma periderme de cicatrização. Sobre os mecanismos bioquímicos de defesa houve aumento no teor de flavonoides e da atividade da polifenoloxidase após a infecção por *E. ampelina*. Porém, as alterações estruturais e bioquímicas não foram suficientes para impedir o avanço do fungo nos tecidos.

Palavras-chave: Alterações bioquímicas; Estruturas semelhantes à ascos; Histopatologia; *Sphaceloma ampelinum*; Videira

Anthracnose of grapevine: histopathological analysis of the interaction between *Elsinoë ampelina* (de Bary) Shear and *Vitis labrusca* L. 'Niagara Rosada'

ABSTRACT

The grapevine anthracnose is caused by the ascomycete *Elsinoë ampelina* Shear and causes serious damage to table grape cultivars, as it damages the berries appearance compromising their commercialization. Despite the importance of this disease, until recently there were no histopathological studies on the subject that could clarify how infection and colonization occur in the tissues, as well as understanding the possible plant defence responses to the fungus. Therefore, the present study aimed: *i.* Characterize the infection and colonization processes of *E. ampelina* in young leaves of grapevine 'Niagara Rosada'; *ii.* Identify the morpho-histological and histochemical aspects of the lesions caused by *E. ampelina* on 'Niagara Rosada' leaves, stems, tendrils, and berries; *iii.* Observe the biochemical changes in young leaves of 'Niagara Rosada' in response to infection by *E. ampelina*. For histopathological analyzes, light microscopy and electron scanning and transmission microscopy techniques were used. Biochemical evaluations included some indicators considered important in the defense against anthracnose, such as: total phenolic compounds, total flavonoids, chlorophylls *a*, *b* and total and enzymatic activities of peroxidase and polyphenoloxidase. The infection process stages (germination and penetration) were observed only in the leaf blade. The germination of the conidia occurred 24 hours after inoculation (hai), which emitted from one to five germ tubes, being predominantly one or two. Cuticular degradation occurred under the germ tubes. Structures similar to appressoria were rare and, monilioid and branched hyphae were observed 48 hours after inoculation. Pathogen penetration occurred 24 hai in the direct form and was seen only on the adaxial surface due to the high density of trichomes on the abaxial surface. The colonization process was verified in leaves, tendrils, stems, and berries. In all organs, colonization occurred inter- and intracellularly, including inside the tracheal elements that presented intense parietal alteration. And, as the lesions became more necrotic, there was a marked cellular collapse forming an ascostromatic-like tissue. In all organs, the pathogen reproduction occurred approximately 15 days after inoculation, were identified through the formation of conidiogenic cells on the surface of the lesion. Interestingly, these cells were also visualized inside the stem vessel elements, an unusual fact for the species. In addition to the conidiogenic cells, there was also the formation of ascus-like structures immersed in the ascostromatic aspect tissue in the midribs, petioles, tendrils, and stems, being more frequent in petioles and tendrils. In berries, it was possible to visualize that the ascus-like structures were bitunicated and contained structures similar to ascospores with 2 to 3 cells in a random arrangement. Such structures were hyaline with transversal septa and had an average size of 11.0 µm in length and 4.6 µm in width. As for the structural defense mechanisms, in leaves of 'Niagara Rosada', no structural changes were verified that could be related to the defense of the plant in response to infection. However, in stems, the formation of tylose was observed in the vessel elements adjacent to the lesions. In tendrils, stems, and berries, underlying the injured area, the cells of the parenchyma exhibited hypertrophy followed by cellular hyperplasia, forming a healing periderm. Regarding the biochemical defense mechanisms, there was an increase in the flavonoids content and polyphenoloxidase activity after infection by *E. ampelina*. However, both structural and biochemical changes were not sufficient to prevent the fungi spreading in the tissues.

Keywords: Biochemical alteration; Ascus-like structures; Grapevine; Histopatology; *Sphaceloma ampelinum*

1. INTRODUÇÃO GERAL

De origem europeia, a antracnose é considerada uma das mais importantes doenças da videira (Shear 1929). Estudos na Índia e China associaram espécies de *Colletotrichum* como agentes causais da doença (Chowdappa et al. 2009; Sawant et al. 2012; Yan et al. 2015; Li et al. 2018). No entanto, no Brasil é causada, exclusivamente, por *Elsinoë ampelina* (de Bary) Shear (Santos 2018a).

Em 1873, de Bary caracterizou a fase assexuada ou anamórfica do fungo causador da antracnose da videira denominando-o *Sphaceloma ampelinum* de Bary (Shear 1929). Mais tarde, a fase sexuada ou telemórfica do patógeno foi descrita por Shear (1929) que atribuiu o nome *Elsinoë ampelina* (de Bary) Shear. No entanto, desde 2003 convencionou-se que um fungo deve possuir apenas uma nomenclatura (Hawksworth 2011). Assim, para gêneros pleomórficos como *Elsinoë* considera-se apenas o nome sexual ou telemórfico da espécie (Fan et al. 2017), sendo esse o adotado nesta pesquisa. Taxonomicamente, o patógeno está inserido no filo Ascomycota, classe dos Loculoascomycetes, ordem Myriangiales e família Elsinoaceae (Jayawardena et al. 2014). Está presente em todos os continentes e, no Brasil, pode ser encontrado nos estados de Minas Gerais, Pernambuco, Rio Grande do Sul e São Paulo, apenas em sua forma assexuada (EPPO 2018).

A antracnose pode atingir tanto *Vitis vinifera* (Kono et al. 2013; Li et al. 2018; Murria et al. 2018a) como *Vitis labrusca* (Barros et al. 2015; Santos et al. 2018b). Contudo, cultivares de uvas de mesa apresentam maior susceptibilidade à doença quando comparadas a uvas para vinho (Hart et al. 1993; Kono et al. 2013). Em levantamento realizado em dezembro de 2019 a produção total de uva no Brasil alcançou 1.445.705 toneladas em 75.731 hectares de área plantada (t/ha), com destaque para os estados do Rio Grande do Sul (663.423/42.502), Pernambuco (420.830/8.256), São Paulo (148.379/8.164), Bahia (74.142/2.069) e Santa Catarina (59.522/3.999) (IBGE 2019). Em 2018, quase metade da produção (48,61%) foi de uva de mesa, a qual ficou distribuída entre os estados de Pernambuco, Bahia e São Paulo (Maia; Mello 2018).

Entre as cultivares para consumo *in natura*, a ‘Niagara Rosada’ (*V. labrusca*) destaca-se como a mais produzida e o estado de São Paulo seu principal produtor, com produção concentrada entre os meses de dezembro a fevereiro (Mello 2016; Camargo 2017). Desenvolvida no ano de 1933 no município de Jundiaí-SP através da mutação somática da ‘Niagara Branca’ (*V. labrusca* L. x *V. vinifera* L.), a ‘Niagara Rosada’ transformou o cenário

vitícola paulista em menos de 10 anos, substituindo quase que completamente a cultivar que lhe deu origem, parte pela boa aceitação no mercado consumidor, parte pelo menor custo de produção, além da possibilidade de cultivo na entressafra das regiões produtoras tradicionais (Região Sul e Leste Paulista) (Sousa 1996). No entanto, doenças fúngicas como a antracnose podem ser de grande limitação na cadeia produtiva, caso a planta seja cultivada em condições ambientais propícias ao seu estabelecimento.

O desenvolvimento de *Elsinoë ampelina* é favorecido por ventos frios, umidade relativa superior a 90% e temperatura que pode variar de 2 °C até 32 °C, sendo 24 a 26°C a temperatura ótima (Brook 1973). E, embora as uvas de mesa como ‘Niagara Rosada’ sejam cultivadas, predominantemente, nos estados de Pernambuco, Bahia e São Paulo, estão distribuídas entre as latitudes 30° S (estado do Rio Grande do Sul) e 05° N (estado do Ceará), compreendendo uma ampla diversidade climática (Maia 2018). Dessa forma, a antracnose da videira pode ser um problema em todos os estados produtores. Os sintomas da doença atingem todos os órgãos aéreos da planta e incluem lesões necróticas circulares em folhas e bagas e longitudinais em caules e gavinhas, afetando o seu desenvolvimento (Brock 1973). Para cultivares de uva de mesa o prejuízo econômico é ainda maior, pois compromete a aparência das bagas inviabilizando sua comercialização.

Entre os estudos realizados sobre a antracnose da videira já foram elucidadas algumas informações para *V. vinifera* e híbridos envolvendo sua epidemiologia (Brook 1973; 1992; Thind et al. 2004; Carisse e Morissette-Thomas 2013) e a identificação de cultivares resistentes com base no número de lesões (Kono et al. 2013), respostas bioquímicas de defesa (Shankar e Jindal 2001; Gurjar et al. 2015; Murria et al. 2018a; 2018b) e marcadores genéticos (Kim et al. 2008). Porém, os aspectos histopatológicos da doença, bem como os mecanismos estruturais e bioquímicos de defesa ainda precisam ser totalmente compreendidos. Recentemente, alguns desses processos foram verificados para *V. vinifera* (Li et al. 2019) e *V. labrusca* (Braga et al. 2019; Muniz 2019), porém mais estudos são necessários para preencher as lacunas a respeito do ciclo das relações patógeno-hospedeiro, principalmente, aquelas envolvendo à infecção por *E. ampelina* em ‘Niagara Rosada’, dada sua importância no mercado de uvas para mesa no Brasil, onde a aparência dos frutos é fundamental para a comercialização. Há a necessidade de se elucidar quais os mecanismos envolvidos desde a germinação do esporo, a forma de penetração, colonização e reprodução do fungo, com ênfase nos mecanismos estruturais de resistência pré e pós-formados. Portanto, a presente pesquisa visa responder as seguintes questões:

- I) Como se dá o processo de infecção e de colonização de *Elsinoë ampelina* em folhas jovens da videira ‘Niagara Rosada’?
- II) Quais os aspectos morfo-histológicos e histoquímicos das lesões causadas por *E. ampelina* em folhas, caules, gavinhas e bagas da videira ‘Niagara Rosada’?
- III) Há alterações bioquímicas em folhas jovens da videira ‘Niagara Rosada’ em resposta à infecção por *E. ampelina*?

Para responder as questões, a Tese foi dividida em três capítulos como se pretende publicar:

Capítulo 2: Histopatologia da infecção e colonização por *Elsinoë ampelina* em folhas de *Vitis labrusca* L. ‘Niagara Rosada’ (já publicado na revista *European Journal Plant Pathology* sob o título: ‘Histopathology of infection and colonisation of *Elsinoë ampelina* on grapevine leaves’. DOI: 10.1007/s10658-019-01721-2.

Capítulo 3: Aspectos morfo-histológicos e histoquímicos das lesões causadas por *Elsinoë ampelina* em gavinhas, caules e bagas de *Vitis labrusca* L. ‘Niagara Rosada’.

Capítulo 4: Alterações bioquímicas em folhas de *Vitis labrusca* L. ‘Niagara Rosada’ em resposta à infecção por *Elsinoë ampelina*.

Referências

- Barros, L. B., Biasi, L. A., Carisse, O., & De Mio, L. L. M. (2015). Incidence of grape anthracnose on different *Vitis labrusca* and hybrid cultivars and rootstocks combination under humid subtropical climate. *Australasian Plant Pathology*, 44, 397-403.
- Braga, Z. V., Santos, R. F., Amorim, L., & Appezzato-da-Glória, B. (2019). Histopathology of infection and colonisation of *Elsinoë ampelina* on grapevine leaves. *European Journal of Plant Pathology*, 1-11.
- Brook, P. J. (1973). Epidemiology of grapevine anthracnose caused by *Elsinoë ampelina*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 16(3), 333-342.
- Brook, P. J. (1992). Epidemiology of grapevine anthracnose and downy mildew in an Auckland, New Zealand vineyard. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 20(1), 37-49.
- Carisse, O., & Morissette-Thomas, V. (2013). Epidemiology of grape anthracnose: Factors associated with defoliation of grape leaves infected by *Elsinoë ampelina*. *Plant disease*, 97(2), 222-230.
- Camargo, M. P., & Costa, C. R. (2017). Viabilidade econômica do cultivo de videira Niágara Rosada. *Revista iPecege*, 3(2), 52-85.
- Chowdappa, P., Reddy, G. S., Kumar, A., Rao, B. M., & Rawal, R. D. (2009). Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species causing anthracnose of grape in India. *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, 3, 71-77.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) (2018). *Elsinoë ampelina*. <https://gd.eppo.int/taxon/ELSIAM/distribution>. Acesso em 14 jan. de 2020.
- Fan, X. L., Barreto, R. W., Groenewald, J. Z., Bezerra, J. D. P., Pereira, O. L., Cheewangkoon, R., & Crous, P. W. (2017). Phylogeny and taxonomy of the scab and spot anthracnose fungus *Elsinoë* (Myriangiales, Dothideomycetes). *Studies in Mycology*, 87, 1-41.
- 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 science and nature*, 6(2), 248-255.
- Hart, K. M., Magarey, R. D., Emmett, R. W., & Magarey, P. A. (1993). Susceptibility of grapevine selections to black spot (anthracnose), *Elsinoë ampelina*. *Australian Grapegrower and Winemaker*, 85-85.

- Hawksworth, D. L. (2011). A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA fungus*, 2(2), 155-162.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2019). Levantamento sistemático da produção agrícola. <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588#resultado>. Acesso em 12 jan. de 2020.
- Jayawardena, R. S., Ariyawansa, H. A., Singtripop, C., Li, Y. M., Yan, J., Li, X., ... & Hyde, K. D. (2014). A re-assessment of Elsinoaceae (Myriangiales, Dothideomycetes). *Phytotaxa*, 176(1), 120-138.
- Kim, G. H., Yun, H. K., Choi, C. S., Park, J. H., Jung, Y. J., Park, K. S., ... & Kang, K. K. (2008). Identification of AFLP and RAPD markers linked to anthracnose resistance in grapes and their conversion to SCAR markers. *Plant breeding*, 127(4), 418-423.
- 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, 1433-1439.
- Li, Z., Dang, H., Yuan, X., He, J., Hu, Z., & Wang, X. (2018). Morphological characterization and optimization of conditions for conidial production of *Elsinoë ampelina*, the causal organism of grapevine anthracnose. *Journal of Phytopathology*, 166(6), 420-428.
- Maia, J. D. G., RITSCHER, P., & Lazzarotto, J. J. (2018). A viticultura de mesa no Brasil: produção para o mercado nacional e internacional. *Embrapa Uva e Vinho-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Mello, L.M.R. de. (2016). Relatório da avaliação de impactos da uva Niagara Rosada para regiões tropicais – 2015. Embrapa Uva e Vinho, 14p.
- Mello, L. M. R. (2018). Panorama da produção de uvas no Brasil. *Embrapa Uva e Vinho-Nota Técnica/Nota Científica (ALICE)*.
- Muniz, L. F. (2019). Características estruturais e químicas foliares de *Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L. e sua relação com a resposta à antracnose da videira (Dissertação), Universidade de São Paulo).
- Murria, S., 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, A., & Arora, N. K. (2018b). Biochemical characterization of superior seedless variety of grape (*Vitis vinifera* L.) for resistance to anthracnose. *Indian Phytopathology*, 71(3), 399-405.
- Shankar, A. V., & Jindal, P. C. (2001). Biochemical resistance of grape genotypes against anthracnose. *Indian Journal of Agricultural Research*, 35(1), 44-47.
- Santos, R. F., Ciampi- Guillard, M., Amorim, L., Massola, N. S., & Spósito, M. B. (2018a). Aetiology of anthracnose on grapevine shoots in Brazil. *Plant pathology*, 67(3), 692-706.
- Santos, R. F. D., Spósito, M. B., Ayres, M. R., & Sosnowski, M. R. (2018b). Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Elsinoë ampelina*, the causal agent of grapevine anthracnose in Brazil and Australia. *Journal of Phytopathology*, 166(3), 187-198.
- Sawant, I. S., Narkar, S. P., Shetty, D. S., Upadhyay, A., & Sawant, S. D. (2012). Emergence of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato as the dominant pathogen of anthracnose disease of grapes in India as evidenced by cultural, morphological and molecular data. *Australasian Plant Pathology*, 41(5), 493-504.
- Sousa, J. S. I. (1996). *Uvas para o Brasil*. Piracicaba: Fealq, 2ed. 791p.
- Shear, C. L. (1929). The life-history of *Sphaceloma ampelina* de Bary. *Phytopathology*, 19, 673-679.
- Thind, T. S., Arora, J. K., Mohan, C., & Raj, P. (2004). Epidemiology of powdery mildew, downy mildew and anthracnose diseases of grapevine. In *Diseases of Fruits and Vegetables Volume I*. Springer, Dordrecht. 621-638.
- Yan, J. Y., Jayawardena, M. M. R. S., Goonasekara, I. D., Wang, Y., Zhang, W., Liu, M., ... & Bahkali, A. (2015). Diverse species of *Colletotrichum* associated with grapevine anthracnose in China. *Fungal Diversity*, 71(1), 233-246.

2. HISTOPATOLOGIA DA INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO DE *ELSINOË AMPELINA* EM FOLHAS DE *VITIS LABRUSCA* L. ‘NIAGARA ROSADA’

Resumo

Elsinoë ampelina, o agente causal da antracnose da videira, infecta todas as partes suculentas da planta acima do solo, causando sérios prejuízos à produção. Porém, não há relatos histopatológicos dessa interação com os tecidos da videira. Assim, este estudo teve como objetivo compreender os processos de infecção e colonização de *E. ampelina* em folhas de *Vitis labrusca* ‘Niagara Rosada’ por microscopia de luz e por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Durante a germinação foram formados de um a cinco tubos germinativos por conídio, predominantemente um ou dois. Sob os tubos germinativos houve degradação cuticular. Estruturas semelhantes à apressórios foram raras. Hifas monilioides e ramificadas foram observadas 48 horas após a inoculação. A penetração direta ocorreu apenas na superfície adaxial devido à alta densidade de tricomas na superfície abaxial e conídios retidos nos tricomas foram frequentemente observados. O processo de colonização foi semelhante na lâmina foliar, nervura e pecíolo com a formação de hifas inter e intracelulares. Houve acúmulo de compostos fenólicos nas áreas infectadas; no entanto, não impediu o progresso da colonização. Os tecidos da lâmina foliar foram totalmente alterados pelo colapso celular e as células conidiogênicas foram observadas na superfície das lesões necróticas. Estruturas semelhantes a ascos foram observadas imersas no tecido totalmente alterado das nervuras foliares e nas áreas necróticas do pecíolo.

Palavras-chave: *Vitis labrusca*; *Sphaceloma ampelinum*; Sintomas necróticos; Penetração direta

Abstract

Elsinoë ampelina, the causal agent of grapevine anthracnose, infects all above ground succulent parts of the plant, causing serious yield losses. There are no histopathological reports on this pathogen interaction with grapevine tissues. This study aimed to understand the infection and colonisation processes of *E. ampelina* on *Vitis labrusca* ‘Niagara Rosada’ leaves by light, transmission and scanning microscopy. From one to five germ tubes per conidia were formed during conidia germination, predominantly one or two. Cuticle degradation was observed on plant surface underneath germ tubes and appressorium-like structures were rare. Monilioid and branched hyphae were observed 48 h post inoculation. Direct penetration occurred only on the adaxial leaf surface due to high trichome density on the abaxial leaf surface and conidia trapped on trichomes were frequently observed. The colonization process was similar in the leaf blade, veins and petiole with the formation of inter- and intracellular hyphae. Phenolic compounds accumulated in infected areas; however, they did not prevent the colonisation progress. Tissues of foliar blade were totally changed by cell collapse and conidiogenous cells were observed on the surface of necrotic lesions. Ascus-like structures were observed within deeply unstructured tissues of leaf veins and necrotic areas of the petiole.

Keywords: *Vitis labrusca*, *Sphaceloma ampelinum*, Direct penetration; Grapevine; Necrotic symptoms

2.1. Introdução

A viticultura no Brasil foi introduzida no século XVI por colonizadores europeus, mas sua produção aumentou somente a partir de 1960 com a utilização de uvas de mesa *Vitis vinifera* (Camargo et al. 2011). Ultimamente, cultivares adaptadas aos climas subtropical e tropical foram produzidas por programas brasileiros de melhoramento baseados em cruzamentos interespecíficos, especialmente com o uso de *Vitis labrusca* (Maia et al. 2015). No Brasil, as videiras são cultivadas entre as latitudes 9° a 30° S, em uma área de 74.114 ha, cuja produção atingiu 1,4 milhões de toneladas em 2018 (IBGE 2019). Contudo, um dos fatores limitantes dessa produção está relacionado, principalmente, a doenças como o míldio (*Plasmopara viticola*), a podridão uva madura (*Colletotrichum* spp.) e a antracnose (*Elsinoë ampelina*), frequentemente associadas a estações chuvosas (Amorim et al. 2016).

A antracnose é causada pelo ascomiceto *E. ampelina* e incide sobre regiões quentes e úmidas (Thind 2015; EPPO 2018). A doença é nativa do continente europeu e ocorre tanto em cultivares de *V. vinifera* (Kono et al. 2013; Li et al. 2018; Murria et al. 2018) como *V. labrusca* (Barros et al. 2015; Santos et al. 2018b). Em período de alta severidade causa ruptura dos ramos, atraso no desenvolvimento e amadurecimento de bagas, queda prematura de folhas e bagas, perda de atividade fotossintética e redução do vigor na estação subsequente (Thind et al. 2004; Carisse e Lefebvre 2011; Carisse e Morissette-Thomas 2013).

Folhas, ramos, gavinhas e frutos são suscetíveis à infecção nos estágios iniciais de desenvolvimento e altamente resistentes quando completamente desenvolvidos (Brook 1973; Thind et al. 2004; Thind 2015). Em folhas, surgem pequenas manchas marrons circulares (1–5 mm de diâmetro) que depois aumentam para 5 a 7 mm (Thind et al. 2004; Thind 2015). Lesões ao longo das nervuras das folhas, pecíolos, ramos e gavinhas são mais alongadas e deprimidas quando comparadas às lesões na lâmina foliar.

Em sua fase sexuada *E. ampelina* produz ascos, em cavidades piriformes, imersos em ascostroma. Cada asco contém oito ascósporos de três septos, medindo $15-16 \times 4,0-4,5 \mu\text{m}$ (Shear 1929). A fase assexuada produz conídios cilíndricos a oblongos com extremidades arredondadas, asseptados, medindo $3,5-7,0 \times 2,0-3,5 \mu\text{m}$ (Santos et al. 2018b). A taxa de germinação de conídios aumenta com a temperatura, chegando a 80% a 25 °C (Li et al. 2018), assim como o período de incubação que pode variar de 3-4 dias a 21 °C e 7-12 dias a 12 °C (Brook 1973), já o período de latência é de 4 dias a 25 °C (Li et al. 2018). Em regiões temperadas, *E. ampelina* sobrevive como escleródios durante o inverno, produzindo grande

número de conídios na primavera, os quais são disseminados pela chuva (Shear 1929; Brook 1973).

As análises histopatológicas são fundamentais para entender os processos de infecção e colonização por patógenos e identificar aspectos estruturais ou bioquímicos, pré ou pós-formados, relacionados à resistência do hospedeiro (Agrios 2005; Marques et al. 2012; 2013a). No entanto, poucos estudos foram realizados em espécies de *Elsinoë* infectando culturas comerciais (Williamson e McNicol 1989; Kim et al. 2004; Paudyal e Hyun 2015; Paudyal et al. 2017). Por exemplo, para *E. fawcettii* em *Citrus unshiu* (Satsuma Mandarin) observou-se a formação de camadas de cortiça no limite entre a área necrosada abaixo dos locais infectados restringindo a colonização do patógeno (Kim et al. 2004). Em framboesas infectadas por *E. veneta*, houve a deposição de suberina e lignina nas paredes celulares de células do córtex, também restringindo a proliferação do patógeno (Williamson e McNicol 1989). Embora a morfologia dos sintomas da antracnose da videira esteja bem estabelecida, não há estudos sobre as alterações estruturais causadas pelo patógeno nos tecidos afetados. Assim, este capítulo abordará os processos de infecção e colonização por *E. ampelina* em folhas jovens de *V. labrusca* ‘Niagara Rosada’.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Material vegetativo, isolado e inoculação

Mudas de dois anos de idade de *Vitis labrusca* ‘Niagara Rosada’, enxertada no porta-enxerto IAC-766 foram cultivadas em casa de vegetação e podadas para estimular a produção uniforme de folhas. Para as inoculações foram utilizadas folhas de quatro dias após a brotação (dab).

Utilizou-se o isolado AVBR119 de *Elsinoë ampelina*, previamente caracterizado por aspectos morfológicos e filogenéticos (Santos et al. 2018a). Para sua preservação, o isolado foi armazenado em papel filtro a -4 °C até o início dos experimentos. Em seguida, o material foi transferido para placas de Petri contendo meio de Batata Dextrose Ágar (BDA, Difco Laboratories, EUA). As placas foram incubadas por 15 dias a 25 °C em fotoperíodo de 12 horas. A suspensão de inóculo foi obtida após maceração de 16 cm² da colônia usando um pilão, resultando em fragmentos de micélio menores que 2 mm. Para induzir a esporulação, os fragmentos foram transferidos para um balão cônico de 125 mL contendo 40 mL de água destilada estéril e incubados em um agitador orbital (Tecnal, Brasil) por 7 dias a 25 °C no escuro (Santos et al. 2018c). A suspensão foi filtrada em gaze para remover fragmentos

miceliais e a concentração de esporos foi ajustada para 105 conídios mL⁻¹ usando um hemocitômero.

Quatro plantas foram utilizadas para análises do processo de infecção. Em cada planta, três folhas foram inoculadas em ambas as faces. A inoculação foi realizada usando espumas adesivadas de 2,5 x 2,5 x 1,5 cm de comprimento, largura e espessura com uma perfuração de 0,8 cm de diâmetro ao centro. As espumas foram fixadas na lâmina das folhas e 50 µL da suspensão de inóculo ou água (controle) foram adicionadas ao orifício. As plantas foram mantidas em uma câmara de incubação próxima à saturação (HR ≅ 99 a 100%) a 25 °C, no escuro por 48 h. As avaliações foram realizadas as 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação (hai). Para cada período, foram analisadas três folhas. O experimento foi realizado três vezes.

Para as análises do processo de colonização foram utilizadas nove plantas. Nesse caso, a inoculação foi realizada pulverizando a suspensão do inóculo em toda a planta até o ponto de escoamento. Como controle, três plantas foram pulverizadas com água destilada estéril. As plantas inoculadas e controle foram mantidas na câmara de incubação próxima à saturação (HR ≅ 99 a 100%) durante as primeiras 48 horas a 25 °C no escuro. Posteriormente, as plantas foram submetidas a um fotoperíodo de 12 horas por 15 dias. As folhas sintomáticas foram analisadas aos 2, 8 e 15 dias após a inoculação (dai), abrangendo áreas lesionadas e não lesionadas com três repetições por período. Folhas saudáveis também foram avaliadas nos mesmos períodos. O experimento foi realizado três vezes.

2.2.2. Análise do processo de infecção

2.2.2.1. Microscopia eletrônica de varredura

A germinação de conídios e a penetração de *E. ampelina* em folhas de ‘Niagara Rosada’ foram analisadas por MEV. Para isso, amostras de aproximadamente 1 cm² de lâminas foliares saudáveis e infectadas foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965) por 48 h. Posteriormente, as amostras foram desidratadas através de uma série etílica (10, 20, 30, 50, 70, 80, 90 e 100% por 15 min cada), secas ao método de ponto crítico com CO₂ (Horridge e Tamm 1969), montadas em suportes de alumínio e revestidas com uma camada de ouro (30–40 nm) usando um pulverizador Balzers SCD 050. As observações e eletromicrografias foram obtidas usando um microscópio eletrônico LEO 435 VP SEM (Zeiss, Oberkochen, Alemanha), operado a 20 kV. As barras de escala foram impressas diretamente nas eletromicrografias geradas. As imagens foram coradas artificialmente usando o Software Adobe Photoshop Image 18.

2.2.3. Análise do processo de colonização

2.2.3.1. Microscopia de luz e epifluorescência

A colonização na folha incluiu lâmina foliar, nervuras e pecíolo. Amostras de material sadio e sintomático (8 e 15 dai) foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky por 48h (Karnovsky 1965). Para melhor fixação, as amostras foram transferidas em uma câmara de vácuo para remover as bolhas de ar frequentemente presentes nos tecidos das plantas. Em seguida, o material vegetal foi desidratado em série etílica (10, 20, 30, 50, 70, 80, 90 e 100% por 15 minutos cada). Após a desidratação, as amostras foram infiltradas em resina plástica (Leica Historesin®) para obtenção dos blocos, os quais foram seccionados a 5 µm de espessura usando um micrótomo rotativo Leica RM 2045 com uma lâmina tipo C. As secções foram coradas com azul de toluidina a 0,05% (Sakai 1973) ou azul de algodão e safranina a 0,025% (Marques et al. 2013b) e montadas em resina sintética Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha). Outras secções foram coradas com calcofluor white examinado sob filtro A4 (excitação 340-380 nm, emissão 450-490 nm) usado para destacar celulose (Hughes e McCully 1975). As demais secções foram submetidas ao teste usando vermelho de rutênio para detecção de mucilagem ácida (Gregory e Baas 1989). As imagens foram obtidas com um microscópio Leica DMLB equipado com uma câmera Leica DFC310Fx (Leica Microsystems, Alemanha). O software LAS 4.0 (Leica™) foi utilizado para análises das imagens.

2.2.3.2. Microscopia eletrônica de transmissão

Para a análise em microscopia eletrônica de transmissão, amostras de folhas saudáveis e sintomáticas (2 e 8 dai) foram fixadas em solução de Karnovsky por 48h (Karnovsky 1965), mantidas em câmara de vácuo por 5 min, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% por 2 h, desidratadas através de uma série graduada de soluções de acetona (30, 50, 70, 90 e 100% por 15 min cada) e infiltradas em resina Spurr para obtenção dos blocos, os quais foram seccionados usando um ultramicrotomo EMUC6 da Leica (Leica Microsystems, Alemanha). As secções foram contrastadas com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo a 2% por 30 minutos cada (Reynolds 1963). Todas as secções foram analisadas usando o microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-900 (Carl Zeiss AG, Alemanha) a uma tensão de aceleração de 60 kV.

2.3. Resultados

Neste estudo, conídios de *E. ampelina* formaram um (Fig. 1a-b) ou vários tubos germinativos (Fig. 1c-d, g). Após a germinação, áreas sob o tubo germinativo mostraram degradação cuticular, comum no processo de adesão (Fig. 1b, f). A penetração do patógeno através da cutícula foi observada com ou sem formação prévia de estruturas do tipo apressório (Fig. 1e-f).

Figura 1: Eletromicrografias de varredura de *Elsinoë ampelina* em folhas de *Vitis labrusca* 'Niagara Rosada'. **a-g, i.** Face adaxial. **h.** Face abaxial. **a-f.** 24 horas após inoculação (hai). **g.** 48 hpi. **h.** 72 hai. **i.** 96 hai. **a-b.** Conídio com um tubo germinativo. Observar em **b** cutícula degradada (ponta de seta). **c-g.** Conídios com mais de um tubo germinativo. **d.** Detalhe destacado em **c** evidenciando o início da emissão de um segundo tubo germinativo (seta). **e-f.** Penetração (seta em **f**) do tubo germinativo através da cutícula. Observar a alteração cuticular (ponta de seta em **f**). **g.** Formação de hifas monilíoides. **h-i.** Estrutura micelial com hifas monilíoides (seta em **h**). Coloração artificial: Esporo (rosa); tubo germinativo (azul); hifa monilíioide (verde).

Hifas monilioides foram observadas a partir de 48 hai (Fig. 1g). Após 72 hai (Fig. 1h-i) formou-se um micélio denso que foi retido entre os tricomas na face abaxial da lâmina foliar (Fig. 1h).

Aos 8 dai as lesões foram visíveis na face adaxial da lâmina foliar como pequenas manchas marrons necróticas circundadas por um halo clorótico (Fig. 2a). Análises das secções transversais mostraram o acúmulo de compostos fenólicos nas células epidérmicas e parenquimáticas de áreas cloróticas, indicadas por uma coloração esverdeada (Fig. 2c-d), o que não ocorreu em folhas sadias (Fig. 2b). Hifas estavam presentes entre a cutícula e epiderme adaxial (Fig. 2c), entre as células epidérmicas, nos espaços do mesofilo (Fig. 2 d) e no interior das células do parênquima paliçádico (Fig. 2e), onde foi observada a formação de uma estrutura semelhante a uma vesícula (Fig. 2e-f).

Aos 15 dai as lesões eram mais extensas, provavelmente por terem coalescido (Fig. 2g). Além disso, foi observada uma diminuição da espessura da lâmina na área necrosada quando comparadas às áreas assintomáticas (Fig. 2h-k). No limite entre essas duas áreas houve o colapso de células epidérmicas na face adaxial (Fig. 2i). As paredes das células infectadas mostraram redução de celulose, como revelado pela diferença na fluorescência do Calcofluor (Fig. 2l). Na medida em que as regiões infectadas se tornaram necróticas, as células do mesofilo colapsaram devido à intensa colonização intra e intercelular (Fig. 2j-k). Células conidiogênicas foram observadas na superfície da folha (Fig. 2j). Nas áreas necróticas, as paredes celulares dos elementos traqueais mostraram menor birrefringência em áreas assintomáticas, demonstrando que houve alterações na composição da parede celular (Fig. 2 m-n). As lesões ao longo das nervuras eram, frequentemente, mais alongadas do que na lâmina, mostrando depressão acentuada na epiderme (Fig. 3a-b) e formação de células conidiogênicas (Fig. 3c). Comparação de secções transversais de nervuras sadias (Fig. 3d) e sintomáticas (Fig. 3e) revelou redução na projeção adaxial na área necrótica (Fig. 3e) devido ao colapso das células epidérmicas, parenquimáticas e colenquimáticas. Estruturas semelhantes a ascos foram observadas no tecido colapsado aos 15 dai (Fig. 3f-g). Com o aumento da necrose, as células do parênquima próximo ao sistema vascular (Fig. 3i) também colapsaram, quando comparadas ao tecido sadio (Fig. 3 h). Hifas foram observadas no lume dos elementos traqueais (Fig. 3j).

No pecíolo, a 15 dai as lesões eram alongadas, enegrecidas e com depressão intensa (Fig. 4a). Não houve diferenças estruturais entre as secções transversais do pecíolo sadio e áreas assintomáticas do pecíolo infectado (Fig. 4b). A comparação de secções transversais

entre áreas sintomáticas e assintomáticas revelou depressão acentuada na área necrótica causada pelo colapso das células da epiderme, parênquima e colênquima (Fig. 4c-d), inclusive pelo colapso dos idioblastos cristalíferos (Fig. 4e). Estruturas semelhantes a ascos foram observadas somente na área necrótica, dispersas no tecido colapsado (Fig. 4d-e). O sistema vascular também foi afetado (Fig. 4f). As hifas fúngicas foram observadas no parênquima vascular e no interior dos elementos de vaso (Fig. 4g). Algumas células perimedulares sob a lesão deprimida exibiram paredes sinuosas e acúmulo de compostos fenólicos e pécnicos (Fig. 4h).

Figura 2: Lesões na lâmina foliar de *Vitis labrusca* 'Niagara Rosada' causadas por *Elsinoë ampelina*. Fotos em estereomicroscópio das lesões aos 08 (a) e 15 (g) dias após a inoculação (dai). Secções transversais observadas em microscopia de luz (b-e, h-n) e eletrônica de transmissão (f). b. Lâmina foliar sadia. c-f. Lâmina foliar lesionada seccionada no limite entre a área clorótica e necrótica. Observar o acúmulo de compostos fenólicos corados em verde, a presença de hifas subcuticulares e intercelulares (setas em c) e a formação de estrutura de aspecto vesicular (* em d-f). h. Visão geral da lâmina foliar evidenciando área clorótica (retângulo) e necrótica (seta). Observar redução da espessura do mesófilo na área necrótica. i. Detalhe do retângulo destacado em h. Observar o colapso das células epidérmicas na face adaxial (seta). j-k. Detalhes da área necrótica evidenciando a descontinuidade da epiderme, colapso de células do mesófilo e estruturas conidiogênicas (pontas de seta). l. Paredes das células na área necrótica menos evidenciadas pelo Calcofluor White (ponta de seta). m-n. Paredes celulares dos elementos traqueais exibindo forte birrefringência sob luz polarizada na área não necrosada (m) e fraca birrefringência na área necrosada (n). Coloração com azul de Toluidina (b-e, h-j) e dupla coloração com azul de algodão e safranina (k). Ep: epiderme; Pp: parênquima paliçádico; Sp: parênquima esponjoso; Tr: tricomas; Vb: feixe vascular.

Figura 3: Lesões na nervura da lâmina foliar de *Vitis labrusca* 'Niagara Rosada' causadas por *Elsinoë ampelina* 15 dias após a inoculação. Foto em estereomicroscópio (a), em microscópio eletrônico de varredura (b-c) e em microscopia de luz (d-j). a-c. Face adaxial. a. Lesão necrótica sobre as nervuras. b. Vista geral da lesão evidenciando área deprimida. c. Detalhe do destaque em b indicando as células conidiogênicas localizadas no centro da lesão. d. Projeção adaxial da nervura sadia. e-f. Perda da projeção adaxial na área necrótica provocada pelo colapso das células e compactação dos tecidos. g. Detalhe do retângulo em f, notar a presença de estruturas semelhantes a ascas (pontas de setas) e células conidiogênicas (seta). h-j. Parênquima íntegro próximo ao sistema vascular na nervura sadia (h) e colapsado na área lesionada (i). j. Hifas no interior dos elementos traqueais (pontas de seta). Coloração com azul de toluidina (d-e; h-j) e com vermelho de rutênio (f, g). Pa: parênquima.

Figura 4: Lesão no pecíolo de *Vitis labrusca* 'Niagara Rosada' causada por *Elsinoë ampelina* 15 dias após inoculação. Foto em estereomicroscópio (a) evidenciando necrose acentuada, alongada e de coloração amarronzada. b-h. Secções transversais observadas em microscopia de luz. b. Área não lesionada. c-h. Área necrosada. c. Observar a depressão ocasionada pelo colapso das células epidérmicas, colenquimáticas e parenquimáticas. d. Detalhe do retângulo em c evidenciando estruturas fúngicas semelhantes a ascos, coradas em azul e dispersas entre as células colapsadas. e. Observar a alteração nos idioblastos cristalíferos e no inset uma estrutura semelhante a ascos. f-g. Hifas do fungo no parênquima vascular e no interior dos elementos traqueais (setas em g). h. Células perimedulares com acúmulo de pectina (ponta de seta) e de compostos fenólicos corados em verde (setas). Coloração com azul de toluidina (b-c; f-h), dupla coloração com azul de algodão e safranina (d) e após reação com vermelho de rutênio (e). Cl: colênquima; Cp: Parênquima cortical; Ep: Epiderme; Id: idioblasto; H: hifa; M: medula.

2.4. Discussão

Neste estudo, o processo de infecção causado por *E. ampelina* em *V. labrusca* foi observado apenas na superfície adaxial da lâmina foliar, em que a folha é praticamente glabra. Na face abaxial, o patógeno ficou retido na densa pilosidade. De maneira geral, os tricomas podem ser considerados como um mecanismo estrutural de defesa pré-existente nas plantas,

contribuindo para resistência contra patógenos (Agrios 2005; Pascholati e Dalio 2018). Para *V. labrusca* os tricomas foram considerados como responsáveis pela menor susceptibilidade da espécie à infecção por *Plasmopara viticola* (Kortekamp e Zyprian 1999).

Os conídios de *E. ampelina* podem produzir até cinco tubos germinativos, predominantemente um a dois que podem ou não ramificar na superfície da folha (Santos et al. 2018c). Hifas monilioides, como observado no presente estudo, foram relatadas para a espécie *E. ampelina* (Santos et al. 2018b), *E. terminaliae* e *E. erythrinae* (Fan et al. 2017). A degradação da cutícula sob o tubo germinativo parece promover a adesão do patógeno na superfície da folha e pode estar associada à produção de cutinase. Essa enzima hidrolisa a cutina presente na cutícula, e é importante para a penetração direta de patógenos (Feng et al. 2011). Esterases, incluindo cutinase, são produzidos por *Colletotrichum graminicola* e são envolvidas na adesão de conídios à superfície da planta (Pascholati et al. 1993).

Em ‘Niagara Rosada’, a formação de apressório foi rara e semelhante à estrutura descrita para *Elsinoë fawcettii* (Paudyal et al. 2017). As estruturas do tipo apressório de *E. fawcettii* eram raras no primeiro dia após a inoculação, mas tornaram-se mais frequentes até 3 dai (Paudyal et al. 2017). No entanto, a formação dessas estruturas nem sempre está associada à penetração do patógeno, como verificado em outras espécies de *Elsinoë* que penetraram no hospedeiro sem formação de apressório, como *E. wisconsinensis* (Mason e Backus 1969) e *E. panici* (Gabel e Tiffany 1987). De acordo com imagens ao MEV observadas no período de 24 hpi (Fig. 1 e-f), a penetração direta sem formação de apressório parece ser o caso do patossistema *E. ampelina* x *V. labrusca*.

Estruturas vesiculares observadas nas células do parênquima paliádico aos 2 dai podem estar relacionadas à colonização hemibiotrófica. No entanto, mais estudos são necessários para caracterizar as relações tróficas entre *E. ampelina* e *Vitis* spp. Os estudos histoquímicos mostraram que o acúmulo de compostos fenólicos nas áreas infectadas pode ter dificultado, mas não impedido, o desenvolvimento do patógeno. Esse comportamento foi observado na cultivar Perlette (*V. vinifera*), que mostrou leve acúmulo de fenóis totais em plantas com antracnose em relação às plantas saudas (Murria et al. 2018). No entanto, os níveis de fenóis totais em folhas saudas e infectadas são mais elevados em cultivares resistentes e moderadamente resistentes à antracnose. O acúmulo de pectina nos espaços intercelulares e nas células perimedulares pode indicar a atividade de pectinases produzidas por *E. ampelina*. A produção de pectinases está associada com a intensa desorganização do tecido foliar observado a partir de 8 dai. A atividade de enzimas que degradam pectina

também foi observada em outros patógenos necrotróficos ou hemibiotróficos (Kubicek et al. 2014) com ação predominante na lamela média.

A diminuição significativa na espessura da lâmina foliar de ‘Niagara Rosada’ na área necrótica é resultante do colapso das células da epiderme e do mesofilo. Em folhas de citros aos 5 dai com *E. fawcettii* também foi verificada necrose das camadas celulares do mesofilo (Paudyal et al. 2017). No entanto, as células no limite da área necrótica eram hipertrofiadas e cresceram vigorosamente, resultando em sintomas típicos da verrugose cítrica (Paudyal et al. 2017). Comportamento semelhante foi observado em folhas de *Desmodium illinoense* infectadas por *E. wisconsinensis*, onde hipertrofia e hiperplasia de células promoveram um aumento na espessura da lâmina e da nervura (Mason e Backus 1969). Neste estudo, bem como em folhas de *Panicum virgatum* infectadas por *E. panici* (Gabel e Tiffany 1987) não foram observadas nem hipertrofia nem hiperplasia celular.

A colonização inter e intracelular foi observada em todos os tecidos foliares de ‘Niágara Rosada’ analisados. A colonização do mesofilo foi semelhante à descrita para *E. panici* (Gabel e Tiffany 1987). No entanto, na interação envolvendo *D. illinoense* x *E. wisconsinensis* (Mason e Backus 1969) a colonização era estritamente intercelular e micélios estavam restritos ao parênquima paliçádico quando a penetração ocorria pela face adaxial. Por outro lado, quando a penetração de patógenos ocorria na face abaxial, a colonização se manteve, exclusivamente, no parênquima esponjoso. Em ‘Niagara Rosada’, as hifas foram observadas em todo o mesofilo e, em fases posteriores da colonização, as alterações nos parênquimas paliçádico e esponjoso foram tão severas que os tecidos não eram mais distinguíveis. Nessas fases, o patógeno ainda avançou para os elementos traqueais nas nervuras das lâminas e pecíolos, que também exibiam alteração parietal. Em contraste com os resultados deste estudo, no patossistema *Panicum virgatum* x *E. panici*, os feixes vasculares não foram colonizados pelo patógeno devido à proteção conferida pelas células da bainha do feixe vascular (Gabel e Tiffany 1987).

Estruturas semelhantes a ascos, observadas a partir de 15 dai em nervuras e pecíolos, também foram relatados em outras espécies de *Elsinoë* (Fan et al. 2017). O elevado número de estruturas semelhantes a ascos observado neste estudo é surpreendente, uma vez que a fase sexual desse patógeno nunca foi relatada no Brasil (Amorim et al. 2016). Estudos adicionais são necessários para investigar se essas estruturas produzem propágulos viáveis, a sua contribuição para a variabilidade genética do patógeno e o seu papel no progresso epidemiológico da antracnose. Em conclusão, nosso estudo mostrou que *E. ampelina* penetra

a superfície da folha diretamente, seguida por rápida colonização do patógeno. E, embora compostos fenólicos tenham sido produzidos pelo hospedeiro, essa defesa química não impediu a colonização e a degradação do tecido infectado. Considerando a rápida taxa de desenvolvimento de sintomas, medidas preventivas são necessárias para controlar a antracnose da videira.

Referências

- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. 5th Edition. Burlington: Elsevier Academic Press.
- Amorim L., Spósito, M. B., & Kuniyuki, H. (2016). Doenças da videira. In L. Amorim, J. A. M. Rezende, A. Bergamin Filho & L. E. A. Camargo (Eds.), Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 745-58.
- Barros, L. B., Biasi, L. A., Carisse, O., & De Mio, L. L. M. (2015). Incidence of grape anthracnose on different *Vitis labrusca* and hybrid cultivars and rootstocks combination under humid subtropical climate. *Australasian Plant Pathology*, 44, 397-403.
- Brook, P. J. (1973). Epidemiology of grapevine anthracnose caused by *Elsinoë ampelina*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 16, 333-342.
- Camargo, U. A., Tonietto, J., & Hoffmann, A. (2011). Progressos na viticultura brasileira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33, 144-149
- Carisse, O., & Lefebvre, A. (2011). A model to estimate the amount of primary inoculum of *Elsinoë ampelina*. *Plant disease*, 95, 1167-1171.
- 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.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) (2018). *Elsinoë ampelina*. <https://gd.eppo.int/taxon/ELSIAM/distribution>. Acesso em 5 jun. de 2018.
- Fan, X. L., Barreto, R. W., Groenewald, J. Z., Bezerra, J. D. P., Pereira, O. L., Cheewangkoon, R., & Crous, P. W. (2017). Phylogeny and taxonomy of the scab and spot anthracnose fungus *Elsinoë* (Myriangiales, Dothideomycetes). *Studies in Mycology*, 87, 1-41.
- Feng, J., Wang, F., Hughes, G. R., Kaminskyj, S., & Wei, Y. (2011). An important role for secreted esterase in disease establishment of the wheat powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Canadian Journal of Microbiology*, 57, 211-216.
- Gabel, A. W. & Tiffany, L. H. (1987). Host-parasite relations and development of *Elsinoë panici*. *Mycologia*, 79, 737-744.
- Gregory, M., & Baas, P. (1989). A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel Journal of Botany*, 38, 125-174.
- Horridge, G., & Tamm, S. (1969). Critical point drying for scanning electron microscopic study of ciliary motion. *Science*, 163, 817-818.

- Hughes, J., & McCully, M. E. (1975). The use of an optical brightener in the study of plant structure. *Stain Technology*, 50, 319-329.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2019). Levantamento sistemático da produção agrícola. <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588#resultado>. Acesso em 20 fev. de 2019.
- Karnovsky, J. M. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27, 137-138.
- Kim, K. W., Hyun, J. W., & Park, E. W. (2004). Cytology of cork layer formation of citrus and limited growth of *Elsinoë fawcettii* in scab lesions. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 129-138.
- 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, 1433-1439.
- Kortekamp, A., & Zyprian, E. (1999). Leaf hairs as a basic protective barrier against downy mildew of grape. *Journal of Phytopathology*, 147, 453-459.
- Kubicek, C. P., Starr, T. L., & Glass, N. L. (2014). Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 427-451.
- Li, Z., Dang, H., Yuan, X., He, J., Hu, Z., & Wang, X. (2018). Morphological characterization and optimization of conditions for conidial production of *Elsinoë ampelina*, the causal organism of grapevine anthracnose. *Journal of Phytopathology*, 166, 420-428.
- Maia, J. D. G., Camargo, U. A., Tonietto, J., Zanús, M. C., Quecini, V., Ferreira, M. E., & Ritschel, P. (2015). Grapevine breeding programs in Brazil. In G. A. Reynolds (Ed.), *Grapevine breeding programs for the wine industry*. Cambridge: Elsevier, 247-271.
- Marques, J. P. R., Spósito, M. B., Mello, A. F. S., Amorim, L., Mondin, M., & Appezzato-da-Glória, B. (2012). Histopathology of black spot symptoms in sweet oranges. *European Journal of Plant Pathology*, 133, 439-448.
- Marques, J. P. R., Amorim, L., Spósito, M. B., & Appezzato-da-Glória, B. (2013a). Histopathology of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum* in citrus flowers. *European Journal of Plant Pathology*, 135, 783-790.
- Marques, J. P. R., Soares, M. K. M., & Appezzato-da-Glória, B. (2013b). New staining technique for fungal-infected plant tissues. *Turkish Journal of Botany*, 37, 784-787.
- Mason, D. L., & Backus, M. P. (1969). Host-parasite relations in spot anthracnose of *Desmodium*. *Mycologia*, 61, 1124-1141.

- Murria, S., Kaur, N., Arora, N., & Mahal, A. K. (2018). Field reaction and metabolic alterations in grape (*Vitis vinifera* L.) varieties infested with anthracnose. *Scientia Horticulturae*, 235, 286-293.
- Pascholati, S. F., & Dalio, R. J. D. (2018). Fisiologia do parasitismo: como os patógenos atacam as plantas. In L. Amorim, J. A. M. Rezende & A. Bergamin Filho (Eds.), *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 389-421.
- Pascholati, S. F., Deising, H., Leite, B., Anderson, D., & Nicholson, R. L. (1993). Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 42, 37-51.
- 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, 421-427.
- Paudyal, D. P., & Hyun, J. W. (2017). Infection and symptom development by citrus scab pathogen *Elsinoë fawcettii* on leaves of satsuma mandarin. *European Journal of Plant Pathology*, 148, 807-816.
- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 17, 208-212.
- Sakai, W. S. (1973). Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technology*, 48, 247-249.
- Santos, R. F., Spósito, M. B., Ayres, M. R., & Sosnowski, M. R. (2018a). Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Elsinoë ampelina*, the causal agent of grapevine anthracnose in Brazil and Australia. *Journal of Phytopathology*, 166, 187-198.
- Santos, R. F., Ciampi- Guillard, M., Amorim, L., Massola, N. S., & Spósito, M. B. (2018b). Aetiology of anthracnose on grapevine shoots in Brazil. *Plant Pathology*, 67, 692-706.
- Santos, R. F., Spósito, M. B., Ayres, M., & Sosnowski, M. (2018c). *In vitro* production of conidia of *Elsinoë ampelina*, the causal fungus of grapevine anthracnose. *European Journal of Plant Pathology*, 152(3), 815-821.
- Shear, C. L. (1929). The life-history of *Sphaceloma ampelina* de Bary. *Phytopathology*, 19, 673-679.
- Thind, T. S., Arora J. K., Mohan C., & Raj P. (2004). Epidemiology of powdery mildew, downy mildew and anthracnose diseases of grapevine. In S. A. M. H. Naqvi (Ed.), *Diseases of Fruits and Vegetables*. Dordrecht: Springer, 621-638.

- Thind, T. S. (2015). Anthracnose. In W. Wilcox, W. Gubler & J. Uyemoto (Eds.), *Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests*. St Paul: APS Press, 17-19.
- Williamson, B., & McNicol, R. J. (1989). The histology of lesion development in raspberry canes infected by *Elsinoë veneta*. *Annals of Applied Biology*, 114, 35-44.

3. ASPECTOS MORFO-HISTOLÓGICOS E HISTOQUÍMICOS DAS LESÕES CAUSADAS POR *ELSINOË AMPELINA* EM GAVINHAS, CAULES E BAGAS DE *VITIS LABRUSCA* L. ‘NIAGARA ROSADA’

Resumo

A antracnose da videira é uma doença fúngica importante em muitos países, incluindo o Brasil. No entanto, apenas recentemente o ciclo da doença vem sendo esclarecido. Entre as novidades está a possível reprodução sexual de *Elsinoë ampelina* no país; porém, as pesquisas abrangem somente as folhas. Assim, foram conduzidas análises ao microscópio de luz e eletrônico de varredura dos aspectos morfo-histológicos e histoquímicos das lesões causadas por *E. ampelina* em caules, gavinhas e bagas da videira ‘Niagara Rosada’. O objetivo foi esclarecer nesses órgãos o processo de colonização e de reprodução do patógeno. Em gavinhas e caules, os sintomas ocorreram aos 5 dias após a inoculação. Nessa fase, foram observadas hifas sob a cutícula e sob a epiderme, sendo que a colonização do tecido parenquimático foi inter e intracelular com as células exibindo acúmulo de substâncias pécticas. Aos 15 dai, na superfície de gavinhas, havia estruturas semelhantes a ascos e células conidiogênicas rompendo cutícula. Nos dois órgãos, nas áreas infectadas, as células da epiderme, colênquima e parênquima apresentaram colapso total, às vezes formando um tecido de aspecto ascostromático. Nos dois órgãos foram observadas estruturas semelhantes a ascos, porém mais frequentes em gavinhas. Ainda nesses órgãos, sob a área lesionada, as células do parênquima exibiram hipertrofia seguida de hiperplasia celular, formando uma periderme de cicatrização. Alguns elementos traqueais apresentaram células conidiogênicas no lume e alterações parietais. Também foi verificada a formação de tilos nos elementos de vaso adjacentes às lesões. Em bagas, além das alterações estruturais envolvendo colapso celular, as lesões também exibiram acérvulos produzindo conídios e estruturas semelhantes a ascos na superfície. Tais estruturas, em todos os órgãos analisados, apresentaram tamanho médio de 24,6 µm de comprimento e 19,3 µm de largura. Em bagas foi possível visualizar que as estruturas semelhantes a ascos eram bitunicadas e continham estruturas semelhantes a ascósporos com 2 a 3 células num arranjo aleatório. Tais estruturas eram hialinas providas de septos transversais e apresentaram tamanho médio de 11,0 µm de comprimento e 4,6 µm de largura. Em conclusão, os órgãos analisados exibiram mecanismos estruturais de defesa não relatados em folhas como formação de uma periderme de cicatrização e, especificamente no caule, a formação de tilos adjacentes às áreas lesionadas. Nesse órgão também foi observada a reprodução assexuada do patógeno ocorrendo no lume dos elementos de vaso, fato incomum para a espécie. Além disso, as estruturas semelhantes a ascos observadas em todos os órgãos analisados sugerem a presença da fase sexual da *E. ampelina* no Brasil.

Palavras-chave: Antracnose; Conídios; Estruturas semelhantes a ascos; *Vitis labrusca*

Abstract

Grapevine anthracnose is an important fungal disease in many countries, including Brazil. However, only recently the disease cycle has been clarified. Among novelties is the possible sexual reproduction of *Elsinoë ampelina* in the country; Nevertheless, researches only comprise leaves. Thus, light and scanning electron microscopy analyses of morphological and histochemical aspects of lesions caused by *E. ampelina* on stems, tendrils, and berries of the ‘Niagara Rosada’ grapevine were conducted. The aim was to clarify the colonization and reproduction process of the pathogen in these organs. In tendrils and stems, symptoms occurred at 5 days after inoculation (dai). In this phase, hyphae were observed under the cuticle and under the

epidermal cells, and the colonization of the parenchyma tissue was inter- and intracellular with cells showing the accumulation of pectic substances. At 15 dai, on tendrils surface, there were ascus-like structures, and conidiogenic cells breaking the cuticle. In both organs, in infected areas, the epidermal, collenchyma, and parenchyma cells presented total collapse, sometimes developing an ascostromatic aspect tissue. In both organs, ascus-like structures were observed but more frequent in tendrils. Also in these organs, underlying the injured area, the parenchyma cells exhibited hypertrophy followed by cellular hyperplasia, forming a healing periderm. Some tracheal elements had conidiogenic cells in the lumen and parietal changes. Tyloses formation in vessel elements adjacent to the lesions was also verified. In berries, in addition to structural changes involving cell collapse, the lesions also exhibited acervuli producing conidia and ascus-like structures on the surface. Such structures, in all analyzed organs, presented an average size of 24.6 μm in length and 19.3 μm in width. In berries, it was also possible to see that the ascus-like structures were bitunicated and contained ascospore-like structures with 2 to 3 cells in a randomized arrangement. These structures were hyaline with transverse septa and had an average size of 11.0 μm in length and 46.0 μm in width. In conclusion, the organs analyzed exhibited unreported structural defense mechanisms in leaves such as the formation of a healing periderm and, specifically in the stem, the formation of tyloses adjacent to the injured areas. In this organ, the pathogen asexual reproduction was also observed inside the vessel elements, a fact unusual for the species. Furthermore, the ascus-like structures observed in all analyzed organs indicates the presence of the *E. ampelina* sexual phase in Brazil.

Keywords: Anthracnose; Ascus-like structures; Conidia; *Vitis labrusca*

3.1. Introdução

A antracnose da videira é uma doença fúngica importante em muitos países, especialmente durante as estações chuvosas (Schilder et al. 2005; Kono et al. 2009; Sawant et al. 2012a; Carisse e Morissete-Tomas 2013; Santos et al. 2018b). Na Ásia é causada tanto por *Elsinoë ampelina* como por diferentes espécies de *Colletotrichum* (Sawant et al. 2012a; 2012b; Li et al. 2018), porém no Brasil a doença é atribuída apenas a *E. ampelina* (Santos et al. 2018a). Durante as estações chuvosas, o patógeno pode levar a perdas econômicas significativas, causando reduções no rendimento e na comercialização de frutos onde a doença está bem estabelecida (Thind 2015; Amorim et al. 2016).

Elsinoë ampelina infecta tecidos jovens, incluindo folhas, gavinhas, caules e bagas. Os primeiros sintomas são caracterizados por manchas circulares isoladas, pequenas, avermelhadas, que aumentam até 7 mm de comprimento, e se tornam acastanhadas com a porção central de acinzentada a enegrecida (Kono et al. 2012; Thind 2015). À medida que a doença progride, a coalescência de lesões é comumente observada, quando em condições favoráveis (Santos et al. 2018a). A umidade e a temperatura são os fatores ambientais que mais influenciam a infecção (Thind et al. 2004), sendo necessários períodos mínimos de umidade de 7 a 10h a 12 °C e de 3 a 4h a 21 °C para que essa ocorra (Brook 1973). O período de incubação a 25 °C é de 3 dias em folhas e de 5 a 6 dias em caules e gavinhas (Santos et al. 2018b). Elevado número de conídios são produzidos sobre as lesões quando estas são

umedecidas pela chuva ou pelo orvalho por 24h ou mais (Thind 2015). Os conídios são dispersos por respingos de chuva e surtos de antracnose têm sido relatados em anos com alta precipitação (Thind 2015).

A antracnose da videira foi relatada pela primeira vez no Estado de São Paulo em 1889 (Puttemans 1932) e permaneceu por um século como a mais importante doença da videira no Sudeste do Brasil (Kimati e Galli 1980). Atualmente, embora o míldio (*Plasmopara viticola*) seja considerado a principal doença da cultura, a antracnose apresenta alta severidade quando os estágios iniciais do desenvolvimento da planta coincidem com períodos prolongados de chuva e alta umidade relativa. Apesar da importância da antracnose da videira no Brasil, o ciclo da doença nunca foi completamente esclarecido, principalmente a presença e o papel da reprodução sexual. O estágio sexual de *E. ampelina* não ocorre tão regularmente quanto o estágio assexual e não foi encontrado em vários países, incluindo Austrália, Brasil, Índia e África do Sul (Du Plessis 1940; Suhag e Grover 1972; Magarey et al. 1993; Amorim et al. 2016). Quando a reprodução sexual ocorre, é relatada em bagas infectadas que remanescem nas plantas durante o inverno ou no solo do vinhedo e é responsável por infecções primárias (Mirica 1988; Thind 2015). No entanto, a importância dos ascósporos no desenvolvimento da antracnose não é claramente entendida (Thind et al. 2004). A presença de reprodução sexual em espécies do gênero *Elsinoë* é incomum. Por exemplo, em citros a reprodução sexual de patógenos da verrugose dos citros (*Elsinoë fawcettii* e *E. australis*) tem ocorrência limitada e o papel dos ascósporos no ciclo da doença não está claro (Timmer 2000; Chung 2011). Em outras culturas, como mandioca, eucalipto e avelã (Zeigler e Lozano 1983; Minutolo et al. 2016; Fan et al. 2017), os ascósporos foram relatados; no entanto, sua importância epidemiológica não foi analisada.

Recentemente, identificou-se a presença de estruturas semelhantes a ascos em áreas necróticas de nervuras foliares e pecíolos de *Vitis labrusca* ‘Niagara Rosada’ 15 dias após a inoculação (dai), concomitantemente com a formação de conídios (Braga et al. 2019). Adicionalmente, evidências mostraram uma possível reprodução sexual de *Elsinoë ampelina* no Brasil; no entanto, apenas as folhas foram o alvo do estudo. Assim, o objetivo deste capítulo é apresentar os aspectos morfo-histológicos e histoquímicos das lesões causadas por *E. ampelina* em caules, gavinhas e bagas da videira ‘Niagara Rosada’ buscando esclarecer nesses órgãos o processo de colonização e de reprodução do patógeno.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Material vegetativo e isolado

As avaliações histológicas para caracterizar as lesões e os processos de colonização e reprodução de *Elsinoë ampelina* foram conduzidas em caules, gavinhas e bagas de videira (*Vitis labrusca*) ‘Niagara Rosada’ enxertadas sobre o porta-enxerto ‘IAC-766 Campinas.

A cepa de *E. ampelina* AVBR118 isolada de uma folha sintomática de ‘Niagara Rosada’ foi usada para inoculações. A identificação do isolado foi baseada na análise da sequência do espaçador transcrito interno (ITS) e do fator de alongamento 1- α (TEF) (números de acesso do GenBank: ITS, KY684866; TEF, KY684901) (Santos et al. 2018b).

3.2.2. Inoculação e coleta de amostra

Avaliações histológicas em caules e gavinhas foram realizadas em amostras de videiras de dois anos de idade cultivadas em vasos em casa de vegetação a 25 °C (± 5 °C). A suspensão conidial foi obtida colocando fragmentos miceliais de uma cultura de patógenos de 15 dias em água destilada estéril e agitando em um agitador orbital (Tecnal, Brasil) a 200 rpm no escuro por 7 dias a 25 °C para induzir a esporulação (Santos et al. 2018c). Para a inoculação, brotações de 25 dias de idade com gavinhas e caules jovens foram pulverizadas com uma suspensão de 10^5 conídios mL⁻¹ até o ponto de escorrimento. Em seguida, as plantas foram cobertas com sacos plásticos e incubadas em uma sala de crescimento a 25 °C no escuro. Três plantas foram inoculadas dessa maneira, e outras três foram pulverizadas com água destilada estéril (controle). Os sacos plásticos foram removidos 48 horas após a inoculação e as plantas foram mantidas na mesma temperatura com um fotoperíodo de 12 horas. O experimento foi realizado três vezes. As amostras de gavinhas e de caules jovens inoculados e controle foram coletadas a 5 e 15 dai.

Devido à dificuldade de reproduzir sintomas de antracnose, por inoculações artificiais, em bagas de videiras mantidas em vasos, 30 bagas no estágio fenológico 77 (Lorenz et al. 1995) e com sintomas típicos de antracnose foram coletadas de um vinhedo com histórico de epidemias graves da doença. Além disso, 30 bagas sadias também foram coletadas.

3.2.3. Processo de colonização e reprodução

3.2.3.1. Microscopia de luz

Para investigar o desenvolvimento de *Elsinoë ampelina* nos tecidos da videira, amostras de gavinhas caules e bagas sadias e sintomáticas foram cortadas em pequenos fragmentos (1 cm de comprimento) e depois fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965) por 48 h. Durante esse período, as amostras foram levadas a uma bomba de vácuo para remover o ar dos tecidos. Posteriormente, as amostras foram desidratadas por uma série etílica graduada (10, 20, 30, 50, 70, 80, 90 e 100%, 15 min cada) e infiltradas em resina plástica (Leica Historesin®, Leica Microsystems, Alemanha). Cortes seriados foram realizados a cada 5 µm ao longo das lesões, a fim de observar alterações teciduais desde a margem até o centro da lesão, utilizando um micrótomo rotativo (Leica RM 2045; Leica Microsystems, Alemanha). Parte das secções foi corada com azul de toluidina a 0,05% (Sakai 1973), que cora tecidos vegetais em azuis e compostos fenólicos em verde (Feder e O'Brien 1968; Gómez et al. 2015). Um método de dupla coloração usando azul de algodão e safranina a 0,025% foi utilizado para identificar estruturas fúngicas (coradas de azul) e as células vegetais (laranja avermelhado) (Marques et al. 2013). As lâminas dos dois métodos de coloração foram montadas em resina sintética Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha). Outras secções foram coradas com vermelho de rutênio para detecção da mucilagem ácida (Gregory e Baas 1989). Uma dupla coloração usando vermelho de rutênio e Sudan IV foi realizada para identificar compostos pécicos e lipofílicos (Marques et al. 2016). Para analisar as estruturas semelhantes a ascos, uma fita adesiva transparente (Durex™, Brasil) foi aplicada às lesões de frutos e depois transferida para uma lâmina com vermelho de rutênio (Gregory e Baas 1989). Todas as lâminas foram analisadas ao microscópio de luz (DMLB; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) acoplado a uma câmera digital (Leica DFC 310Fx). O software LAS 4.0 (Leica Microsystems) foi utilizado para análise de imagens.

3.2.3.2. Microscopia de epifluorescência

As secções das lesões em gavinha e caule foram coradas com WGA Alexa Fluor 488 (Life Technologies, EUA) para detectar n-acetilglucosamina da parede celular do fungo. As secções foram analisadas com o filtro L5 (Leica Microsystems, Alemanha) na excitação de 460 a 500 nm e emissão de 512 a 542 nm (Berlier et al. 2003). Algumas secções foram coradas com WGA Alexa Fluor 488 e com 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI; fluoróforo

conhecido por ser um intercalador de DNA) para corar as paredes e núcleos de células fúngicas (Wilson et al. 1990), respectivamente. As faixas de emissão e excitação foram de 460 a 500 nm e 512 a 542 nm, respectivamente para o WGA Alexa Fluor 488; e 325 a 375 nm e 435 a 485 nm para DAPI. Todas as secções foram montadas em água destilada e analisadas ao microscópio de epifluorescência (DM 5500B; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) acoplado a uma câmera digital (Leica DFC 365Fx). O software AF6000 (Leica) foi utilizado para análise de imagem.

3.2.3.3. Microscopia eletrônica de varredura

Para a análise de superfície, amostras de gavinhas, caules e bagas sadias e sintomáticas foram cortadas em pequenos fragmentos (1 cm de comprimento) e fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965) por 48 h. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica crescente (10, 20, 30, 50, 70, 80, 90 e 100%, 15 min cada), e secas pelo método do ponto crítico de CO₂ (Horridge e Tamm 1969). As amostras foram colocadas em suportes de alumínio e cobertas com uma camada de ouro (30 a 40 nm) no equipamento Balzers modelo SCD050 (Liechtenstein). As amostras foram analisadas ao microscópio eletrônico de varredura Leo-435VP (Zeiss, Alemanha) operado a 20 kV.

3.3. Resultados

Em gavinhas os sintomas iniciais foram observados aos 5 dai como lesões isoladas, longitudinais, marrom-escuras e deprimidas no centro (Fig. 1a). As alterações estruturais nas células epidérmicas e parenquimáticas foram observadas na margem dessas lesões (Fig. 1c), enquanto nenhuma alteração foi observada nos tecidos não lesionados (Fig. 1b). Essas alterações estruturais foram mais pronunciadas no centro das lesões (Fig. 1d-g), onde foram observadas hifas nas posições subcuticular e subepidérmica (Fig. 1e).

Figura 1: Lesão em gavinha de *Vitis labrusca* ‘Niagara Rosada’ causada por *Elsinoë ampelina* 5 dias após a inoculação. Estereomicrografia (a). Fotomicrografias das secções transversais da área não lesionada (b), da área limite entre o tecido lesionado e o não lesionado (c) e do centro da lesão (d-g). a. Visão geral da lesão. b-c. Ao comparar o destaque e a seta em (b) e (c), observa-se as alterações no formato das células epidérmicas e do parênquima. d. No centro da lesão as alterações são mais evidentes. e-g. Detalhes do destaque em (d). e. Hifas na posição subcuticular (setas) e subepidérmica (ponta da seta). f. Colonização de hifas intercelulares (seta branca) e intracelular (seta preta). Observe a plasmólise celular (pontas de seta) e o acúmulo de substâncias pécicas dentro das células do parênquima (coloração rosada). g. Hifas no interior do elemento de vaso (seta). Coloração com azul de toluidina (b-g). Cl: colênquima, Cp: parênquima cortical, Ep: epiderme, Vb: feixe vascular.

O crescimento da hifa estendeu-se a outros tecidos inter e intracelularmente (Fig. 1f), inclusive para o lume dos elementos traqueais (Fig. 1g). Além disso, houve acúmulo de substâncias pécicas nos espaços intercelulares e no interior das células parenquimáticas infectadas, algumas das quais estavam plasmolisadas (Fig. 1f).

Aos 15 dai as lesões ao longo das gavinhas tornaram-se maiores e mais escuras (Fig. 2) com depressão acentuada e intensa alteração estrutural nos tecidos (Fig. 2a). A análise da superfície revelou estruturas semelhantes a ascos (Fig. 2b-d), as quais não foram observadas em tecidos sadios (Fig. 2e). Em secções coradas com vermelho de rutênio (Fig. 2g, h) foi

possível observar que as estruturas semelhantes a ascos estavam envoltas por substância de natureza péctica e imersas num tecido de aspecto ascostromático resultante do colapso total das células da epiderme, colênquima e parênquima nas áreas infectadas (Fig. 2f, g). Células conidiogênicas e estruturas semelhantes a ascos foram observadas na mesma lesão (Fig. 2g). Sob a área infectada, as células parenquimáticas exibiram conteúdo fenólico e, algumas delas, hiperplasia (Fig. 2f). Secções transversais coradas com Alexa Fluor 448 evidenciaram a presença de quitina nas paredes das estruturas semelhantes a ascos (Fig. 2i-j) e o marcador DAPI evidenciou um núcleo em cada célula (Fig. 2k).

Nos caules, os primeiros sintomas foram observados de 5 a 7 dai, sempre em entrenós jovens, macios e flexíveis. As lesões iniciais apresentaram características morfológicas e alterações estruturais semelhantes às observadas em gavinhas. A coalescência da lesão foi geralmente observada aos 15 dai (Fig. 3a). Na área lesionada, diferentemente do tecido sadio (Fig. 3b), houve colapso acentuado das células epidérmicas e corticais, acompanhado pelo acúmulo de compostos fenólicos e intensa lise celular, resultando em amplos espaços entre os demais tecidos alterados (Fig. 3c). Estruturas semelhantes a ascos também foram observadas em caules sintomáticos (Fig. 3d, detalhe); no entanto, em uma frequência mais baixa em relação às gavinhas. As células parenquimáticas adjacentes aos tecidos infectados apresentaram hiperplasia intensa (divisão celular periclinal) (Fig. 3e) ou hipertrofia seguida de hiperplasia (Fig. 3f). Hifas (Fig. 3g-h) e células conidiogênicas (Fig. 3i) foram observadas no lume dos elementos traqueais, os quais exibiram alterações parietais, como dissolução (Fig. 3j) e baixa birrefringência (Fig. 3k) em comparação aos tecidos sadios (Fig. 3l). Os tilos formaram-se apenas nos elementos traqueais adjacentes às lesões e, em muitos casos, os vasos foram completamente obstruídos (Fig. 3m-n).

Figura 2: Lesão em gavinha de *Vitis labrusca* 'Niagara Rosada' causada por *Elsinoë ampelina* 15 dias após a inoculação. Estereomicrografia (a). Eletromicrografias de varredura (b-d). Fotomicrografias das secções transversais da área não lesionada (e) e da área lesionada (f-k). a. Visão geral da lesão. b-d Detalhes da área destacada em (a) onde estruturas semelhantes a ascos são visíveis na superfície após a ruptura cuticular (seta em d). e. Estrutura anatômica inalterada. f-g. Área correspondente a (e) mostrando colapso generalizado das células epidérmicas e corticais, formando um tecido de aspecto ascostromático. Observar também o acúmulo de compostos fenólicos (coloração verde em f) sob o tecido alterado e hiperplasia celular (setas em f). Em g observar na mesma lesão células conidiogênicas (seta) e estruturas semelhantes a ascos (retângulo). h. Detalhe do retângulo em (g) mostrando estruturas semelhantes a ascos envoltas por material péctico (setas) e distribuídas entre as células colapsadas. i-k. Estruturas semelhantes a ascos (setas) com paredes coradas em verde pelo Alexa Fluor-448 (i-j) e pelo Alexa Fluor-448 associado ao marcador DAPI o qual cora o núcleo das células em azul (k). Coloração com azul de toluidina (e-f). Reação com vermelho de rutênio (g-h). Cl: colênquima; Cp: parênquima cortical, Ep: epiderme, St: Estômato, Vb: feixe vascular.

Figura 3: Lesão em caule de *Vitis labrusca* 'Niagara Rosada' causada por *Elsinoë ampelina* 15 dias após a inoculação. Estereomicrografia (a). Fotomicrografias das secções transversais da área não lesionada (b, l) e da área lesionada (c-k, m-n). Secções longitudinais da área lesionada (i, n). a. Visão geral da lesão. b. Estrutura anatômica inalterada. c. Área correspondente a (b) mostrando intensa lise e colapso celular, bem como acúmulo de compostos fenólicos (coloração esverdeada) nas demais células colapsadas. d. Estruturas semelhantes a ascos (detalhe) entre células colapsadas ascostromáticas (retângulo). e-f. Hiperplasia (e) e hipertrofia seguida de hiperplasia (f) das células do parênquima abaixo da área lesionada (setas). g-h. Hifas no lume dos elementos de vaso (setas). Observe o elemento do vaso colapsado (seta em h). i. Células conidiogênicas (seta) dentro do elemento do vaso. j. Dissolução da parede do vaso (seta). k, l. Análise sob luz polarizada mostrando a sinuosidade e menor birrefringência das paredes dos elementos de vaso infectado (k) em relação às células saudáveis (l). m, n. Tilos (setas) obstruindo o lume dos elementos de vaso próximos à área lesionada (*). Coloração com azul de toluidina (b-f, i, j, m), dupla coloração com azul de algodão e safranina (h, n), reação com vermelho de rutênio (g, detalhe em m). Ep: epiderme; Cl: colênquima, Cp: parênquima cortical, Vb: feixe vascular.

Nas bagas, as lesões eram marrom-avermelhadas, circulares e levemente deprimidas (Fig. 4a). Foram observados acérvulos no centro das lesões produzindo uma massa de conídios, alguns sendo dispersos na superfície da baga (Fig. 4b-c). Nas áreas infectadas, verificou-se o colapso das células epidérmicas e parenquimáticas, resultando em compactação de tecido (Fig. 4e). Tais alterações estruturais não foram vistas em tecidos não lesionados (Fig. 4d). As secções transversais revelaram divisões anticlinal e periclinal das células parenquimáticas (Fig. 4e) e diversos acérvulos na superfície da lesão (Fig. 4e-f). Além dos acérvulos, também foram observadas na superfície estruturas semelhantes a ascos (Fig. 4g).

Estruturas semelhantes a ascos mediram (valor mínimo - médio - máximo) 12,9 - 24,6 - 34,3 μm de comprimento e 12,6 - 19,3 - 29,6 μm de largura ($n = 21$). Nas bagas, tornou-se evidente que tais estruturas eram bitunicadas com paredes bem desenvolvidas contendo estruturas semelhantes a ascósporos de 2 a 3 células em um arranjo aleatório (Fig. 4g-h). Também se observou estruturas semelhantes a ascósporos isoladas na superfície da baga (Fig. 4i), as quais eram hialinas com septos transversais e mediram 8,4 - 11,0 - 14,4 μm de comprimento e 3,4 - 4,6 - 5,8 μm de largura ($n = 15$).

Figura 4: Lesão em baga de *Vitis labrusca* 'Niagara Rosada' causada por *Elsinoë ampelina* em condições de campo e coletada no estágio fenológico 77 (Lorenz et al. 1995). Estereomicrografia (a). Eletromicrografias de varredura (b-c). Fotomicrografias de seções transversais das áreas não lesionadas (d) e lesionadas (e-g). Fotomicrografias de impressão em fita adesiva transparente aplicada sobre a área necrótica mostrando estruturas de superfície (h, i). a. Visão geral da lesão. b. Acérvulo produzindo conídios. c. Detalhe da ruptura da cutícula pelos acérvulos (seta). d. Estrutura anatômica inalterada. e. Área correspondente a (d) mostrando colapso celular, hiperplasia celular intensa (pontas de seta) e presença de acervos (setas) na superfície da lesão. f. Detalhe dos acérvulos rompendo a cutícula e produzindo conídios. g-h. Estruturas semelhantes a ascos bitunicadas (setas) contendo estruturas semelhantes a ascósporos. i. Detalhe de uma estrutura semelhante a ascósporo com três septos. Coloração com azul de toluidina (d-e, g); dupla coloração com vermelho de rutênio e Sudan IV (f); reação com vermelho de rutênio (h-i). Ep: epiderme; Pa: parênquima.

3.4. Discussão

Neste estudo, caules e gavinhas inoculadas com *E. ampelina* apresentaram os primeiros sintomas de antracnose a partir de 5 dai. Os sintomas foram semelhantes aos ocorridos naturalmente no campo (Thind 2015) e em experimentos laboratoriais usando inoculações artificiais (Sosnowski et al. 2007; Santos et al. 2018a). Aos 5 dai, as alterações estruturais nas células epidérmicas e parenquimáticas foram mais intensas no centro da lesão, onde houve maior número de hifas crescendo inter e intracelularmente. Em estudo anterior, observou-se um comportamento semelhante em folhas com lesões de antracnose (Braga et al. 2019). Outra alteração na célula hospedeira associada à colonização por *E. ampelina* incluiu o acúmulo de substâncias pécticas nas células parenquimáticas, provavelmente devido à ação das pectinases. Pectinases como pectina-liase, poligalacturonase e pectina-metilesterase estão entre os fatores mais importantes na patogênese fúngica, pois são responsáveis pela degradação de substâncias pécticas na lamela média, resultando na desestruturação do tecido e morte celular (Agrios 2005). Entretanto, a atividade das enzimas pectolíticas dos isolados de *E. fawcettii* quantificadas *in vitro* não se correlacionou com a gravidade da doença avaliada em folhas destacadas (Wang et al. 2009). Por outro lado, estudos com *Colletotrichum*, outro gênero fúngico responsável pela antracnose em muitas culturas, demonstraram que as pectinases são enzimas-chave envolvidas na infecção de plantas, colonização e desenvolvimento de sintomas (Shih et al. 2000; Herbert et al. 2004; Ben-Daniel et al. 2012). A análise histoquímica também revelou a produção de compostos fenólicos nos órgãos inoculados; no entanto, essas respostas de defesa da videira falharam em impedir o desenvolvimento de *E. ampelina*, como relatado anteriormente nas folhas da videira (Braga et al. 2019).

À medida que a colonização do patógeno evoluiu, as alterações estruturais se tornaram mais proeminentes. Plasmólise celular, colapso da parede celular e menor birrefringência das paredes dos elementos traqueais ocorreram como os descritos nas folhas da videira (Li et al. 2019; Braga et al. 2019). Vale ressaltar que hiperplasia e hipertrofia foram observadas em células parenquimáticas de gavinhas, caules e frutos em estreita associação com o patógeno, sugerindo que *E. ampelina* causa desbalanço no sistema que regula o crescimento vegetal. As respostas hiperplásicas e hipertróficas observadas nas células *Desmodium illinoense* infectadas por *E. wisconsinensis* sugeriram que um hormônio do crescimento é secretado pelo patógeno ou que o patógeno induz o hospedeiro a produzir hormônios, resultando em respostas anormais de crescimento (Mason e Wilson 1978). Na

verrugose dos citros, a hipertrofia das células hospedeiras infectadas por *E. fawcettii* também foi sugerida como associada a um distúrbio no sistema regulador do crescimento do hospedeiro (Kim et al. 2004). No presente estudo, também foram observadas divisões periclinais nas células do parênquima localizadas sob os tecidos necrosados, resultando, em muitos casos, no desenvolvimento de uma periderme de cicatrização que parece estar envolvida na restrição do crescimento do fungo. Alteração anatômica semelhante também foi descrita em folhas de citros infectadas por *E. fawcettii* (Paudyal et al. 2017).

Um achado intrigante deste estudo refere-se ao fato de que *Elsinoë ampelina*, um patógeno que não causa murcha, seja capaz de invadir, crescer e se reproduzir dentro dos elementos traqueais adjacentes às lesões. Embora a presença de hifas no interior do sistema vascular já tenha sido relatada para outros patógenos que também não causam murcha como *Pestalotia subcuticularis* e *Diplodia pinea* (Fail e Langenheim 1990; Flowers et al. 2006), não foi observada a reprodução desses patógenos no lume dos tecidos de condução. Diferentemente do observado no presente patossistema, as células do xilema e floema de "Switchgrass" (*Panicum virgatum*) não foram colonizadas por *Elsinoë panici* (Gabel e Tiffany 1987). Já as reações do hospedeiro nos elementos traqueais incluíram a presença de tilos que obstruíram completamente o lume do elemento de vaso, o que pode ser considerado um mecanismo de defesa da videira 'Niagara Rosada', limitando o desenvolvimento de *E. ampelina*. Estudos têm sido publicados demonstrando que a tilose e a reprodução dos patógenos no lume de células condutoras estão relacionadas com doenças que causam marchas em várias culturas (Beckman 1964; 1987). Até onde sabemos o comportamento de *E. ampelina*, verificado neste estudo, não foi observado em outros patógenos que não promovem murcha. Além disso, são necessários mais estudos para investigar se os conídios observados no lume dos vasos do xilema são transportados e a importância da tilose como um possível mecanismo de defesa.

Células conidiogênicas e conídios também estavam presentes na superfície das lesões necróticas. Tais lesões, em estágio avançado de colonização, em todos os órgãos avaliados, apresentaram tecidos altamente colapsados, cuja estrutura não podia mais ser distinguida. Alterações estruturais semelhantes também foram relatadas em folhas de videira infectadas por *E. ampelina* (Braga et al. 2019; Li et al. 2019). Neste momento, estruturas semelhantes a ascos, globosos e bitunicados estavam distribuídas irregularmente por todo o tecido de aspecto ascostromático. As características morfológicas das estruturas semelhantes a asco observadas neste estudo foram semelhantes às relatadas para outras espécies de *Elsinoë* (Zeigler e Lozano 1983; Gabel e Tiffany 1987; Jayawardena et al. 2014; Minutolo et al. 2016;

Fan et al. 2017). A presença concomitante de estrutura semelhante à ascostroma e de acérvulos, ambos com características morfológicas semelhantes às da família Elsinoaceae, nas lesões de antracnose é uma forte evidência de que os estágios sexuais e assexuais de *E. ampelina* ocorrem nas videiras americanas desde o início da epidemia. A ocorrência simultânea de estruturas sexuais e assexuadas nas mesmas lesões também foi observada em folhas de *Arbutus unedo* infectadas por *E. mattirolianum* (Arnaud e Bitancourt 1949). Acredita-se que os ascósporos, geralmente produzidos no final da estação de crescimento, sejam responsáveis pela infecção primária, a qual inicia a epidemia na próxima estação, de muitas doenças causadas por ascomicetos em regiões temperadas. Posteriormente, os esporos assexuais são responsáveis por infecções secundárias durante a estação de crescimento do hospedeiro (McCartney et al. 2006; Madden et al. 2007). No entanto, para *Elsinoë ampelina*, ambos os esporos assexuais e sexuais parecem ser produzidos durante a fase epidêmica. O mesmo comportamento foi relatado em patógenos foliares agressivos como *Microcyclus ulei*, o agente causal do mal-das-folhas da seringueira (*Hevea brasiliensis*) (Guyot e Guen 2018) e *Mycosphaerella musicola*, responsável pela Sigatoka amarela da banana (Rocha et al. 2012), ambos nos trópicos. Nestes patossistemas, ascósporos e conídios desempenham papéis importantes e complementares na epidemiologia da doença. Por exemplo, na América do Sul, os ascósporos são responsáveis por infecções primárias e secundárias, bem como pela sobrevivência dos patógenos e sua disseminação a longa distância. Por outro lado, os conídios são produzidos mais tardiamente quando as folhas doentes estão presentes no campo e contribuem para as infecções secundárias e dispersão a curta distância da doença (Guyot et al. 2014; Guyot e Guen 2018). Da mesma forma, na epidemiologia da Sigatoka amarela, cada tipo de esporo tem um papel distinto e complementar na sobrevivência do patógeno e no progresso da doença (Stover 1970; 1980). Para ambas as doenças, ascósporos e conídios contribuem para o rápido progresso da doença durante a estação chuvosa, dificultando seu controle (Bergamin Filho e Amorim 1996). Também foram relatados surtos de antracnose nas videiras quando os estágios iniciais do desenvolvimento das videiras coincidem com períodos prolongados de chuva e isso pode estar relacionado à presença concomitante de ascósporos e conídios.

Em conclusão, embora algumas alterações histológicas causadas por *Elsinoë ampelina* sejam semelhantes às descritas nas folhas, este trabalho traz novidades, como a formação de tilos e reprodução do patógeno nos elementos de vasos, formação de periderme

de cicatrização adjacente às áreas lesionadas e a possível presença de estruturas de reprodução assexuada de e sexuadas de *E. ampelina* na mesma lesão.

Referências

- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. Burlington, MA, USA: Elsevier Academic Press.
- Amorim, L., Spósito, M. B., Kuniyuki, H. (2016). Doenças da videira. In: Amorim L., Rezende J. A. M., Bergamin Filho, A., Camargo LEA, eds. *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. São Paulo, Brazil: Agronômica Ceres, 745-758.
- Arnaud, G., & Bitancourt, A. A. (1949). The Perfect Stage of the Fungus Causing Spot Anthracnose of *Arbutus Unedo* L. *Mycologia*, 41(3), 320-322.
- Beckman, C. H. (1964). Host responses to vascular infection. *Annual Review of Phytopathology*, 2(1), 231-252.
- Beckman, C. H. (1987). *The nature of wilt diseases of plants*. APS press.
- Ben- Daniel, B. H., Bar- Zvi, D. U. D. Y., & Tsrur, L. (2012). Pectate lyase affects pathogenicity in natural isolates of *Colletotrichum coccodes* and in *pelA* gene- disrupted and gene- overexpressing mutant lines. *Molecular plant pathology*, 13(2), 187-197.
- Bergamin Filho, A., & Amorim, L. (1996). *Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico*. São Paulo: Agronômica Ceres.
- Berlier, J. E., Rothe, A., et al. (2003). Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: fluorescence of the dyes and their bioconjugates. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 51(12), 1699-1712.
- Braga, Z. V., Santos, R. F., Amorim, L., & Appezzato-da-Glória, B. (2019). Histopathology of infection and colonisation of *Elsinoë ampelina* on grapevine leaves. *European Journal of Plant Pathology*, 1-11.
- Brook, P. J. (1973). Epidemiology of grapevine anthracnose caused by *Elsinoë ampelina*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 16(3), 333-342.
- Carisse, O., & Morissette-Thomas, V. (2013). Epidemiology of grape anthracnose: Factors associated with defoliation of grape leaves infected by *Elsinoë ampelina*. *Plant disease*, 97(2), 222-230.
- Chung, K. R. (2011). *Elsinoë fawcettii* and *Elsinoë australis*: the fungal pathogens causing citrus scab. *Molecular plant pathology*, 12(2), 123-135.
- Fail, G. L., & Langenheim, J. H. (1990). Infection processes of *Pestalotia subcuticularis* on leaves of *Hymenaea courbaril*. *Phytopathology*, 80(11), 1259-1265.

- Fan, X. L., Barreto, R. W., Groenewald, J. Z., et al. (2017). Phylogeny and taxonomy of the scab and spot anthracnose fungus *Elsinoë* (Myriangiales, Dothideomycetes). *Studies in mycology*, 87, 1-41.
- Feder, N. E. D., & O'brien, T. P. (1968). Plant microtechnique: some principles and new methods. *American journal of botany*, 55(1), 123-142.
- Flowers, J. L., Hartman, J. R., & Vaillancourt, L. J. (2006). Histology of *Diplodia pinea* in diseased and latently infected *Pinus nigra* shoots. *Forest Pathology*, 36(6), 447-459.
- Gabel, A. W., & Tiffany, L. H. (1987). Host-parasite relations and development of *Elsinoë panici*. *Mycologia*, 79(5), 737-744.
- Gómez, R. F. J., Navarro- Cerrillo, R. M., Sánchez- Cuesta, R., & Pérez- de- Luque, A. (2015). Histopathology of infection and colonization of *Quercus ilex* fine roots by *Phytophthora cinnamomi*. *Plant pathology*, 64(3), 605-616.
- Gregory, M., & Baas, P. (1989). A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel Journal of Botany*, 38(2-3), 125-174.
- Guyot, J., Condina, V., Doaré, F., Cilas, C., & Sache, I. (2014). Role of ascospores and conidia in the initiation and spread of South American leaf blight in a rubber tree plantation. *Plant pathology*, 63(3), 510-518.
- Guyot, J., & Le Guen, V. (2018). A review of a century of studies on South American leaf blight of the rubber tree. *Plant disease*, 102(6), 1052-1065.
- Herbert, C., O'Connell, R., Gaulin, E., Salesses, V., Esquerré-Tugayé, M. T., & Dumas, B. (2004). Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. *Fungal Genetics and Biology*, 41(2), 140-147.
- Horridge, G. A., & Tamm, S. L. (1969). Critical point drying for scanning electron microscopic study of ciliary motion. *Science*, 163(3869), 817-818.
- Jayawardena, R. S., Ariyawansa, H. A., Singtripop, C., et al. (2014). A re-assessment of Elsinoaceae (Myriangiales, Dothideomycetes). *Phytotaxa*, 176(1), 120-138.
- Karnovsky, J. M. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27, 137-138.
- Kim, K. W., Hyun, J. W., & Park, E. W. (2004). Cytology of cork layer formation of citrus and limited growth of *Elsinoë fawcettii* in scab lesions. *European journal of plant pathology*, 110(2), 129-138.
- Kimati H, Galli F, 1980. Doenças da videira - *Vitis* spp. In: Galli F. (Ed). *Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas*. Agronômica Ceres, 547-587.

- Kono, A., Nakaune, R., Yamada, M., Nakano, M., Mitani, N., & Ueno, T. (2009). Effect of culture conditions on conidia formation by *Elsinoë ampelina*, the causal organism of grapevine anthracnose. *Plant disease*, 93(5), 481-484.
- Kono, A., Sato, A., Nakano, M., Yamada, M., Mitani, N., & Ban, Y. (2012). Evaluating grapevine cultivars for resistance to anthracnose based on lesion number and length. *American journal of enology and viticulture*, 63(2), 262-268.
- Li, Z., Dang, H., Yuan, X., He, J., Hu, Z., & Wang, X. (2018). Morphological characterization and optimization of conditions for conidial production of *Elsinoë ampelina*, the causal organism of grapevine anthracnose. *Journal of Phytopathology*, 166(6), 420-428.
- Li, Z., Zhang, S., Han, R., Zhang, H., Li, K., & Wang, X. (2019). Infection process and host responses to *Elsinoë ampelina*, the causal organism of grapevine anthracnose. *European Journal of Plant Pathology*, 1-12.
- Lorenz, D. H., Eichhorn, K. W., Bleiholder, H., Klose, R., Meier, U., & Weber, E. (1995). Phenological growth stages of the grapevine, *Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*. Codes and descriptions according to the extended BBCH scale. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 1(2), 100-103.
- Madden, L. V., Hughes, G., & Van Den Bosch, F. (2007). *The study of plant disease epidemics*.
- Magarey, R. D., Coffey, B. E., & Emmett, R. W. (1993). Anthracnose of grapevines, a review. *Plant Protection Quarterly*, 8(3), 106-110.
- Marques, J. P. R., Soares, M. K. M., & Appezzato-da-Glória, B. (2013). New staining technique for fungal-infected plant tissues. *Turkish Journal of Botany*, 37(4), 784-787.
- Mason, D. L., & Wilson, C. L. (1978). Fine-structure analysis of host–parasite relations in the spot anthracnose of *Desmodium*. *Phytopathology*, 68(1), 65.
- McCartney, H. A., Fitt, B. D. L., & West, J. S. (2006). Dispersal of foliar plant pathogens: mechanisms, gradients and spatial patterns: In: Cooke B.M., Jones D. G., Kaye, B., eds. *The Epidemiology of Plant Diseases*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 159-192.
- Minutolo, M., Nanni, B., Scala, F., & Alioto, D. (2016). *Sphaceloma coryli*: a reemerging pathogen causing heavy losses on hazelnut in southern Italy. *Plant disease*, 100(3), 548-554.
- Mirica, I. I. (1988). Anthracnose. *Compendium of Grape Diseases*. Pearson, RC, and AC Goheen (Eds.), 18-19.

- Paudyal, D. P., & Hyun, J. W. (2017). Infection and symptom development by citrus scab pathogen *Elsinoë fawcettii* on leaves of satsuma mandarin. *European Journal of Plant Pathology*, 148(4), 807-816.
- Du Plessis, S. J. (1940). Anthracnose of vines and its control in South Africa. Department of Agriculture, South Africa, *Science Bulletin*, 216.
- Rocha, H. S., Pozza, E. A., Uchôa, C. D. N., Cordeiro, Z. J. M., De Souza, P. E., Sussel, Â. A. B., & De Rezende, C. A. (2012). Temporal progress of yellow Sigatoka and aerobiology of *Mycosphaerella musicola* Spores. *Journal of Phytopathology*, 160(6), 277-285.
- Sakai, W. S. (1973). Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain technology*, 48(5), 247-249.
- Santos, R. F., Ciampi- Guillard, M., Amorim, L., Massola, N. S., & Spósito, M. B. (2018a). Aetiology of anthracnose on grapevine shoots in Brazil. *Plant pathology*, 67(3), 692-706.
- Santos, R. F. D., Spósito, M. B., Ayres, M. R., & Sosnowski, M. R. (2018b). 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, R. F., Spósito, M. B., Ayres, M., & Sosnowski, M. (2018c). In vitro production of conidia of *Elsinoë ampelina*, the causal fungus of grapevine anthracnose. *European journal of plant pathology*, 152(3), 815-821.
- Sawant, I. S., Narkar, S. P., Shetty, D. S., Upadhyay, A., & Sawant, S. D. (2012a). Emergence of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato as the dominant pathogen of anthracnose disease of grapes in India as evidenced by cultural, morphological and molecular data. *Australasian Plant Pathology*, 41(5), 493-504.
- Sawant, I. S., Narkar, S. P., Shetty, D. S., Upadhyay, A., & Sawant, S. D. (2012b). First report of *Colletotrichum capsici* causing anthracnose on grapes in Maharashtra, India. *New Disease Reports*, 25(2), 2044-0588.
- Schilder, A. M. C., Smokevitch, S. M., Catal, M., Mann, W.K., 2005. First report of anthracnose caused by *Elsinoë ampelina* on grapes in Michigan. *Plant Disease*, 89, 1011.
- Shih, J., Wei, Y., & Goodwin, P. H. (2000). A comparison of the pectate lyase genes, pel-1 and pel-2, of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. malvae and the relationship between their expression in culture and during necrotrophic infection. *Gene*, 243(1-2), 139-150.
- Sosnowski, M., Emmett, B., Clarke, K., & Wicks, T. (2007). Susceptibility of table grapes to black spot (anthracnose) disease. *Australian and New Zealand grapegrower and winemaker*, (521), 8-11.

- Stover, R. H. (1970). Leaf spot of bananas caused by *Mycosphaerella musicola*: role of conidia in epidemiology. *Phytopathology*, 60(5), 856-860.
- Stover, R. H. (1980). Sigatoka Leaf Spots of of bananas and plantains. *Plant disease*, 64(8), 751.
- Suhag, L. S, Grover, R. K. (1972). Overwintering and control of *Elsinoë ampelina*, the cause of grapevine anthracnose. In: Chadha K., Randhowa, G., Pal. R., eds. *Viticulture in the Tropics*. New Delhi: Horticultural Society of India, 294-299.
- Thind, T. S., Arora J. K., Mohan C., & Raj P. (2004). Epidemiology of powdery mildew, downy mildew and anthracnose diseases of grapevine. In S. A. M. H. Naqvi (Ed.), *Diseases of Fruits and Vegetables*. Dordrecht: Springer. 621-638.
- Thind, T. S. (2015). Anthracnose. In W. Wilcox, W. Gubler & J. Uyemoto (Eds.), *Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests*. St Paul: APS Press. 17-19.
- Timmer, L. W. (2000). Roña de los cítricos (Citrus scab). In: Duran-Vila N., Moreno P, eds. *Enfermedades de los Cítricos*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 41-42.
- Wang, L. Y., Liao, H. L., Bau, H. J., & Chung, K. R. (2009). Characterization of pathogenic variants of *Elsinoë fawcettii* of citrus implies the presence of new pathotypes and cryptic species in Florida. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 31(1), 28-37.
- Wilson, W. D., Tanious, F. A., Barton, H. J., Jones, R. L., Fox, K., Wydra, R. L., & Streckowski, L. (1990). DNA sequence dependent binding modes of 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry*, 29(36), 8452-8461.
- Zeigler, R. S., & Lozano, J. C. (1983). The relationship of some *Elsinoë* and *Sphaceloma* species pathogenic on cassava and other Euphorbiaceae in Central and South America. *Phytopathology*, 73(2), 293-300.

4. ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM FOLHAS DE *VITIS LABRUSCA* L. ‘NIAGARA ROSADA’ EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *ELSINOË AMPELINA*

Resumo

A fim de verificar as alterações bioquímicas foliares em *Vitis labrusca* L. ‘Niagara Rosada’ causadas por *Elsinoë ampelina*, foram analisadas folhas sadias aos 4 e 11 dias após o brotamento (dab), bem como folhas de 11dab inoculadas com o fungo. As avaliações incluíram alguns indicadores bioquímicos considerados importantes na defesa contra a antracnose, sendo estes: compostos fenólicos totais, flavonoides totais, clorofilas *a*, *b* e total e atividades enzimáticas de peroxidase e polifenoloxidase. As análises indicaram que a concentração de compostos fenólicos totais (mgTAE g⁻¹) foi maior em folhas de 4dab (9,54 ± 0,30) e menor em folhas de 11dab (5,61 ± 0,35), ambas sadias. Em folhas de 11dab inoculadas houve um ligeiro aumento na concentração dos conteúdos (6,41 ± 0,62), mas sem diferenças significativas em relação às folhas sadias da mesma idade. Os teores de flavonoides totais (mgRE g⁻¹) foram similares entre folhas sadias de 4dab (0,63 ± 0,01) e 11dab (0,63 ± 0,02). Entretanto, as folhas inoculadas apresentaram maior concentração de flavonoides (0,75 ± 0,05). Para o conteúdo das clorofilas analisadas (mg g⁻¹ massa fresca) não houve diferenças significativas entre folhas sadias e inoculadas. A atividade de peroxidase (U mL⁻¹) não apresentou diferença significativa entre folhas de 11dias sadias (13,47 ± 0,76) e inoculadas (16,33 ± 0,23). No entanto, diferiu quanto à idade foliar, sendo mais ativa em folhas de 11dab em relação às folhas de 4dab (7,93 ± 2,66). Por outro lado, a atividade de polifenoloxidase (U mL⁻¹) variou tanto em função do desenvolvimento foliar quanto entre folhas sadias e inoculadas, exibindo a menor atividade em folhas de 4dab sadias (1,49 ± 0,10) e aumentando, significativamente, em folhas de 11dab sadias (11,07 ± 0,23) e em folhas de 11dab inoculadas (15,20 ± 0,60). Portanto, nas folhas de *Vitis labrusca* ‘Niagara Rosada’ o teor de flavonoides e a atividade da polifenoloxidase aumentam após a infecção por *E. ampelina*, porém tais aumentos não são suficientes para impedir o avanço da doença.

Palavras-chave: Niagara Rosada; Antracnose; Flavonoides; Polifenoloxidase

Abstract

In order to verify biochemical leaf changes in *Vitis labrusca* L. ‘Niagara Rosada’ caused by *Elsinoë ampelina*, healthy leaves were analyzed at 4 and 11 days after budding (dab), as well as leaves at 11 dab inoculated with the fungus. The evaluations included some biochemical indicators considered important in the defense against anthracnose, such as: chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophyll content, total phenolic compounds, total flavonoid and peroxidase and polyphenoloxidase enzymatic activities. The analyses indicated that the concentration of total phenolic compounds (mgTAE g⁻¹) was higher in 4dab leaves (9.54 ± 0.30) and lower in 11dab leaves (5.61 ± 0.35), both healthy. In 11 dab inoculated leaves, there was a slight increase in the concentration of contents (6.41 ± 0.62) but without significant differences concerning healthy leaves of the same age. Total flavonoid contents (mgRE g⁻¹) were similar between healthy leaves of 4dab (0.63 ± 0.01) and 11dab (0.63 ± 0.02). However, inoculated leaves presented a higher concentration of flavonoids (0.75 ± 0.05). For chlorophylls content (mg g⁻¹ fresh mass), there were no significant differences between healthy and inoculated leaves. Peroxidase activity (U mL⁻¹) exhibited no significant difference between healthy (13.47 ± 0.76) and inoculated (16.33 ± 0.23) 11 dab leaves. However, it differed in leaf age, being more active in leaves of 11 dab compared to leaves of 4 dab (7.93 ± 2.66). In contrast, polyphenoloxidase activity (U mL⁻¹) varied as a function of leaf development and between both healthy and inoculated leaves, showing the lowest activity in healthy 4 dab leaves (1.49 ± 0.10) and significantly increasing, in healthy 11 dab leaves (11.07 ± 0.23) and inoculated 11 dab leaves (15.20 ± 0.60). Therefore, in *Vitis labrusca* ‘Niagara

Rosada' leaves, total flavonoid content and polyphenoloxidase activity increase after *E. ampelina* infection, but such increases are not sufficient to prevent disease progression.

Keywords: Niagara Rosada; Anthracnose; Flavonoid; Polyphenoloxidase

4.1. Introdução

A antracnose é considerada umas das principais doenças da videira. No Brasil é causada pelo ascomiceto *Elsinoë ampelina* (Santos et al. 2018a) e ocasiona sérios danos em *Vitis vinifera* (Kono et al. 2013; Li et al. 2018; Murria et al. 2018a) e *Vitis labrusca* (Barros et al. 2015; Santos et al. 2018b). A doença atinge órgãos aéreos, sendo os tecidos jovens, verdes e suculentos os mais suscetíveis (Brook 1973; Thind et al. 2004; Thind 2015). Seus sintomas incluem lesões necróticas isoladas que podem coalescer, as quais são circulares em folhas e frutos, e alongadas em pecíolo, gavinhas e caules (Brook 1973; Thind et al. 2004; Thind 2015). Podem afetar diretamente a atividade fotossintética, o crescimento e da produção de frutos (Thind et al. 2004; Carisse e Lefebvre 2011; Carisse e Morissette-Thomas 2013). No entanto, as plantas possuem mecanismos que podem impedir ou retardar interações desfavoráveis com outros microrganismos (Murria et al. 2018c). Mecanismos esses estruturais ou bioquímicos, sejam eles constitutivos ou induzidos (Pascholati e Dalio 2018).

Para a antracnose da videira, o ciclo da doença e os aspectos estruturais de defesa vêm sendo esclarecidos apenas recentemente tanto para *V. vinifera* (Li et al. 2019) como para *V. labrusca* (Braga et al. 2019). Já os aspectos bioquímicos têm sido estudados somente em cultivares de *V. vinifera* (Shankar e Jindal 2001; Rusjan et al. 2012; Gurjar et al. 2015; Murria et al. 2018a; 2018c). Em todos os estudos, os indicadores bioquímicos possibilitaram classificar as cultivares como susceptíveis ou resistentes à antracnose. A concentração de compostos fenólicos totais e a atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, por exemplo, foram maiores em cultivares resistentes tanto na forma constitutiva como induzida (Shankar e Jindal 2001; Gurjar et al. 2015; Murria et al. 2018a) o que possibilitou relacioná-los diretamente à resistência à antracnose. O aumento no teor de flavonoides após a infecção por *Elsinoë ampelina* correspondeu a outro parâmetro bioquímico relacionado a defesa em *Vitis vinifera*, comprovado tanto por análises bioquímicas (Rusjan et al. 2012) como por expressão gênica (Islam et al. 2016). Além disso, análises nos teores de clorofilas vêm sendo realizadas para avaliar o impacto das lesões sobre a atividade fotossintética (Rusjan et al. 2012; Murria et al. 2018b; 2018c).

Como mencionado, para cultivares de *Vitis labrusca*, não há estudos que demonstrem as alterações bioquímicas após a infecção por *E. ampelina*. Dessa forma, é proposta deste capítulo avaliar os principais indicadores bioquímicos de defesa, relacionados à antracnose, em folhas da videira ‘Niagara Rosada’.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Material vegetativo e inoculação

Para as análises de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, clorofilas *a*, *b* e totais e enzimas peroxidases e polifenoloxidase, 30 plantas de ‘Niagara Rosada’ (*Vitis labrusca*), enxertada em porta-enxerto IAC-766, foram separadas em grupos de 10 plantas. Um grupo foi destinado para avaliar as atividades bioquímicas das folhas sadias aos 4 dias após o brotamento (dab); no segundo grupo, as folhas com 04 dab foram inoculadas com o patógeno, sendo coletadas e avaliadas após 7 dias, completando 11dab (Fig. 1b) e, no grupo restante, as folhas com 11 dab foram usadas como controle, ou seja, não inoculadas com o patógeno (Fig. 1a) visando verificar se as possíveis alterações bioquímicas estariam relacionadas ao desenvolvimento foliar ou em resposta à infecção.

A suspensão conidial foi obtida a partir do o isolado AVBR118 de *Elsinoë ampelina* (Santos et al. 2018b) macerando 16 cm² da colônia e transferido os fragmentos para um balão cônico de 125 mL contendo 40 mL de água destilada estéril. Para induzir a esporulação a suspensão foi incubada em agitador orbital (Tecnal, Brasil) por 7 dias a 25 °C no escuro (Santos et al. 2018c). Após isso, a suspensão foi filtrada e ajustada para 10⁵ conídios mL⁻¹. A inoculação foi realizada pulverizando a suspensão em toda a planta até o ponto de escorrimento. As folhas do grupo controle foram pulverizadas com água destilada estéril. Plantas inoculadas e controle foram mantidas na câmara de incubação com umidade relativa próxima a 100% durante 48 horas a 25 °C no escuro. Posteriormente, foram submetidas a um fotoperíodo de 12 horas por 7 dias e coletadas após 7 dias.

Figura 1: Folhas de *Vitis labrusca* ‘Niagara Rosada’ 11 dias após a brotação utilizadas nas análises de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, clorofilas *a*, *b* e *totais* e atividades enzimáticas de peroxidases e polifenoloxidase. **a.** Folhas saudias. **b-d.** Folhas inoculadas com *Elsinoë ampelina*.

4.2.2. Extrato metanólico

Para as avaliações de fenólicos totais, flavonoides e clorofilas *a*, *b* e total obteve-se, previamente, um extrato metanólico. Para isso, amostras foliares saudias e inoculadas foram maceradas, separadamente, em nitrogênio líquido. Em seguida, cada macerado foi diluído em metanol na relação 1:10 e submetido a uma temperatura de 60 °C por 1h, agitando-os a cada 10 min. Após essa etapa as amostras foram peneiradas e os extratos armazenados em freezer a -22°C.

4.2.3. Compostos fenólicos totais

Conforme estabelecido por Julkunen-Tiitto (1985) com modificações, adicionou-se 500 μL de solução Folin-Ciocalteu (reagente Folin-Ciocalteu e água destilada na proporção de 1:10) em 1000 μL do extrato metanólico obtido de folhas sadias e inoculadas. Após 40 min. acrescentou-se 2,5 mL de carbonato de sódio 20% (m/v) e procedeu-se as leituras em espectrofotômetro UV Mini-1240 (Shimadzu; Kyoto, Japan) em comprimento de onda de 725 nm. As concentrações de fenólicos totais foram realizadas em triplicata (repetição analítica) e determinadas em relação à curva de concentrações de 0 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de solução de ácido tânico 0,1 mg mL^{-1} .

4.2.4. Flavonoides totais

Para análise de flavonoides totais utilizou-se o método estabelecido por Mabry et al. (1970) com modificações. Assim, em 500 μL do extrato metanólico foram adicionados 4,3 mL de etanol 70%, 100 μL de solução de cloreto de alumínio 2% em metanol e 100 μL de solução de acetato de sódio 1 mol L^{-1} , mantendo-se em descanso em temperatura ambiente por 40 min. Após o tempo de reação, as leituras foram obtidas em espectrofotômetro UV Mini-1240 (Shimadzu; Kyoto, Japan) em comprimento de onda de 415 nm. As concentrações de flavonoides das amostras foram realizadas em triplicata (repetições analíticas) e determinadas em relação à curva de concentrações de 0 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de solução de rutina 0,5 mg mL^{-1} .

4.2.5. Clorofilas *a*, *b* e total

O método utilizado foi de acordo com Whitham et al. (1971) no qual as leituras foram obtidas diretamente dos extratos metanólicos por meio de espectrofotômetro UV Mini-1240 (Shimadzu; Kyoto, Japão) nos comprimentos de onda 645, 652 e 663 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata (repetições analíticas). Para o cálculo das concentrações de clorofila foram utilizadas as equações descritas abaixo e os resultados obtidos expressos em mg de clorofila por grama de material fresco.

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

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

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

A₆₆₃: absorvância a 663 nm; A₆₄₅: absorvância a 645 nm; A₆₅₂: absorvância a 652 nm; V: volume final de extrato metanólico de clorofila (mL); W: massa de matéria da planta (g).

4.2.6. Atividades Enzimáticas

Para a análise de atividades enzimáticas, folhas sadias e inoculadas foram maceradas, separadamente, em nitrogênio líquido. Os macerados foram diluídos em tampão fosfato de sódio pH 6,7 na relação 1:5. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 3000 rpm por 5 min a 25°C e o sobrenadante utilizado nas análises de peroxidase e polifenoloxidase.

4.2.6.1. Atividade de peroxidase

Em um 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 sendo agitado e incubado em banho-maria a 25 °C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 400 µL de peróxido de hidrogênio em tampão e 100 µL do sobrenadante em tampão fosfato de sódio monobásico 0,1 mol L⁻¹ (pH = 6,7). As leituras em triplicata (repetições analíticas) foram realizadas em espectrofotômetro UV-Mini 1240 (Shimadzu; Tokio, Japão) a 470 nm por 5 minutos (Khan e Robinson 1994; Holschuh 2000).

4.2.6.2. Atividade de polifenoloxidase

Em tubo de ensaio foram adicionados 2,9 mL de solução de pirocatecol em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ e incubado em banho-maria a 25 °C por 10 minutos. Em seguida foi adicionado 100 µL do sobrenadante 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 1995; Lima et al. 2001).

4.2.7. Análises Estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os dados analisados estatisticamente utilizando o software R e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3. Resultados

Na videira ‘Niagara Rosada’ (*Vitis labrusca* L.) a concentração de compostos fenólicos totais (mgTAE g⁻¹) variou em função do desenvolvimento foliar, ou seja, os valores foram maiores em folhas sadias de 4dab ($9,54 \pm 0,30$) em relação às folhas sadias de 11dab ($5,61 \pm 0,35$). Em folhas de 11dab inoculadas, embora tenha sido observado um ligeiro aumento na concentração ($6,41 \pm 0,62$), essa foi significativamente menor que nas folhas sadias de 4dab, porém os valores não diferiram das folhas sadias da mesma idade. Os teores de flavonoides totais (mgRE g⁻¹) foram similares entre folhas sadias de 4dab ($0,63 \pm 0,01$) e 11dab ($0,63 \pm 0,02$). Entretanto, em folhas inoculadas houve uma maior atividade desses metabólitos ($0,75 \pm 0,05$) (Fig.2).

Para o conteúdo das clorofilas analisadas (mg g⁻¹ massa fresca) não houve diferenças significativas entre folhas sadias e inoculadas, mas seus valores absolutos aumentaram conforme o desenvolvimento foliar, com exceção da clorofila *b* que apresentou uma maior uniformidade entre as amostras analisadas. Para clorofila *a* o menor valor ocorreu em folhas de 4dab sadias ($0,63 \pm 0,07$), o valor intermediário em folhas de 11dab sadias ($0,77 \pm 0,04$) e o maior valor em folhas de 11dab inoculadas ($0,80 \pm 0,12$). Já para clorofila *b* o menor valor foi atribuído a folhas de 11dab sadias ($0,42 \pm 0,04$), com valores muito próximos nas folhas de 4dab sadias ($0,43 \pm 0,06$) e de 11dab inoculadas ($0,43 \pm 0,07$). O teor de clorofila total seguiu o mesmo padrão da clorofila *a*, sendo o menor valor para folhas de 4dab ($0,97 \pm 0,43$), o valor intermediário para folhas de 11dab sadias ($1,29 \pm 0,071$) e o maior valor para folhas de 11dab inoculadas ($1,35 \pm 0,19$) (Fig. 2).

A atividade da enzima peroxidase (U mL⁻¹) aumentou significativamente com o desenvolvimento foliar, ou seja, o menor valor para folhas sadias de 4dab ($7,93 \pm 2,66$) e o maior valor para folhas sadias de 11 dab ($13,47 \pm 0,76$). No entanto, não houve diferença

significativa na atividade enzimática entre as folhas sadias de 11 dab ($13,47 \pm 0,76$) e as folhas inoculadas ($16,33 \pm 0,23$) (Fig. 3).

Em contrapartida, a atividade de polifenoloxidase (U mL^{-1}) variou tanto em função do desenvolvimento foliar quanto entre folhas sadias e inoculadas, exibindo a menor atividade em folhas de 4dab sadias ($1,49 \pm 0,10$) e aumentando, significativamente, em folhas de 11dab sadias ($11,07 \pm 0,23$) e em folhas de 11dab inoculadas ($15,20 \pm 0,60$) (Fig. 3).

Figura 2. Análises bioquímicas em folhas de *Vitis labrusca* 'Niagara Rosada' antes e após infecção por *Elsinoë ampelina*.

Figura 3. Atividade enzimática em folhas de *Vitis labrusca* 'Niagara Rosada' antes e após infecção por *Elsinoë ampelina*.

4.4. Discussão

Em videiras, os tecidos jovens e tenros são os mais susceptíveis à antracnose (Brook 1973; Thind et al. 2004; Thind 2015). E, embora em ‘Niagara Rosada’ a concentração de compostos fenólicos tenha sido maior em folhas de 4dab, não foi suficiente para conter a infecção por *Elsinoë ampelina*, ratificando estudos anteriores (Braga et al. 2019; Muniz 2019). Além disso, a reduzida síntese de compostos fenólicos após a infecção reforça a hipótese de que esses compostos não atuam como mecanismos de defesa em ‘Niagara Rosada’. Entretanto, em cultivares de *Vitis vinifera* parecem ser mais efetivos, como verificado em estudo de Muria et al. (2018a) que observaram um aumento desses compostos em cultivares resistentes à antracnose após a infecção por *E. ampelina*.

Estudos qualificaram *V. labrusca* e híbridos como resistente ou moderadamente resistentes à antracnose (Kim et al. 2008; Poolsawat et al. 2012), sendo atribuídos a fatores genéticos as fontes dessa resistência (Kim et al. 2008). Porém, para as condições brasileiras, a espécie foi considerada altamente susceptível à doença em função de sua severidade (Santos et al. 2018b). Contudo, os mecanismos potenciais de resistência ou susceptibilidade em relação ao patossistema ainda não estão totalmente esclarecidos.

Contrariamente aos resultados obtidos para os compostos fenólicos, a concentração dos flavonoides totais não variou entre as idades foliares, mas aumentou após a infecção por *Elsinoë ampelina*. Esse grupo de metabólicos possui importante papel na resistência de plantas (Treutter 2006). Em cultivares de *Vitis vinifera*, por exemplo, flavonoides constitutivos foram capazes de retardar a infecção por *Plasmopara viticola* (Latouche et al. 2012). Além disso, sua ação de defesa em *V. vinifera* também se estendeu na forma induzida, aumentando após o ataque por cochonilha (*Paracoccus marginatus*) (Murria et al. 2018b) e *Gloeosporium ampelophagum* (Sin.: *Elsinoë ampelina*) (Murria et al. 2018c). Em *V. flexuosa*, genes relacionados à biossíntese de flavonoides também foram regulados em resposta à infecção por *E. ampelina* (Islam et al. 2016). Segundo os autores, os resultados obtidos no estudo sugerem que os mecanismos de defesa da espécie contra o patógeno incluem a lignificação e produção de fitoalexina e antocianina.

As concentrações de clorofila *a*, *b* e total não apresentaram diferenças significativas entre as amostras analisadas. No entanto, os valores absolutos demonstram um incremento desses pigmentos em função do desenvolvimento foliar, incluindo em folhas inoculadas que exibiram diversas lesões no momento da análise. Nesse caso, seria esperada uma diminuição nos teores de clorofila, pois considerando Senthil et al. (2010) patógenos podem produzir

metabólitos tóxicos que causam a destruição dos cloroplastos, assim como verificado em outros patossistemas que promovem lesões foliares (Lobato et al. 2009; Rusjan et al. 2012; Murria et al. 2018b; 2018c). Neste estudo, o período de coleta pode ter influenciado o resultado, pois em pesquisa anterior a severidade e o grau das lesões em ‘Niagara Rosada’ foram mais intensos aos 15 dias após a inoculação (Braga et al. 2019).

Sobre as atividades enzimáticas, diversos estudos já demonstraram a ação de defesa das peroxidases e polifenoloxidase sobre a antracnose da videira (Shankar e Jindal 2001; Rusjan et al. 2012; Gurjar et al. 2015; Murria et al. 2018a; 2108c). No entanto, nesta pesquisa, apenas a atividade da polifenoloxidase apresentou aumento significativo após a infecção por *Elsinoë ampelina* o que pode explicado pelo estresse biótico causado pelo ataque do patógeno (Murria et al. 2018a). É interessante ressaltar que a suscetibilidade ao patógeno é maior em folhas mais jovens (Brook 1973; Thind et al. 2004; Thind 2015) e que a atividade da polifenoloxidase foi significativamente menor em folhas de 4dab quando comparada com as folhas de 11dab. O aumento significativo na atividade dessa enzima em folhas inoculadas em relação às folhas sadias de 4 e 11 dab ratifica a sua importância na resposta das videiras à antracnose (Shankar e Jindal 2001; Gurjar et al. 2015; Murria et al. 2018a). Sabe-se que a polifenoloxidase leva à conversão de polifenóis em quinonas que são tóxicas aos patógenos (Shankar e Jindal, 2001). A atividade reduzida da enzima peroxidase em folhas de 4 dab poderia explicar a maior susceptibilidade dessas folhas à antracnose, pois segundo Murria et al. (2018a) a ação da peroxidase impede o avanço de infecção em *Vitis vinifera*. De fato, em ‘Niagara Rosada’ folhas de 4dab não apresentaram resistência contra *E. ampelina* (Braga et al. 2019).

Em conclusão, nas folhas de *Vitis labrusca* ‘Niagara Rosada’ o teor de flavonoides e a atividade da polifenol oxidase aumentam após a infecção por *Elsinoë ampelina*, porém tais aumentos não são suficientes para impedir o avanço da doença.

Referências

- Barros, L. B., Biasi, L. A., Carisse, O., & De Mio, L. L. M. (2015). Incidence of grape anthracnose on different *Vitis labrusca* and hybrid cultivars and rootstocks combination under humid subtropical climate. *Australasian Plant Pathology*, 44, 397-403.
- Braga, Z. V., Santos, R. F., Amorim, L., & Appezzato-da-Glória, B. (2019). Histopathology of infection and colonisation of *Elsinoë ampelina* on grapevine leaves. *European Journal of Plant Pathology*, 1-11.
- Brook, P. J. (1973). Epidemiology of grapevine anthracnose caused by *Elsinoë ampelina*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 16, 333-342.
- Carisse, O., & Lefebvre, A. (2011). A model to estimate the amount of primary inoculum of *Elsinoë ampelina*. *Plant disease*, 95, 1167-1171.
- 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.
- Fennell, J. L. (1948). Inheritance studies with the tropical grape. *Journal of Heredity*, 39: 54-56.
- 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 Science and Nature*, 6(2), 248-255.
- Holschuh, H. J. (2000). Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.). Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas.
- Islam, M. Z., Ahn, S. Y., Kim, S. A., Kwack, Y. B., & Yun, H. K. (2016). Expression of genes related with defense responses against pathogen infections in *Vitis flexuosa*. *Plant Breed Biotechnol*, 4(3), 324-335.
- Julkunen-Tiitto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 33(2), 213-217.
- Poolsawat, O., Tharapreuksapong, A., Wongkaew, S., Chaowiset, W., & Tantasawat, P. (2012). Laboratory and field evaluations of resistance to *Sphaceloma ampelinum* causing anthracnose in grapevine. *Australasian Plant Pathology*, 41(3), 263-269.

- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 3954-3962.
- Khan, A. A., & Robinson, D. S. (1994). Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. *Food chemistry*, 49(4), 407-410.
- Kim, G. H., Yun, H. K., et al. (2008). Identification of AFLP and RAPD markers linked to anthracnose resistance in grapes and their conversion to SCAR markers. *Plant breeding*, 127(4), 418-423.
- 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(12), 1433-1439.
- Latouche, G., Bellow, S., Poutaraud, A., Meyer, S., & Cerovic, Z. G. (2013). Influence of constitutive phenolic compounds on the response of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves to infection by *Plasmopara viticola*. *Planta*, 237(1), 351-361.
- Li, Z., Dang, H., Yuan, X., He, J., Hu, Z., & Wang, X. (2018). Morphological characterization and optimization of conditions for conidial production of *Elsinoë ampelina*, the causal organism of grapevine anthracnose. *Journal of Phytopathology*, 166(6), 420-428.
- Li, Z., Zhang, S., Han, R., Zhang, H., Li, K., & Wang, X. (2019). Infection process and host responses to *Elsinoë ampelina*, the causal organism of grapevine anthracnose. *European Journal of Plant Pathology*, 1-12.
- Lima, E. D. P. A., Pastore, G. M., & Lima, C. A. D. A. (2001). Purificação da enzima polifenoloxidase (PFO) de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) madura. *Ciência e Tecnologia dos 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., ... & Sousa, L. L. (2009). Changes in photosynthetic pigment and carbohydrate content in common bean cultivars infected by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plant Soil Environ*, 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* (pp. 35-40). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Muniz, L. F. (2019). Características estruturais e químicas foliares de *Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L. e sua relação com a resposta à antracnose da videira (Dissertação), Universidade de São Paulo).

- Murria, S., 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*, 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.
- Oktay, M., Küfreviölu, I., Kocaçalışkan, I., & Şakırolu, 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.
- Rusjan, D., Halbwirth, H., Stich, K., Mikulič-Petkovšek, M., & Veberič, R. (2012). Biochemical response of grapevine variety 'Chardonnay' (*Vitis vinifera* L.) to infection with grapevine yellows (Bois noir). *European journal of plant pathology*, 134(2), 231-237.
- Santos, R. F., Ciampi- Guillard, M., Amorim, L., Massola, N. S., & Spósito, M. B. (2018a). Aetiology of anthracnose on grapevine shoots in Brazil. *Plant pathology*, 67(3), 692-706.
- Santos, R. F. D., Spósito, M. B., Ayres, M. R., & Sosnowski, M. R. (2018b). 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, R. F., Spósito, M. B., Ayres, M., & Sosnowski, M. (2018c). In vitro production of conidia of *Elsinoë ampelina*, the causal fungus of grapevine anthracnose. *European journal of plant pathology*, 152(3), 815-821.
- Senthil, V., Ramasamy, P., Elaiyaraja, C., & Elizabeth, A. R. (2010). Some phytochemical prosperities affected by the infection of leaf spot disease of *Cucumis sativus* (Linnaeus) caused by *Penicillium notatum*. *African Journal of Basic & Applied Sciences*, 2(3-4), 64-70.
- Shankar, A. B., & Jindal, P. C. (2001). Biochemical resistance of grape genotypes against anthracnose. *Indian Journal of Agricultural Research*, 35(1), 44-47.

- Thind, T. S. (2015). Anthracnose. In W. Wilcox, W. Gubler & J. Uyemoto (Eds.), *Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests* (pp. 17-19). St Paul: APS Press.
- Thind, T. S., Arora J. K., Mohan C., & Raj P. (2004). Epidemiology of powdery mildew, downy mildew and anthracnose diseases of grapevine. In S. A. M. H. Naqvi (Ed.), *Diseases of Fruits and Vegetables* (pp. 621-638). Dordrecht: Springer.
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4(3), 147.
- Whitham, F. H., Blaydes, D. F., & Devlin, R. M. (1971). *Experiments in plant physiology* (pp. 55-58).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Além de elucidar os processos de infecção e de colonização por *Elsinoë ampelina* na videira ‘Niagara Rosada’, dados importantes sobre a reprodução do fungo são apresentados. Pela primeira vez foi detectada a reprodução assexuada do patógeno no interior dos vasos xilemáticos e a possibilidade da presença da sua forma sexuada no Brasil. Do ponto de vista estrutural e bioquímico, os dados mostram que a cultivar responde à presença do fungo, porém, os mecanismos de defesa acionados não são suficientes para impedir o avanço do patógeno nos tecidos analisados.