Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Efeito da temperatura na interação entre *Neophysopella tropicalis* e as videiras cv. Niagara Rosada e cv. Cabernet Sauvignon

Júlia Boscariol Rasera

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

Piracicaba 2020 Júlia Boscariol Rasera Engenheira Agrônoma

Efeito da temperatura na interação entre *Neophysopella tropicalis* e as videiras cv. Niagara Rosada e cv. Cabernet Sauvignon

> Orientador: Profa. Dra. **BEATRIZ APPEZZATO-DA-GLÓRIA** Coorientador: Profa. Dra. **LILIAN AMORIM**

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

Piracicaba 2020

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

Rasera, Júlia Boscariol

Efeito da temperatura na interação entre *Neophysopella tropicalis* e as videiras cv. Niagara Rosada e cv. Cabernet Sauvignon/ Júlia Boscariol Rasera. - - Piracicaba, 2020.

89 p.

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

1. Ferrugem da videira 2. Estresse 3. Abiótico 4. Biótico. I. Título

Dedico este trabalho a minhas ancestrais. Especialmente a Naide Nalin Boscariol (em memória), quem me inspirou a amar a vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deusa, em primeiro lugar, que sempre iluminou meu caminho e me fortaleceu nos momentos difíceis.

Ao CNPq (processo 830714/1999-5) e à FAPESP (processo 2019/15191-2) pela bolsa de Mestrado.

À FAPESP pelo auxílio financeiro, por meio dos projetos Temáticos "Epidemiologia, avaliação de danos e controle de doenças da videira" (processo 2013/24003-9), e "Componentes epidemiológicos, caracterização de danos e controle de ferrugens tropicais e temperadas em cenário de mudança climática global" (2019/13191-5), os quais viabilizaram a realização desta pesquisa.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Beatriz Appezzato da Glória. Os seis anos de trabalho juntas me fizeram chegar aonde estou e possibilitaram todas as minhas conquistas. Serei eternamente grata a todos os seus ensinamentos.

À minha querida coorientadora Profa. Dra. Lilian Amorim, por sua paciência e excelente orientação, sempre de maneira leve me indicando o melhor caminho a seguir.

À Marli Kasue Misaki Soares, querida técnica do Laboratório de Anatomia Vegetal, que me ensinou com muita paciência as metodologias que hoje sei e que tornaram meu trabalho possível.

Ao meu amigo Antônio Nogueira Júnior, que com muita paciência me acompanhou nos tantos experimentos e análises de horas, sempre me divertindo com suas histórias.

À Isabela Vescove Primiano e ao Renan Fernandes Alves que me ajudaram desde os meus primeiros trabalhos e sempre estiveram dispostos a me socorrer.

À Equipe do projeto Temático, por sempre me ajudar em meus experimentos, especialmente, à técnica Silvia de Afonseca Lourenço.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, Gabi, Lucas, Gabriel, Márcia, Larissa, Magda e Rodrigo, pelo companheirismo, conselhos e momentos únicos nesses anos de trabalho. Aos meus companheiros da Fitopatologia, Raquel, Manoel e Pamela, pelas reuniões, apoio e risadas.

À Dona Mudesta, minha querida amiga, por todo o amor e carinho.

À equipe do Laboratório de Microscopia Eletrônica Professor Dr. Elliot Watanabe Kitajima da ESALQ/USP, em especial, ao técnico Renato Barbosa Salaroli, pelo auxílio no uso dos equipamentos.

À Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' e todos os seus funcionários, professores, técnicos, equipe da Biblioteca, da limpeza, por terem sempre facilitado minha busca pelo conhecimento.

Aos meus queridos amigos que sempre tornaram minha caminhada mais leve e inesquecível.

Aos meus pais, que sempre incentivaram e apoiaram minhas escolhas profissionais. Dando todo suporte emocional, financeiro e psicológico para enfrentá-las até o fim. Aos meus irmãos de sangue, Gabi e André, e de coração, Bruno, que sempre tornaram minha vida mais divertida. E ao Daniel, meu parceiro de vida, por toda compreensão e amor. Amo todos vocês!

Serei eternamente grata a todos.

"O tempo que dedicaste a tua rosa, fez com que tua rosa fosse importante."

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO	9
ABSTRACT	. 10
1. INTRODUÇÃO	.11
1.1. Viticultura	.11
1.2. Vitis labrusca cv. Niagara Rosada	.12
1.3. Vitis vinifera cv. Cabernet Sauvignon	.13
1.4. Ferrugem da videira	.14
1.5. Efeito da temperatura em videiras	.15
1.6. Efeito da temperatura em ferrugem	.16
1.7. Efeito combinado de estresses em plantas	.17
1.8. Objetivos	.20
Referências	.20
2. EFEITO DA TEMPERATURA NOS COMPONENTES MONOCÍCLICOS I	DA
FERRUGEM DE VIDEIRA EM CV. NIAGARA ROSADA E CV. CABERN	ΕT
SAUVIGNON	.31
Resumo	.31
Abstract	.31
2.1. Introdução	.32
2.2. Material e Métodos	.33
2.2.1. Efeito da temperatura na germinação de urediniósporos de Neophysopella tropicalis	s in
vitro	.33
2.2.2. Efeito da temperatura na germinação de urediniósporos de Neophysopella tropicalis	s in
vivo	.34
2.2.3. Preparo das amostras para a análise ao microscópio eletrônico de varredura	.35
2.2.4. Efeito da temperatura no desenvolvimento de Neophysopella tropicalis em mudas	de
Niagara Rosada e de Cabernet Sauvignon	.35
2.2.5. Análises estatísticas	.36
2.2.6. Preparo das amostras para a análise ao microscópio eletrônico de transmissão	.37
2.2.7. Preparo das amostras para a análise aos microscópios de luz e de epifluorescência .	.37
2.3. Resultados	.38
2.3.1. Efeito da temperatura na germinação de urediniósporos de Neophysopella tropica	alis
	.38

SUMÁRIO

2.3.2. Efeito da temperatura no desenvolvimento de Neophysopella tropical	lis em mudas de
Niagara Rosada e Cabernet Sauvignon	
2.4. Discussão	50
2.5. Conclusões	53
Referências	
3. EFEITO DA FERRUGEM DA VIDEIRA E DA TEMPERATURA DO AR	NAS TROCAS
GASOSAS DE NIAGARA ROSADA E CABERNET SAUVIGNON	59
Resumo	59
Abstract	59
3.1. Introdução	60
3.2. Material e Métodos	
3.2.1. Preparo e condução dos experimentos	
3.2.2. Trocas gasosas de videiras infectadas com Neophysopella tropicalis	e mantidas em
diferentes temperaturas	
3.2.3. Estimativas de lesão virtual (β) usando o modelo de Bastiaans	64
3.2.4. Análise estatística	64
3.3. Resultados	65
3.3.1. Vitis labrusca cv. Niagara Rosada	65
3.3.2. Vitis vinifera cv. Cabernet Sauvignon	
3.4. Discussão	
2.5. Conclusões	
Referências	85
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	

RESUMO

Efeito da temperatura do ar na interação *Neophysopella tropicalis* e videiras cv. Niagara Rosada e cv. Cabernet Sauvignon

O Brasil é o décimo quarto maior produtor de uva do mundo, e produziu aproximadamente 1.5 milhões de toneladas em 2020. O Rio Grande do Sul é o maior produtor do País e tem 20% de sua área plantada de viníferas, com a videira Vitis vinifera cv. Cabernet Sauvignon, e o Estado de São Paulo segue como o terceiro maior produtor, tendo sua área plantada predominada pela videira V. labrusca cv. Niagara Rosada. Um grande obstáculo que os produtores da região enfretam é a ferrugem da videira, causada por Neophysopella tropicalis. As alterações climáticas indicaram o aumento tanto da temperatura global como da concentração de gases do efeito estufa na atmosfera e provocaram um novo alerta na agricultura. Neste contexto, surge a necessidade de se entender as implicações dessas mudanças no patossistema videira-N. tropicalis. Desse modo, os objetivos deste trabalho foram: a) caracterizar a atividade fotossintética de videiras cv. Niagara Rosada e cv. Cabernet Sauvignon sadias não inoculadas e inoculadas com N. tropicalis sob diferentes temperaturas e b) caracterizar o monociclo de N. tropicalis em cv. Niagara Rosada e cv. Cabernet Sauvignon sob diferentes temperaturas. Para tanto, foram realizados experimentos in vitro e in vivo em uma faixa de temperatura de 15 a 35 °C, para análise do processo de pré-penetração do patógeno e, experimentos in vivo a 20, 25 e 30 °C para caracterização do monociclo desta ferrugem e das trocas gasosas e respostas do hospedeiro, com as variações de temperatura. Os experimentos foram realizados em cv. Niagara Rosada e cv. Cabernet Sauvignon. As taxas de germinação de urediniósporos de N. tropicalis in vitro foram muito menores do que as observadas in vivo, independentemente da temperatura e, não houve germinação a 35 °C. As análises epidemiológicas e histopatológicas apontaram que a faixa de temperatura ótima para o desenvolvimento do patógeno é entre 20 e 30 °C, sendo a severidade final a 30 °C tão elevada quanto nas demais temperaturas, mesmo que o hospedeiro apresente mecanismos de defesa contra o patógeno nesta temperatura. A presença do patógeno reduziu a assimilação de CO₂ a 25 e a 30 °C e essa redução seguiu um modelo exponencial negativo em função da severidade da doença. Na temperatura de 30 °C houve queda brusca na eficiência do uso da água, principalmente na cv. Niagara Rosada. Dessa forma, mesmo a temperatura de 30 °C não sendo a ideal para o desenvolvimento do patógeno, a combinação de estresses abiótico e biótico se mostrou tão prejudicial quanto à ocorrência de um estresse isolado.

Palavras-chave: Ferrugem, Estresse, Abiótico, Biótico, Trocas gasosas, Monociclo

ABSTRACT

Effect of air temperature on the interaction of *Neophysopella tropicalis* and cv. Niagara Rosada and cv. Cabernet Sauvignon vines

Brazil is the fourteenth largest grape producer in the world, and produced approximately 1.5 million tons in 2020. Rio Grande do Sul is the largest producer in the country and has 20% of its area planted with vines with Vitis vinifera cv. Cabernet Sauvignon, and the State of São Paulo remains as the third largest producer, with its planted area predominated by the V. labrusca cv. Niagara Rosada. A major obstacle that growers in the region face is the Grapevine rust, caused by Neophysopella tropicalis. Climate change has indicated an increase in both global temperature and the concentration of greenhouse gases in the atmosphere and has triggered a new alert in agriculture. In this context, there is a need to understand the implications of these changes in the *N. tropicalis*-grapevine pathosystem. Thus, the objectives of this work were: a) to characterize the photosynthetic activity of grapevines cv. Niagara Rosada and cv. Cabernet Sauvignon healthy non inoculated and inoculated with N. tropicalis at different temperatures and b) to characterize the monocycle of N. tropicalis in cv. Niagara Rosada and cv. Cabernet Sauvignon under different temperatures. Therefore, in vitro and in vivo experiments were carried out in a temperature range of 15 to 35 ° C, for analysis of the pathogen's pre-penetration process, and in vivo experiments at 20, 25 and 30 ° C to characterize the monocycle of this rust, the gas exchanges and responses of the host, with the variations of temperature. The experiments were carried out in cv. Niagara Rosada and cv. Cabernet Sauvignon. Germination rates of N. tropicalis urediniospores in vitro were much lower than those observed in vivo, regardless of temperature, and there was no germination at 35 ° C. Epidemiological and histopathological analyzes showed that the optimal temperature range for the development of the pathogen is between 20 and 30 °C, with the final severity at 30 °C being as high as at other temperatures, even if the host has defense mechanisms against the pathogen at this temperature. The presence of the pathogen reduced the assimilation of CO₂ at 25 and 30 °C and this reduction followed a negative exponential model due to the severity of the disease. At a temperature of 30 °C there was a sharp drop in the efficiency of water use, especially in cv. Niagara Rosada. Thus, even though the temperature of 30 °C is not ideal for the development of the pathogen, the combination of abiotic and biotic stresses proved to be as harmful as the occurrence of isolated stress.

Keywords: Rust, Stress, Abiotic, Biotic, Gas exchange, Monocycle

1. INTRODUÇÃO

1.1. Viticultura

O surgimento da viticultura no Brasil ocorreu durante o período colonial, quando Martim Afonso de Sousa, por volta do ano de 1531/32, trouxe as primeiras videiras à capitania de São Vicente (Sousa, 1996). Devido às condições edafoclimáticas do local, os primeiros viticultores partiram para o interior da capitania, atual Estado de São Paulo. No entanto, onde, devido à expansão de culturas como cana-de-açúcar, algodão e café, o plantio de videiras perdeu importância entre meados dos séculos XVIII e XIX. Ainda no século XIX, o decaimento da produção de café, associado à vinda de imigrantes italianos e o uso da videira americana (*Vitis labrusca* L.) Isabel levou ao ressurgimento da viticultura no Estado (Sousa 1996). No século XX a produção se estendeu ao Rio Grande do Sul e ao Vale do São Francisco (Bahia e Pernambuco), além de ser marcada pela descoberta da cultivar Niagara Rosada em São Paulo (Silva et al. 2006) fatores responsáveis pela retomada de produção.



Figura 1. Histórico de produção brasileira de uvas (mil toneladas) no período 1961-2018. FONTE: FAOSTAT 2020.

O Brasil se encontra hoje na 14^a posição dentre os maiores produtores de uva do mundo com uma produção de 1.451.348 toneladas (FAOSTAT 2020). A maior produção se encontra na Região Sul, que é responsável por 59%, seguida pela Região Nordeste com 29% e Sudeste com 12%. Em São Paulo destacam-se os municípios de Itapetininga, Campinas e Jales como maiores produtores de uva de mesa rústica, uva fina e para a indústria, respectivamente (IEA 2020). A uva de mesa é predominante em São Paulo, que possui 89% de videiras da cultivar Niagara Rosada, representando 50% da produção (Oliveira et al. 2008).



Figura 2. Produção de uva (toneladas) em 2018 no mundo, estratificada por país. Fonte: FAOSTAT 2020.

Em decorrência das condições edafoclimáticas das áreas produtoras de videira em São Paulo, as doenças são frequentes e o seu controle é uma das maiores preocupações dos produtores do Estado (Sônego; Garrido; Gava 2005). O uso de fungicidas, tanto em uvas finas quanto em uvas rústicas, é excessivo, com médias de 103 e 59 aplicações por safra, respectivamente (Costa et al. 2012). A maior parte das aplicações de fungicidas destina-se ao controle do míldio da videira, provocado por *Plasmopara viticola*.

1.2. Vitis labrusca cv. Niagara Rosada

Niagara Rosada foi detectada em 1933 a partir da mutação somática espontânea da cv. Niagara Branca em Louveira, São Paulo (Sousa 1969). Possui vigor médio e é bastante produtiva, podendo variar de 1,7 a 3,3 kg por planta, dependendo de seu porta-enxerto (Terra et al. 2003). Apresenta cachos médios, cilíndricos e compactos, coloração rosada e polpa mucilaginosa com grande quantidade de pruína. Além disso, a cultivar se destaca ao ser comparada com outras cultivares, pois apresenta um custo de produção relativamente baixo (Detoni 2005), por não exigir tratos culturais muito sofisticados, como o raleio de cachos (Leão 2000).

Os sistemas de condução de videiras utilizam cultivos intensivos e poda severa, objetivando aumentar o rendimento e a qualidade da produção. O que diferencia os sistemas é a orientação do parreiral, sendo principalmente em espaldeira (vertical), latada (horizontal) ou em Y (Costa et al. 2012). O sistema tipo espaldeira com poda curta sempre foi o mais utilizado para uvas de mesa, como Niagara Rosada, devido ao seu baixo custo (Pires & Martins 2003). Entretanto, o sistema em Y ou manjedoura vem ganhando espaço, por apresentar maior produtividade em relação ao espaldeira, obtendo-se valores 75% maiores de produção (Pedro-

Júnior et al. 2011) e frutos com maior quantidade de pigmentos (Sanchez-Rodriguez et al. 2016).

O consumo per capita de uvas de mesa no Brasil passou de 2,77 kg em 2000 a 4,75 kg em 2013 (FAOSTAT 2020). Por sua maior facilidade de produção em comparação com videiras europeias e suas características morfológicas, a cv. Niagara Rosada possui grande aceitação no mercado interno e é a uva de mesa rústica mais produzida no Brasil e no Estado de São Paulo (Cato et al. 2005).

Dentre as doenças fúngicas que geram prejuízos a produção da cv. Niagara Rosada estão o míldio (*Plasmopara vitícola*), antracnose (*Elsinoë ampelina*), podridão da uva madura (*Colletotrichum* spp.) e a ferrugem asiática (*Neophysopella tropicalis*) (Amorim et al. 2016). Quanto a ferrugem asiática, a cv. Niagara Rosada, quando comparada a outras quatorze cultivares apresentou maior valor de frequência de infecção, número de urediniósporos por pústula e diâmetro de pústula, sendo classificada como susceptível (Angelotti et al. 2008).

1.3. Vitis vinifera cv. Cabernet Sauvignon

A cultivar Cabernet Sauvignon é originária de Bordeaux, França; possui importância mundial pela qualidade dos vinhos que origina, estando altamente difundida na maior parte dos países vitivinícolas. Possui alto vigor e produtividade média, apresenta cachos médios, soltos a medianamente compactos, baga preta, pequena e esférica. Diferentemente da Niagara Rosada, sua expansão pelo território brasileiro não foi tão rápida, e apesar de ter sido introduzida em 1921 no País, somente depois de 1980 teve sua produção expandida, se difundindo pela Região Sul (Rizzon & Miele 2002).

Sua produção é realizada tanto em sistema de condução tipo latada (Santos et al. 2007) como espaldeira (Pedro-Júnior et al. 2014). Recentemente, com a introdução do sistema de sustentação em manjedoura ou Y, estudos têm sido feitos para se entender a viabilidade desse sistema e se obter o melhor método de cultivo (Hernandes et al. 2013; Pedro-Júnior et al. 2014). A escolha do tipo de sistema interferiu positivamente na produtividade final e qualidade dos cachos de Cabernet Sauvignon (Pedro-Júnior et al. 2014), em especial, o sistema tipo Y, sendo importante ressaltar o alto custo dessa técnica (Hernandes et al. 2013).

A produção mundial de vinho foi de 270.096 mil hectolitros em 2016 e o consumo per capita no Brasil é de 2 L. Em 2019 o Brasil produziu 1.257 mil hectolitros, exportou 20 mil hectolitros e importou 921 mil hectolitros (OIV 2020). Apesar de não ser a cultivar mais plantada ou produzida no mundo, é a mais presente e marcante em todos os países e vinícolas, sendo reconhecida como "a rainha das uvas".

De maneira semelhante a cv. Niagara Rosada, a cv. Cabernet Sauvignon é considerada susceptível ao míldio (*Plasmopara vitícola*), antracnose (*Elsinoë ampelina*), podridão da uva madura (*Colletotrichum* spp.) e a ferrugem asiática (*Neophysopella tropicalis*) (Amorim et al. 2016). A cv. européia Cabernet Sauvignon foi classificada como altamente susceptível à ferrugem asiática, em uma escala de frequência de infecção (Hennessy et al. 2007).

1.4. Ferrugem da videira

Dentre as doenças que incidem com frequência em videiras na região Sudeste do País está a ferrugem, causada pelo fungo *Neophysopella tropicalis* (syn: *Phakopsora euvitis*; Ono et al. 2020; Santos et al. 2020) endêmica no Estado de São Paulo. Como nos demais agentes causais de ferrugens, *N. tropicalis* é um fungo basidiomiceto e parasita obrigatório, ou seja, organismo que coloniza tecidos vivos do hospedeiro (Tessmann et al. 2003).

A disseminação da doença pode ser realizada pelo vento, por material vegetativo contendo o patógeno e pela translocação de pessoas com esporos no local de cultivo (Sônego; Garrido; Gava 2005), mas o vento é, sem dúvida o mecanismo mais importante para a dispersão dos urediniósporos. A infecção do patógeno é favorecida em climas tropicais e subtropicais com alta umidade. Os sintomas observados em videiras contaminadas são a presença de pústulas amareladas, contendo várias urédias com urediniósporos, na face abaxial das folhas, e lesões de tonalidade marrom e de tamanho e forma variados na face adaxial.

Um estudo recente mostrou que há hipertrofia de células parenquimáticas no tecido foliar adjacente às lesões, com redução do espaço intercelular e, devido a esse comprometimento dos tecidos, há redução na taxa de assimilação de CO₂ em folhas de *Vitis labrusca*, quando infectadas com *N. tropicalis* (Nogueira Júnior et al. 2017). Outro ponto observado no mesmo trabalho foi a redução da disponibilidade de fotoassimilados, devido ao distúrbio no metabolismo foliar, decorrente da degeneração de plastídios próximos ao haustório do fungo. Além disso, a concentração de amido foi menor na região da pústula, enquanto na área adjacente, seu teor foi significativamente maior em relação aos tecidos de folhas sadias, indicando um acúmulo incomum dessa substância. Esse comportamento não é esperado para patógenos biotróficos, o que torna *N. tropicalis* um fungo biotrófico com algumas características que se assemelham às de fungos necrotróficos (Nogueira Júnior et al. 2017). Além disso, a presença do fungo pode levar à desfolha precoce (Rasera et al. 2019), prejudicando o desenvolvimento dos galhos e ramos, o que afeta a produção de substâncias essenciais ao amadurecimento do fruto, diminuindo ainda o acúmulo de reservas pelo mesmo,

causando perdas na produção e comprometendo as próximas safras (Sônego; Garrido; Gava 2005; Angelotti et al. 2008; Nogueira-Júnior et al. 2017).

Elevadas severidades da doença ocorrem, com mais frequência, em folhas maduras (Pearson & Goheen 1988). Como o patógeno sobrevive apenas em tecidos vivos do hospedeiro, a realização de mais de uma safra por ano contribui para a persistência da doença nas plantações, pois garante ao fungo tecido suscetível durante todo o ano (Sônego; Garrido; Gava 2005).

Em condições favoráveis, o fungo penetra a folha via abertura estomática ou pelas junções das células epidérmicas, coloniza o espaço intercelular do mesofilo e a hifa de infecção, em algum ponto, forma a célula-mãe haustorial, a qual entra em contato com a célula hospedeira e origina o haustório (Rasera et al. 2019), responsável pela absorção de nutrientes, como aminoácidos e carboidratos (Mendgen et al. 2000; Mendgen e Hahn 2002; Voegele et al. 2001) que permitirão a continuidade do processo de colonização, com a formação de novas estruturas e assim o surgimento de novos ciclos.

1.5. Efeito da temperatura em videiras

A videira tem seu desenvolvimento ótimo a 25 °C, resposta típica de planta C3 (Atwell; Kriedemann; Turnbull 1999; Greer & Weedon 2012). O aumento da temperatura em parreirais eleva os processos de trocas gasosas nas plantas, como fotossíntese e transpiração, mas reduz o peso dos frutos (Martínez-Lüscher et al. 2015). Se a elevação de temperatura for ainda maior há redução da fotossíntese (Luo et al. 2011; Greer & Weedon 2012; 2013) e acúmulo de açúcares solúveis (Greer & Weedon 2013). Isso ocorre porque o aumento nas trocas gasosas possui um custo: a redução na eficiência do uso da água (EUA) (Soar 2009).

A eficiência do uso da água, relação entre a taxa de assimilação de CO_2 e taxa de transpiração, geralmente é maior em condições de déficit hídrico, sendo estratégia de defesa da planta, que reduz sua transpiração em resposta à falta de água (Du et al. 2008). A elevação da temperatura provoca aumento na transpiração (Greer & Weedon 2012) e assim, há grande redução na EUA.

Além de alterações no metabolismo das videiras, Ben Salem-Fnayou e colaboradores (2011) verificaram em folhas de *Vitis vinifera* cv. Razegui e cv. Itália Muscat, após três meses em condições de estresse a 36 °C, que houve aumento na espessura da lâmina foliar, redução na espessura da cutícula, alteração na sinuosidade das paredes das células epidérmicas e nos cloroplastos. Os autores observaram que a presença de plastoglóbulos indicou o processo de degradação dos cloroplastos e início da senescência foliar, como também já foi relatado em

Vitis labrusca cv. Niagara Rosada em condição de estresse biótico (Rasera et al. 2019) e em plantas de *V. vinifera* cv. Jingxiu após 10 horas de estresse térmico (Zhang et al. 2005).

A elevação da temperatura provoca o fechamento estomático, mecanismo que a planta desenvolve para evitar a intensa transpiração e, por consequência, reduz a concentração de CO_2 em seus tecidos (Dabrowska et al. 2007). A diminuição na fixação de CO_2 no ciclo de Calvin em plantas nessas condições reduz a oxidação do NADPH, e o elétron da ferredoxina reduzida que seria transferido para o NADP vai para o O_2 , formando espécies reativas de oxigênio (EROs) (Ahmad et al. 2008), que além de funcionarem como moléculas sinalizadoras de estresse, em excesso, reagem com moléculas das plantas e podem causar morte celular (Barbosa et al. 2014).

As EROs funcionam como uma mensagem de alerta, indicando a presença de estresse na planta, a qual protege oss cloroplastos, organelas responsáveis por seu metabolismo vital, a fotossíntese. Assim, existe uma sequência de mecanismos que a planta utiliza para evitar os danos das EROs, para remover essas moléculas, ou ainda, para remediar os danos por elas causados, resultado de um sistema de tolerância a estresse abiótico (AST). Uma tentativa da planta em evitar a formação de EROs consiste no processo de *quenching* não-fotoquímico (NPQ) que converte o excesso de elétrons em calor, sendo rapidamente induzido e reversível, podendo dissipar está metade da luz interceptada em forma de calor (Endo et al. 2014). Quando esse processo não é o suficiente e há a formação de EROs, existem mecanismos de limpeza, como a oxidação do ácido ascórbico (vitamina C), que atua como forte antioxidante não enzimático, ou seja, forte redutor, através do ascorbato com propriedade doadora de elétrons reduz as espécies reativas em água, ou ainda, o processo de catalase no lúmen não dependente de luz, que por meio de enzimas antioxidantes reduz as espécies reativas de oxigênio em água e oxigênio (Asada 2006).

Entretanto, quando o estresse oxidativo não é evitado ou eliminado, ele pode gerar danos aos fotossistemas I e II e por consequência ao cloroplasto. Assim, existem mecanismos de reversão de danos, como a reparação domínio D1, subunidade do fotossistema II que acumula "estresse oxidativo" (Theis & Schroda 2016), ou a degradação do cloroplasto afetado por peroxidação lipídica (Foyer et al. 1997), e por fim, caso não se obtenha sucesso com nenhum desses mecanismos, há a morte celular programada da célula (Dogra et al. 2017).

1.6. Efeito da temperatura em ferrugem

Como para todos os seres vivos a relação entre agentes causais de ferrugens e temperatura segue uma função quadrática, com temperaturas mínimas abaixo das quais não há

desenvolvimento do patógeno, temperaturas ótimas, nas quais o desenvolvimento é máximo e temperaturas máximas, acima das quais também não há desenvolvimento da doença. Hemileia vastatrix, agente causal da ferrugem do cafeeiro, apresenta bom desenvolvimento entre as temperaturas de 15 a 30 °C e valores que não se encaixam nessa faixa afetam negativamente a germinação e infecção do patógeno (Nutman & Roberts 1963). Devido a essa característica, o desenvolvimento de epidemias de ferrugem do cafeeiro ocorre no primeiro semestre de cada ano com pico de severidade entre os meses de maio a julho, em Papua Nova Guiné (Brown et al. 1995). No caso de Puccinia graminis f. sp. tritici, causador da ferrugem amarela do trigo, que até recentemente só ocorria em regiões mais frias, observou-se o surgimento de raças mais agressivas que possuem boa adaptação a temperaturas mais elevadas (Milus et al. 2008), o que indica que novas raças de patógenos causadores de ferrugem podem se adaptar a temperaturas mais altas e causar doenças ainda mais graves. Na interação ferrugem alaranjada (Puccinia *kuehnii*) e cana-de-açúcar, a temperatura de 25 °C, quando comparada a 18 °C é mais favorável ao desenvolvimento do patógeno, enquanto a resistência da planta à infecção pareceu ser favorecida a 18 °C (Goméz 2013). Para Phakopsora pachyrhizi, agente causal da ferrugem da soja, temperaturas acima de 28,5 °C reduzem a germinação de seus esporos mesmo que as demais condições requeridas (umidade e luminosidade) sejam ótimas (Kochman 1979; Yang et al. 1990) e, ainda, elevação da temperatura diurna para 37 °C pelo período de 1 hora, pode atrasar ou até impedir totalmente seu desenvolvimento na cultura (Bonde et al. 2012). Para Neophysopella tropicalis o intervalo de temperaturas de 20 a 25 °C foi considerado ideal para sua germinação, sendo a mesma reduzida com o distanciamento dessa faixa de temperatura (Naruzawa 2006; Alves 2015). Apesar da baixa proporção de urediniósporos germinados a 30 °C, Alves (2015) observou um menor período de latência e alta severidade de ferrugem em mudas de cv. Niagara Rosada.

1.7. Efeito combinado de estresses em plantas

Até recentemente, os estudos sobre estresses abióticos e bióticos em plantas sempre tiveram como foco o efeito individual desses fatores a nível molecular, bioquímico e fisiológico (Wang et al. 2003; Ferreira et al. 2007; Rodrigo et al. 2011; Fürstenberg-Häagg et al. 2013; Shanker et al. 2014), o que impede uma previsão do que efetivamente ocorrerá no campo, já que em cenários reais há sempre uma combinação de fatores de estresse (Zhang & Sonnewald 2017) e as interações planta-patógeno envolvem dois organismos com comportamentos e respostas diferentes. A exposição das plantas a estresses abióticos pode alterar a sua resistência às doenças, por sua vez, as infecções por patógenos podem reduzir ou intensificar as respostas das plantas a estresses abióticos (Atkinson & Urwin 2012).

Em um estudo sobre a ferrugem da soja, causada por *Phakopsora pachyrhizi*, e a aplicação de fungicidas em diferentes condições de disponibilidade hídrica e regime de pluviosidade, foi possível observar menor severidade e maior período de incubação em condições de déficit hídrico, independentemente do regime de pluviosidade (Stefanello et al. 2016). Durante a safra de 2001/02 no Paraguai, a seca severa que acometeu as lavouras de soja, juntamente com o uso de fungicidas, reduziu as perdas causadas pela ferrugem (Yorinori et al. 2005).

A partir do momento em que um microrganismo entra em contato com uma planta, sendo sua hospedeira ou não, peptídeos microbianos atuam como PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) ou MAMPS (microbe-associated molecular patterns) e peptídeos do hospedeiro atuam como DAMPs (damage-associated molecular patterns) (Choi & Klessig 2016) que são reconhecidos pelos receptores de padrões da membrana plasmática (PRRs) e são traduzidos em íons de cálcio e EROs (Wu et al. 2014; Göhre et al. 2012). Esses sinais recebidos e traduzidos pela planta dão início às respostas básicas de defesa, PTI (PAMP-triggered immunity), que em casos de relação patógeno e não-hospedeiro impede o ingresso da maioria dos microrganismos na planta e encerra a interação (Gill; Lee; Mysore 2015). O PTI inclui o fechamento estomático (Melotto; Underwood; He 2008), a deposição de calose em forma de papilas reforçando a parede celular (Voigt 2014; Marques et al. 2016) e a alcalinização extracelular (Wu et al. 2014).

O mecanismo evolutivo das interações patógeno-hospedeiro em uma relação compatível segue um modelo zig-zag (Jones & Dangl 2006). De acordo com esse modelo, o patógeno, em resposta a PTI, libera efetores que desencadeiam a suscetibilidade da planta (ETS), pois driblam defesa do hospedeiro. A planta evolui e os indivíduos que possuem genes de reconhecimento (R) reconhecem os efetores do patógeno e restauram seu mecanismo de resistência ETI (Imunidade desencadeada por efetores). Em termos evolutivos, há uma batalha gene-a-gene na qual suscetibilidade e a resistência se alternam (Jones & Dangl 2006).



Figura 3. Um modelo em zigue-zague ilustra a produção quantitativa do sistema imunológico da planta. Nesse esquema, existem quatro fases. Na fase 1, as plantas detectam MAMPs e PAMPs e respondem com PTI. Na fase 2, os patógenos produzem efetores que interferem no PTI, ou permitem sua nutrição e dispersão, resultando em suscetibilidade desencadeada por efetor (ETS). Na fase 3, um efetor é reconhecido ativando a imunidade desencadeada por efetor (ETI). Na fase 4, são selecionados isolados de patógenos que podem ajudar a suprimir a ETI, e assim a batalha segue até que um organismo sai vencedor. FONTE: Camargo 2016 modificado de Jones & Dangl 2006.

Existe um antagonismo natural entre PTI e AST. O primeiro funciona sendo estimulado por EROs, enquanto o segundo funciona com o objetivo de evitar e eliminar EROs (Sowden et al. 2017). Assim, a desativação das estratégias de gerenciamento de EROs vinculadas ao AST promove a resistência a doenças por meio da geração de EROs.

Hormônios vegetais ativam expressões gênicas que atuam em processos de desenvolvimento de plantas, tolerância a estresses abióticos e doenças. Geralmente, o ácido salicílico (SA) atua contra patógenos biotróficos, o ácido jasmônico (JA) contra necrotróficos (Bari & Jones 2009) e o ácido abscísico (ABA) contra estresses abióticos (Lievens et al. 2017). O patógeno também atua nas vias de síntese desses fito-hormônios, com o objetivo de enganar o sistema de defesa da planta e ser bem-sucedido em seu desenvolvimento. Patógenos biotróficos estimulam a produção de JA e necrotróficos estimulam SA (El Rahman et al. 2012), que por possuírem vias de síntese antagônicas permitem que o microrganismo avance. Além disso, os patógenos, independentemente de suas relações tróficas com o hospedeiro podem liberar efetores que induzem a codificação de enzimas que promovem a via de síntese de ABA, que atua estimulando o AST em detrimento de PTI, resultando em susceptibilidade da planta (Zabala et al. 2015).

Um exemplo bastante estudado é o caso do fungo *Botrytis cinerea* causador do mofo cinzento, doença que ataca mais de 200 espécies de plantas (Mbengue et al. 2016). *B. cinerea* foi o segundo fungo encontrado que produz ABA como metabólito secundário, em um processo

dependente de luz (Marumo et al. 1982). Em tomates mutantes (*Solanum lycopersicum*) que possuem níveis reduzidos de ABA, há uma rápida resposta hipersensível da epiderme quando em contato com o fungo necrotrófico *B. cinerea*, consistindo em um rápido acúmulo de EROs em células epidérmicas, seguido de fortalecimento da parede da célula, além do aumento na permeabilidade da cutícula (Curvers et al. 2010). Simultaneamente a esse processo, há uma fase de 'manutenção' do metabolismo básico nas células do mesofilo ao redor do local da infecção, controlando a extensão da resposta de hipersensibilidade epidérmica de defesa e diminuindo a senescência induzida pela infecção, características que resultam em maior resistência quando em comparação a plantas selvagens de tomate (Seifi et al. 2013).

A produção de EROs, íons de cálcio e fito-hormônios, descritos como fundamentais nas interações planta-estresse, é feita em grande parte pelo cloroplasto, que então se tornam os maiores alvos dos patógenos em busca por sobrevivência. Esses microrganismos podem alterar todo o funcionamento do cloroplasto e sua homeostase, por meio de alteração na expressão gênica, por efetores e alteração na localização de proteínas, podendo ainda causar seu acúmulo nestes plastídeos (Sowden et al. 2017).

1.8. Objetivos

Verificar a interação entre os estresses abiótico (temperatura elevada) e biótico (ferrugem da videira) na severidade final de folhas maduras de *Vitis labrusca* L. cv. Niagara Rosada e *V. vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon.

Objetivos específicos

- Caracterizar o monociclo de *Neophysopella tropicalis* e atividade fotossintética de *Vitis labrusca* cv. Niagara Rosada e de *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon em diferentes temperaturas, visando entender o comportamento deste patógeno policíclico bem como a fisiologia da planta;

Analisar a estrutura e ultraestrutura das lâminas foliares de *Vitis labrusca* cv. Niagara Rosada
e *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon sob estresse conjunto ou isolado.

Referências

Ahmad, P.; Sarwat, M. & Sharma, S. 2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling

in plants. Journal of Plant Biology, 51(3), 167-173.

- Alves, R. F. 2015. Ferrugem da videira: Preservação de urediniósporos de *Phakopsora euvitis* e fatores relacionados à infecção do hospedeiro. Piracicaba, Universidade de São Paulo (dissertação de mestrado).
- 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
 d eplantas cultivadas. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 745-58.
- Angelotti, F.; Santos, J.; Fatinansi, J. C.; Lima, M. F.; Carvalho T. 2008. Avaliação da ferrugem da videira em variedades uvas de vinho. XX Congresso Brasileiro de Fruticultura, Vitória, p. 14.
- Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiology. 141, 391–396
- Atkinson, N. J. & Urwin, P. E. 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. Journal of experimental botany, 63(10), 3523-3543.
- Atwell, B. J.; Kriedemann, P. E. & Turnbull, C. G. N. 1999. Plants in Action: Adaptation in Nature Performance in Cultivation. MacMillan Publishers, South Yarra, Australia.
- Barbosa, M. R.; Silva, M. M. D. A.; Willadino, L.; Ulisses, C. & Camara, T. R. 2014. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. Ciência Rural, 44(3), 453-460.
- Bari, R. & Jones, J. D. G. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. Plant Molecular Biology. 69: 473–488
- Ben Salem-Fnayou, A. B.; Bouamama, B.; Ghorbel, A. & Mliki, A. 2011. Investigations on the leaf anatomy and ultrastructure of grapevine (*Vitis vinifera*) under heat stress. Microscopy research and technique, 74(8), 756-762.
- Bonde, M. R.; Nester, S. E. & Berner, D. K. 2012. Effects of daily temperature highs on development of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean. Phytopathology, 102(8), 761-768.

- Brown, J. S.; Kenny, M. K.; Whan, J. H. & Merriman, P. R. 1995. The effect of temperature on the development of epidemics of coffee leaf rust in Papua New Guinea. Crop Protection, 14(8), 671-676.
- Camargo, L. E. A. 2016. Genética da interação Patógeno-Hospedeiro. In. L. Amorim; J. A. M.
 Rezende; A. Bergamin Filho & L. E. A. Camargo (Eds.), Manual de Fitopatologia: doenças d eplantas cultivadas. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p.88.
- Cato, S. C.; Terra, M. M.; Botelho, R. V.; Tecchio, M. A.; Paioli-Pires, E. J.; Carvalho, C. R.
 L.; Piedade, S. M. S. 2005. Características morfológicas dos cachos e bagas de uva cv.
 Niagara Rosada (*Vitis labrusca* L.) tratadas com o ácido giberélico e anelamento. Acta Scientiarum 27: 177-181.
- Choi, H. W. & Klessig, D. F. 2016. DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. BMC Plant Biol. 16, 232
- Costa, T. V.; Tarsitano, M. A. A.; Conceição, M. A. F. 2012. Caracterização social e tecnológica da produção de uvas para mesa em pequenas propriedades rurais da região de Jales. Revista Brasileira de Fruticultura, 34: 766-773.
- Curvers, K.; Seifi, H.; Mouille, G.; de Rycke, R.; Asselbergh, B.; Van Hecke, A.; et al. 2010.
 Abscisic acid deficiency causes changes in cuticle permeability and pectin composition that influence tomato resistance to *Botrytis cinerea*. Plant Physiol.154,847–860.doi:10.1104/pp.110.158972
- Dabrowska, G.; Kata, A.; Goc, A.; Szechyńska-Hebda, M. & Skrzypek, E. 2007. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 49(1), 7-17.
- Detoni, A. M.; Clemente, E.; Braga, G. C.; Herzog, N. F. M. 2005. Uva 'Niágara Rosada' cultivada no sistema orgânico e armazenada em diferentes temperaturas. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.25, n.3, p.546-552.

- Dogra, V.; Duan, J.; Lee, K. P.; Lv, S.; Liu, R. & Kim, C. 2017. FtsH2-dependent proteolysis of EXECUTER1 is essential in mediating singlet oxygen-triggered retrograde signaling in *Arabidopsis thaliana*. Frontiers in Plant Science. 8, 1145.
- Du, T.; Kang, S.; Zhang, J.; Li, F. & Yan, B. 2008. Water use efficiency and fruit quality of table grape under alternate partial root-zone drip irrigation. Agricultural water management, 95(6), 659-668.
- El Rahman, T. A.; El Oirdi, M.; Gonzalez-Lamothe, R. & Bouarab, K. 2012. Necrotrophic pathogens use the salicylic acid signaling pathway to promote disease development in tomato. Molecular Plant Microbe Interaction. 25, 1584–1593
- Endo, T.; Uebayashi, N.; Ishida, S.; Ikeuchi, M. & Sato, F. 2014. Light energy allocation at PSII under field light conditions: How much energy is lost in NPQ-associated dissipation? Plant physiology and biochemistry, 81, 115-120.
- FAOSTAT Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 22. mai. 2020.
- Ferreira, R.B.; Monteiro, S.; Freitas, R.; Santos, C.N.; Chen, Z.; Batista, L.M.; Duarte, J.;Borges, A. & Teixeira, A.R. 2007. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis.Mol. Plant Pathol. 8, 677–700.
- Foyer, C. H.; Lopez Delgado, H.; Dat, J. F. & Scott, I. M. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. Physiol. Plant. 100, 241–254
- Fürstenberg-Hägg, J.; Zagrobelny, M. & Bak, S. 2013. Plant defense against insect herbivores. International Journal of Molecular Sciences. 14, 10242–10297.
- Gill, U. S.; Lee, S. & Mysore, K. S. 2015. Host versus nonhost resistance: distinct wars with similar arsenals. Phytopathology 105, 580–587

- Göhre, V.; Jones, A. M. E.; Sklenar, J.; Robatzek, S. & Weber, A. P. M. 2012. Molecular crosstalk between PAMP-triggered immunity and photosynthesis. Mol. Plant Microbe Interact. 25, 1083–1092
- Gomez, S. G. P. 2013. Quantificação de parâmetros monocíclicos da ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehnii*) em cana-de-açúcar (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Greer, D. H. & Weedon, M. M. 2012. Modelling photosynthetic responses to temperature of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Semillon) leaves on vines grown in a hot climate. Plant, Cell & Environment, 35(6), 1050-1064.
- Greer, D. H. 2013. The impact of high temperatures on *Vitis vinifera* cv. Semillon grapevine performance and berry ripening. Frontiers in plant science, 4, 491.
- Hennessy, C. R.; Daly, A. M. & Hearnden, M. N. 2007. Assessment of grapevine 214 cultivars for resistance to *Phakopsora euvitis*. Australasian Plant Pathology, 36(4), 313–317.
- Hernandes, J. L.; Pedro Júnior, M. J.; Blain, G. C. & Rolim, G. D. S. 2013. Comportamento produtivo da videira cv. Niagara Rosada em diferentes sistemas de condução, com e sem cobertura plástica, durante as safras de inverno e de verão. Revista Brasileira de Fruticultura, 35(1), 123-130.
- IEA Instituto de Economia Agrícola. Disponível em: http://www.iea.agricultura.sp.gov.br/. Acesso em: 22. mai. 2020.
- Jones, J. D. & Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. nature, 444(7117), 323-329.
- Kochman, J. K. 1979. The effect of temperature on development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). Australian Journal of Agricultural Research, Victoria, v.30, p.273-277.
- Leão, P. C. de S. 2000. Principais variedades. In: Leão, P. C. de S.; Soares, J. M. (Coords.). Petrolina: Embrapa Semi-Árido. Cap. 4, p. 45-64.
- Lievens, L.; Pollier, J.; Goossens, A.; Beyaert, R. & Staal, J. 2017. Abscisic acid as pathogen effector and immune regulator. Frontiers in Plant Science. 8, 587

- Luo, H. B.; Ma, L.; Xi, H. F.; Duan, W.; Li, S. H.; Loescher, W.; et al. 2011. Photosynthetic responses to heat treatments at different temperatures and following recovery in grapevine (*Vitis amurensis* L.) leaves. PLoS one, 6(8).
- Marques, J. P. R.; Amorim, L.; Spósito, M. B. & Appezzato-da-Glória, B. 2016. Ultrastructural changes in the epidermis of petals of the sweet orange infected by Colletotrichum acutatum. Protoplasma, 253(5), 1233-1242.
- Martínez-Lüscher, J.; Morales, F., Sánchez-Díaz, M.; Delrot, S.; Aguirreolea, J.; Gomès, E. & Pascual, I. 2015. Climate change conditions (elevated CO₂ and temperature) and UV-B radiation affect grapevine (*Vitis vinifera* cv. Tempranillo) leaf carbon assimilation, altering fruit ripening rates. Plant Science, 236, 168-176.
- Marumo, S.; Katayama, M.; Komori, E.; Ozaki, Y.; Natsume, M. & Kondo, S. 1982. Microbial production of abscisic acid by *Botrytis cinerea*. Agricultural and Biological Chemistry, 46(7), 1967-1968.
- Mbengue, M.; Navaud, O.; Peyraud, R.; Barascud, M.; Badet, T.; Vincent, R.; ... & Raffaele,
 S. 2016. Emerging trends in molecular interactions between plants and the broad host range fungal pathogens *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Frontiers in plant science, 7, 422.
- Melotto, M.; Underwood, W. & He, S. Y. 2008. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 46, 101–122
- Mendgen, K.; Struck, C.; Voegele, R. T. & Hahn, M. 2000. Biotrophy and rust haustoria. Physiological and Molecular Plant Pathology, 56(4), 141-145.
- Mendgen, K. & Hahn, M. 2002. Plant infection and the stablishment of fungal biotrophy. Trends in Plant Science, 7, 352–356. doi: 10.1016/S13601385(02)02297-5

- Milus, E. A.; Kristensen, K. & Hovmøller, M. S. 2008. Evidence for increased aggressiveness in a recent widespread strain of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* causing stripe rust of wheat. Phytopathology, 99(1), 89-94.
- Naruzawa, E. S.; Celoto, M. I.; Papa, M. F.; Tomquelski, G. V. & Boliani, A. C. 2006. Estudos epidemiológicos e controle químico de *Phakopsora euvitis*. Fitopatologia Brasileira, 31(1), 41-45.
- Nogueira Júnior, A. F.; Ribeiro, R. V.; Appezzato-da-Glória, B.; Soares, M. K. M.; Rasera, J.
 B.; Amorim, L. 2017. *Phakopsora euvitis* causes unusual damage to leaves and modifies carbohydrate metabolism in grapevine. Frontiers in plant science, 8, 1675.
- Nutman, F. J.; Roberts, F. M. & Clarke, R. T. 1963. Studies on the biology of *Hemileia vastatrix*Berk. & Br. Transactions of the British Mycological Society, 46(1), 27-44.
- OIV Organização Internacional da Vinha e do Vinho. Disponível em: http://www.oiv.int/. Acesso em: 22 mai 2020.
- Oliveira, M. D. M.; Silva, P. R.; Amaro, A. A.; Tecchio, M. A. 2008. Viabilidade econômica em tratamento antidegrana em uva "Niagara Rosada" no Estado de São Paulo. Informações Econômicas 38: 59-67.
- Ono, Y.; Okane, I.; Chatasiri, S.; Pota, S.; Unartngam, J.; Ayawong, C.; Nguyen, H. D.; Le, C. T. M. 2020. Taxonomy of Southeast Asian-Australasian grapevine leaf rust fungus and its close relatives. Mycological Progress, in press.
- Pearson, R. G.; Goheen, A. C. 1988. Compendium of grape diseases. Minnesota: APS, 93 p.
- Pedro-Júnior, M. J.; Hernandes, J. L.; Rolim, G. de S. 2011. Sistema de condução em Y com e sem cobertura plástica: microclima, produção, qualidade do cacho e ocorrência de doenças fúngicas na videira cv. Niagara Rosada. Bragantia 70: 228-233.

- Pedro-Júnior, M. J.; Hernandes, J. L.; Blain, G. C.; & Bardin-Camrarotto, L. 2014. Produtividade e qualidade da cv. Cabernet Sauvignon sustentada em espaldeira e manjedoura na forma de Y. Revista Brasileira de Fruticultura, 37(3), 806-810.
- Pires, E. J. P. & Martins, F. P. 2003. Técnicas de cultivo. In: Pommer, C. V. (Ed.). Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Porto Alegre: Cinco continentes. p.351-388.
- Rasera, J. B.; Amorim, L.; Marques, J. P. R.; Soares, M. K. M. & Appezzato-da-Glória, B.
 2019. Histopathological evidences of early grapevine leaf senescence caused by *Phakopsora euvitis* colonisation. Physiological and Molecular Plant Pathology, 108, 101434.
- Rizzon, L. A. & Miele, A. 2002. Avaliação da cv. Cabernet Sauvignon para elaboração de vinho tinto. Ciência e Tecnologia de Alimentos, campinas, v. 22, n.2, p.192-198.
- Rodrigo, G.; Carrera, J.; Ruiz-Ferrer, V.; Del Toro, F. J.; Llave, C.; Voinnet, O. & Elena, S. F.
 2011. Characterization of the Arabidopsis thaliana interactome targeted by viruses (pp. 11-10). Santa Fe Institute Working Paper.
- Sanchez-Rodriguez, L. A.; Dias, C. T. D. S. & Spósito, M. B. 2016. Fisiologia e produção da videira'Niágara Rosada'nos sistemas de condução em espaldeira e em Y. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 51(12), 1948-1956.
- Santos, C. E. D. 2007. Características físicas, químicas e produtivas das videiras cv. Cabernet Sauvignon e 'Tannat' na região norte do Paraná. Acta Sci., Agron, 623-629.
- Santos, R. F.; Primiano, I. V. & Amorim, L. 2020. Identification and pathogenicity of *Neophysopella* species associated with Asian grapevine leaf rust in Brazil. Plant Pathology.
- Seifi, H. S.; Curvers, K.; De Vleesschauwer, D.; Delaere, I.; Aziz, A. & Höfte, M. 2013. Concurrent overactivation of the cytosolic glutamine synthetase and the GABA shunt in the ABA-deficient sitiens mutant of tomato leads to resistance against *Botrytis cinerea*. New Phytologist, 199(2), 490-504.

- Shanker, A. K.; Maheswari, M.; Yadav, S. K.; Desai, S.; Bhanu, D.; Attal, N. B. & Venkateswarlu, B. 2014. Drought stress responses in crops. Functional and Integrative Genomics, 14, 11-22.
- Silva, P. R.; Verdi, A. R.; Santos, V. L. F.; Baptistella, C. D. S. L. 2006. Tradição do cultivo da uva Niágara no estado de São Paulo. Informações econômicas. 36: 33-42.
- Soar, C. J.; Collins, M. J. & Sadras, V. O. 2009. Irrigated Shiraz vines (*Vitis vinifera*) upregulate gas exchange and maintain berry growth in response to short spells of high maximum temperature in the field. Functional Plant Biology, 36: 801–814.
- Sônego, O. R.; Garrido, L. R. & Gava, R. 2005. Ferrugem da videira. Comunicado técnico Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, n. 62, p. 1-3.
- Sousa, J. R. I. 1969. Uvas para o Brasil. São Paulo: Melhoramentos.
- Sousa, J. S. I. 1996. Uvas do Brasil. Piracicaba, FEALQ 791p.
- Sowden, R. G.; Watson, S. J. & Jarvis, P. 2017. The role of chloroplasts in plant pathology. Essays in biochemistry, 62(1), 21-39.
- Stefanello, M. T.; Marques, L. N.; Pinto, F. F.; Ramos, J. P. D.; Cadore, P. C. & Balardin, R.
 S. 2016. Dinâmica do controle químico de *Phakopsora pachyrhizi* em plantas de soja submetidas a diferentes regimes hídricos. Arquivos do Instituto Biológico, 83.
- Terra, M. M.; Pires, E. J. P.; Pommer, C. V. & Botelho, R. V. 2003. Produtividade da cultivar de uva de mesa Niágara Rosada sobre diferentes porta-enxertos, em Monte Alegre do Sul-SP. Revista Brasileira de Fruticultura, 25(3), 549-551.
- Tessmann, D. J.; Dianese, J. C.; Genta, W.; Vida, J. B.; Mio, L. L. 2003. Grape rust (*Phakopsora euvitis*): First record for Brazil. Fitopatologia Brasileira 28:S232.
- Theis, J. & Schroda, M. 2016. Revisiting the photosystem II repair cycle. Plant Signalling Behavior. 11, e1218587

- Voegele, R. T.; Struck, C.; Hahn, M.; Mendgen, K. 2001. The hole of haustoria in sugar suply during infeccion of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. Proceedings of National Academy of Science of United States of America, Washington D. C., v. 98, p. 8133-8138.
- Voigt, C. A. 2014. Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. Frontiers in Plant Science. 5, 168
- Wang, W.; Vinocur, B. & Altman, A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta, 218(1), 1-14.
- Wu, S.; Shan, L. & He, P. 2014. Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. Plant Sci. 228, 118–126 20
- Yang, X. B.; Royer, M. H.; Tschanz, A. T.; Tsai, B. Y. 1990. Analysis and quantification of soybean rust epidemics from seventy-three sequential planting experiments. Phytopathology, Saint Paul, v.80, p.1421-1427.
- Yorinori, J. T.; Paiva, W. M.; Frederick, R. D.; Costamilan, L. M.; Bertagnolli, P. F.; Hartman, G. E.; ... & Nunes Jr, J. 2005. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. Plant Disease, 89(6), 675-677.
- Zabala, M. de T.; Littlejohn, G.; Jayaraman, S.; Studholme, D.; Bailey, T.; Lawson, T. et al.2015. Chloroplasts play a central role in plant defence and are targeted by pathogen effectors.Nat. Plants 1, 15074
- Zhang, J. H.; Huang, W. D.; Liu, Y. P. & Pan, Q. H. 2005. Effects of temperature acclimation pretreatment on the ultrastructure of mesophyll cells in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Jingxiu) under cross-temperature stresses. Journal of Integrative Plant Biology, 47(8), 959-970.
- Zhang, H. & Sonnewald, U. 2017. Differences and commonalities of plant responses to single and combined stresses. The Plant Journal, 90(5), 839-855.

2. EFEITO DA TEMPERATURA NOS COMPONENTES MONOCÍCLICOS DA FERRUGEM DE VIDEIRA EM CV. NIAGARA ROSADA E CV. CABERNET SAUVIGNON

Resumo

A temperatura do ar é um dos fatores ambientais que possui grande impacto na relação patógeno-hospedeiro, sendo quase todas as fases dos ciclos de doenças dependentes desse fator, que pode tanto favorecer como desfavorecer a ocorrência da doença. A ferrugem da videira, causada por Neophysopella tropicalis, é atualmente endêmica no Brasil, no sentido de que está distribuída em todas as áreas de produção de uvas, e com grande importância no Estado de São Paulo. A determinação de componentes monocíclicos auxilia no entendimento do comportamento de patógenos policíclicos em diferentes situações e cenários. Estudo recente que avaliou alguns dos componentes monocíclicos da ferrugem da videira apontou que a germinação in vitro dos urediniósporos de N. tropicalis é baixa (20%) e a severidade da ferrugem é muito elevada em videiras submetidas a 30 °C. A hipótese deste trabalho foi de que a elevação da temperatura do ar, atuando como estresse térmico, afeta a interação videira-N. tropicalis de tal maneira que a severidade final nas folhas seja máxima, mesmo que o ambiente não seja o ideal para o desenvolvimento do patógeno. O objetivo do estudo foi caracterizar o monociclo de N. tropicalis nas videiras cv. Niagara Rosada e cv. Cabernet Sauvignon sob diferentes temperaturas para entender o comportamento deste patógeno policíclico. As taxas de germinação de urediniósporos de N. tropicalis in vitro foram muito menores do que as observadas in vivo, independentemente da temperatura. Não houve germinação a 35 °C. As análises epidemiológicas e histopatológicas apontaram que a faixa de temperatura ótima para o desenvolvimento do patógeno está entre 20 e 30 °C, sendo a severidade final a 30 °C tão ou mais elevada que nas demais temperaturas, confirmando a hipótese inicial.

Palavras-chave: germinação, latência, incubação, severidade, necrose, microscopia.

Abstract

The air temperature is one of the environmental factors that has a major impact on the hostpathogen relationship, with almost all phases of disease cycles dependent on this factor, which can both favor or disfavor the occurrence of the disease. Grapevine rust, caused by Neophysopella tropicalis, is currently endemic in Brazil, in the sense that it is distributed in all areas of grape production, and with great importance in the State of São Paulo. Monocyclic processes are usually investigated to better understand the behavior of polycyclic pathogens in different situations and scenarios. A recent study that evaluated some of the monocyclic components of grapevine rust indicated that the in vitro germination rate of N. tropicalis urediniospores is low (20%) and the severity of rust is remarkably high in vines subjected to 30 ° C. The hypothesis of this work was that the increase in air temperature, acting as thermal stress, affects the interaction grapevine-N. tropicalis in such a way that the final disease severity on the leaves is maximum, even if the environment is not ideal for the development of the pathogen. The objective of the study was to characterize the monocycle of N. tropicalis in cv. Niagara Rosada and cv. Cabernet Sauvignon under different temperatures to understand the behavior of this polycyclic pathogen. The germination rates of N. tropicalis urediniospores in vitro were much lower than those observed in vivo, regardless of temperature. There was no germination at 35 °C. Epidemiological and histopathological analyzes showed that the optimal temperature range for the development of the pathogen is between 20 and 30 $^{\circ}$ C, with the final severity at 30 $^{\circ}$ C being as much or higher than at other temperatures, confirming the initial hypothesis.

Keywords: germination, latency, incubation, severity, necrosis, microscopy.

2.1. Introdução

A viticultura brasileira teve início nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, ainda com a chegada dos colonizadores portugueses (Sousa 2010), distribuindo-se para as demais regiões do País a partir da década de 1960 (Camargo; Tonietto e Hoffman 2011). Atualmente, a produção de uvas no Brasil é de 1.4 mi toneladas (FAOSTAT 2020), sendo o Estado de São Paulo, o terceiro maior produtor brasileiro, com cerca de 10% da produção total (IBGE 2020). A ocorrência de doenças foliares é frequente nas áreas produtoras de videira do Estado de São Paulo e seu controle, baseado principalmente na aplicação de fungicidas, constitui a principal preocupação dos produtores do Estado (Sônego; Garrido; Gava 2005). De acordo com a ANVISA (2016), 70% de amostras analisadas de uva apresentaram-se insatisfatórias, com resíduos de agrotóxicos, e 30% desse total estavam acima do Limite Máximo de Resíduos (LMR). De modo geral, há excessiva aplicação de fungicidas para o controle das doenças foliares. Na região de Jales, SP, foram realizadas, em média, 103 e 59 aplicações de fungicidas em cultivares de *V. vinifera* e *V. labrusca*, respectivamente, a maioria para o controle do míldio da videira (Costa et al. 2012).

A ferrugem asiática da videira, causada por *Neophysopella tropicalis* (*= Phakopsora euvitis*), gera danos severos à produção de videiras, principalmente em latitudes menores que 25 °S (Santos et al. 2020). Sua presença pode levar à desfolha precoce, prejudicando o desenvolvimento tanto da parte aérea quanto das raízes da videira, o que afeta a produção de substâncias essenciais ao amadurecimento do fruto, diminuindo ainda o acúmulo de reservas pelo mesmo, causando perdas na produção e comprometendo as próximas safras (Nogueira Júnior et al. 2017). A maioria das cultivares de *V. vinifera* e de *V. labrusca*, assim como de seus híbridos interespecíficos é suscetível à ferrugem (Hennessy et al. 2007; Angelotti et al. 2008), mas a ocorrência da doença no campo é mais frequente em cultivares de *V. labrusca* como Niagara Rosada.

O intervalo ótimo de temperatura para a germinação *in vitro* de *N. tropicalis* está entre 20 e 25 °C, com baixa taxa de germinação dos urediniósporos a 30 °C (Alves 2015). Apesar da baixa taxa de germinação, observou-se que o período de latência é menor e a severidade é maior quando as plantas são incubadas a 30 °C do que nas temperaturas consideradas ótimas (Alves

2015). Essa alta severidade não foi devida ao aumento no número de lesões, mas sim à extensa necrose do limbo foliar. É sabido que o efeito da temperatura em diferentes fases do ciclo das doenças não é homogêneo. A infecção de soja por Phakopsora pachyrhizi, agente causal da ferrugem asiática da soja, por exemplo, também é inibida a 30 °C, mas a colonização da planta pelo patógeno, embora um pouco mais lenta, não é fortemente afetada por essa temperatura (Alves 2007). Plantas de soja infectadas a 23 °C e transferidas para câmaras a 23 e 30 °C mostraram densidade de lesões e severidade similares (Alves 2007). O que surpreende em N. tropicalis é a elevada área foliar necrosada das plantas mantidas a 30 °C, característica não observada em soja inoculada com P. pachyrhizi. A presença de necrose foliar na maioria das ferrugens está associada à resposta de hipersensibilidade (Wellensiek 1927; Parlevliet & Kuiper 1977) e à baixa severidade da doença sem redução significativa da área foliar fotossinteticamente ativa (Beardmore et al. 1983, Godoy et al. 2016). No entanto, a presença de necrose em videiras mantidas a 30 °C está associada à alta severidade, sendo necessárias análises histológicas e fisiológicas para o entendimento do processo. Um fator que pode ter interferido nas observações de Alves (2015) é a resposta da planta à ação combinada do patógeno e da temperatura elevada, causando alterações estruturais e subcelulares como já verificado em Vitis vinifera cv. Razegui e cv. Itália Muscat após três meses em condições de estresse a 36 °C (Ben Salem-Fnayou et al. 2011). Segundo os autores, em ambas as cultivares houve aumento na espessura da lâmina foliar, redução na espessura da cutícula e parênquima lacunoso provido de cloroplastos globulares com as membranas dos tilacoides desorganizadas. Alterações similares nos cloroplastos foram verificadas em plantas de V. vinifera cv. Jingxiu após apenas 10 horas de estresse térmico (Zhang et al. 2005).

A hipótese deste trabalho foi de que a elevação da temperatura do ar, atuando como estresse térmico, afeta a interação videira-*N. tropicalis* de tal maneira que a severidade final nas folhas seja máxima, mesmo que o ambiente não seja o ideal para o desenvolvimento do patógeno. Para testar a hipótese estabelecida, foram feitas análises epidemiológicas e histopatológicas em plantas inoculadas e não inoculadas de *Vitis labrusca* L. cv. Niagara Rosada e *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon, submetidas a diferentes temperaturas.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Efeito da temperatura na germinação de urediniósporos de *Neophysopella tropicalis in vitro*

O inóculo, de origem monopustular, do patógeno foi coletado de folhas de mudas de videiras cv. Niagara Rosada mantidas em casa de vegetação. Os urediniósporos foram

suspensos em 10 mL de água destilada e Tween 20 a 0,01%. A concentração final da suspensão foi ajustada para 10⁵ urediniósporos mL⁻¹, com auxílio de câmara de Neubauer. Três alíquotas de 70 µL da suspensão de urediniósporos foram depositadas equidistantes entre si em placas de poliestireno, de 9 cm de diâmetro. Cada placa fechada foi colocada em uma caixa plástica gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) contendo uma folha de papel filtro e 30 mL de água destilada. As caixas plásticas, contendo as placas, foram mantidas em câmara de crescimento (Incubadora B.O.D./Fotoperíodo, modelo AC 71) ajustadas nas temperaturas de 15, 20, 25, 30, 33 e 35 °C, no escuro. O processo de germinação dos urediniósporos foi interrompido, para cada temperatura, 24 horas após a deposição da suspensão nas placas, adicionando-se uma gota de lactoglicerol para cada gota de suspensão com os esporos. A contagem de esporos germinados foi feita em microscópio de luz, com aumento de 400 vezes. Em cada gota, foi avaliada a germinação de esporos, em 100 esporos observados aleatoriamente, e considerou-se germinado o urediniósporo que apresentava tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao seu diâmetro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições por temperatura. A unidade experimental foi uma placa de poliestireno com três gotas de inóculo. O experimento foi realizado duas vezes.

2.2.2. Efeito da temperatura na germinação de urediniósporos de *Neophysopella tropicalis in vivo*

O inóculo foi produzido da mesma forma como descrito no item 2.1. Para cada temperatura, foram utilizadas quatro folhas destacadas das videiras cv. Niagara Rosada mantidas em casa de vegetação. Utilizou-se sempre as 3ª e 4ª folhas das mudas, a partir da base. As folhas destacadas foram mantidas em câmara úmida (caixas gerbox com papel de filtro umedecido). Sobre a face abaxial das folhas foram colocadas de quatro a cinco fitas de borracha, com orifício no centro, onde foi feita a inoculação com uma gota de 70 µL da suspensão de urediniósporos (Figura 1). As caixas plásticas, contendo as folhas, foram mantidas em câmara de crescimento (Incubadora B.O.D./Fotoperíodo, modelo AC 71) ajustadas nas temperaturas de 15, 20, 25, 30, 33 e 35 °C, no escuro por 24 horas. As amostras foram processadas conforme metodologia descrita abaixo (**2.2.3**.), e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura. Foram avaliados 100 urediniósporos, selecionados de forma aleatória. Foram considerados germinados os urediniósporos que apresentavam tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao seu diâmetro.



Figura 1. Imagem fotográfica da folha da videira cv. Niagara Rosada utilizada na quantificação da germinação de urediniósporos de *Neophysopella tropicalis in vivo*. A suspensão de inóculo foi depositada sobre a face abaxial da folha, no orifício de cada fita de borracha. As folhas foram mantidas em câmara úmida com papel de filtro dentro de caixas gerbox.

2.2.3. Preparo das amostras para a análise ao microscópio eletrônico de varredura

Fragmentos de folhas de videira cv. Niagara Rosada e cv. Cabernet Sauvignon inoculadas com *N. tropicalis* foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965; modificado com tampão fosfato pH 7,2), desidratadas em série etílica (10, 30, 50, 70, 90 e 100%), secas ao método do ponto crítico de CO₂, montadas sobre suportes de alumínio sobre fitas de carbono dupla face e cobertas com uma camada de ouro de 30 a 40 nm no equipamento Balzers modelo SCD 050. As análises e a digitalização das imagens foram realizadas ao microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM IT300LV operado a 20kv com as escalas impressas diretamente nas eletromicrografias. Essa etapa foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica Professor Dr. Elliot Watanabe Kitajima da ESALQ-USP.

2.2.4. Efeito da temperatura no desenvolvimento de *Neophysopella tropicalis* em mudas de Niagara Rosada e de Cabernet Sauvignon

Estacas de videira das cultivares Cabernet Sauvignon e Niagara Rosada, de aproximadamente 30 cm de altura, foram adquiridas de viveirista localizado no município de Poços de Caldas-MG, plantadas em vasos de plástico de 7 L, contendo 6 L de substrato esterilizado contendo mistura de terra argilosa, areia e esterco curtido e mantidas em casa-de-vegetação. As adubações foram realizadas mensalmente via solo. Os vasos foram irrigados, diariamente, com 200 mL de água/vaso.

As mudas foram mantidas em condições controladas de temperatura a 20, 25 e 30 °C, em câmaras de crescimento (Conviron, Winnipeg, Canadá) com fotoperíodo de 12 h e radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de 400 µmol m ⁻² s ⁻¹. Foram inoculadas em cada planta, cinco
folhas, com mais de 20 dias de idade, em sua face abaxial, por aspersão de suspensão de urediniósporos na concentração de 10⁵ esporos mL⁻¹ até o ponto de escorrimento, com o auxílio de um compressor (Ferrari Mega Air CFA 7.6/241). As plantas foram mantidas em câmara úmida e no escuro por 24 horas. Plantas aspergidas com água destilada serviram de testemunha. Foram utilizadas cinco repetições (plantas) para cada temperatura.

Foram avaliados os períodos de incubação e de latência, em dias. Ambos foram obtidos pelo número de dias em que mais de 50% das folhas expressaram sintomas.

Ao longo de todo experimento uma área de 2 cm² do limbo foliar foi fotografada e, ao final do experimento, foram fotografadas ambas as faces das folhas e as imagens digitais processadas com o software Quant (Vale et al. 2001) para estimar a densidade de lesões e a severidade da doença em cada avaliação. As avaliações foram semanais. As pústulas e o eventual halo amarelado ou marrom que circunda as pústulas foram considerados como área doente. A densidade de lesões foi feita pela contagem do número pústulas em 2 cm² de área foliar até sua estabilização.

2.2.5. Análises estatísticas

O efeito da temperatura na taxa de germinação de urediniósporos de *N. tropicalis* foi analisado por meio de regressões não lineares, utilizando a função beta generalizada descrita por Hau & Kranz (1990):

$$y=b_1((x-b_2)^{b_4})((b_3-x)^{b_5})$$

onde y representa a proporção de urediniósporos germinados, x representa a temperatura e os parâmetros b_2 e b_3 representam, respectivamente, as temperaturas mínima e máxima. Os parâmetros b_1 , b_4 e b_5 não possuem significado biológico, mas o parâmetro b_5 é inversamente proporcional à amplitude da faixa ótima de temperatura para a germinação dos urediniósporos. Quanto maior o parâmetro b_5 , menor a amplitude de temperaturas ótimas para a germinação dos urediniósporos. As regressões foram realizadas no software Statistica (Statsoft).

As médias dos parâmetros das curvas de taxa de germinação e período de latência foram analisadas pelo teste t. As médias de severidade e de densidade de lesões foram submetidas à análise de variância (ANOVA) utilizando o software R v.3.6.0, e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.2.6. Preparo das amostras para a análise ao microscópio eletrônico de transmissão

Para observação das alterações ultraestruturais no mesofilo de folhas Niagara Rosada sadias a 25 e 30 °C, fragmentos de folhas completamente expandidas aspergidas com água foram fixadas em Glutaraldeído 3% e Tampão Cacodilato (0,2 M pH 7,2) por 48 horas. Foi retirado o ar das amostras por 5 minutos em bomba a vácuo e, posteriormente, foram pósfixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas e mantidas overnight com acetato de uranila 0,5% a fim de promover a contrastação in bloco. As amostras foram desidratadas em série crescente de acetona até 100% e, em seguida, infiltradas em resina Spurr sendo mantidas em concentrações crescentes de resina em acetona (2:1; 1:1; 1:2), e, ao final, em resina pura. A polimerização da resina foi feita a 60 °C por 48 horas para a confecção dos blocos. Após a polimerização da resina, parte dos blocos contendo as amostras foi desbastada e seccionada em ultramicrótomo Leica Ultracut UC6. As seções prateadas (70-80 nm) foram feitas em navalha de diamante e depositadas sobre telas de cobre (100 mesh) recobertas com película de colódio 2,5%. A contrastação foi feita utilizando acetato de uranila e citrato de chumbo por 15 minutos em cada etapa. As observações e as eletromicrografias foram realizadas pelo emprego da câmera de vídeo Gatan 830 J46W44 acoplada ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM -1011 operado a 60 Kv com as escalas das eletromicrografias diretamente impressas nas mesmas. Essa etapa foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica Professor Dr. Elliot Watanabe Kitajima da ESALQ-USP.

2.2.7. Preparo das amostras para a análise aos microscópios de luz e de epifluorescência

Para as análises das alterações estruturais foliares das plantas das duas cultivares mantidas a 25 e 30 °C, foram coletadas folhas completamente expandidas inoculadas com *Neophysopella tropicalis*, aos 14 dias após a inoculação. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965; modificado com tampão fosfato pH 7,2). Durante a fixação as amostras foram levadas a uma bomba de vácuo para a retirada do ar contida nos tecidos e então desidratadas em série etanólica (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%), infiltradas em hidroxi-etil-metacrilato (Leica Historesin[®]) conforme recomenda o fabricante. Os blocos foram seccionados a 10 µm de espessura em micrótomo rotatório Leica RM 2045 com o auxílio de navalhas de vidro. Em seguida, as lâminas foram depositadas sobre uma placa aquecedora a 40 °C para a secagem e fixação das seções na lâmina.

Para as análises histopatológicas as secções foram submetidas a corantes e reagentes específicos. As secções foram montadas em lâminas de vidro e, posteriormente coradas com azul de toluidina (O'Brien et al. 1964). As lâminas obtidas foram analisadas com o auxílio do microscópio de luz e as imagens capturadas com câmera de vídeo Leica DC 300F acoplada ao microscópio Leica DMLD. A escala micrométrica foi obtida de acordo com a magnificação.

Para a microscopia de epifluorescência foi utilizado o corante azul de anilina 1% para detectar a calose. As seções eram foram coradas com azul de anilina 1%, diluído em tampão PO₄ 0,1 M, pH 9 por 20 min (Ruzin 1999) e examinado sob o filtro DAP (ex: 325-375 nm; em: 435-485 nm). As seções foram montadas em água destilada e analisada em um microscópio Leica DM 5500. As imagens foram capturadas usando uma câmera Leica DFC365 FX. Seções não coradas montadas em água foram analisadas sob filtro A (UV) (excitação 340 nm, emissão 380 nm) ao microscópio Leica DMLB acoplado a uma câmera digital (Leica DFC 310Fx) para observar a autofluorescência de fenóis. A escala micrométrica foi obtida de acordo com a magnificação.

2.3. Resultados

2.3.1. Efeito da temperatura na germinação de urediniósporos de *Neophysopella tropicalis*

A taxa de germinação de urediniósporos de *N. tropicalis in vitro* foi elevada entre 20 e 25 °C, mas a partir de 30 °C houve grande redução na proporção de esporos germinados (Figura 2).

Os valores das taxas de germinação de urediniósporos de *N. tropicalis* em folhas destacadas de cv. Niagara Rosada (Figuras 2 e 3) e de cv. Cabernet Sauvignon (Figuras 2 e 4) foram superiores àqueles observados *in vitro* em todas as temperaturas com exceção a 35 °C, na qual a germinação foi inferior a 5% em qualquer dos tratamentos. Tanto em folhas destacadas de cv. Niagara Rosada como de cv. Cabernet Sauvignon, os valores obtidos a 20, 25 e 30 °C foram superiores a 80%. Nas temperaturas de 15 e 33 °C as taxas de germinação variaram de 40 a 60%.



Figura 2. Taxa de germinação (proporção) de urediniósporos de *Neophysopella tropicalis* em função da temperatura *in vitro* (Placas) e *in vivo* em folhas de videiras cv. Niagara Rosada e Cabernet Sauvignon. As linhas representam o ajuste da função beta generalizada de dados.

O valor da temperatura máxima estimada pelo modelo beta generalizado para a germinação dos urediniósporos (*b3*) ficou próximo a 35 °C, independentemente da metodologia utilizada. A temperatura mínima estimada para a germinação dos urediniósporos (*b2*) foi menor nas folhas destacadas, em ambas as espécies, do que nas placas, com valores de 9,6 °C em folhas de cv. Niagara Rosada, 10,6 °C em folhas de cv. Cabernet Sauvignon e 13,2 °C em placas de poliestireno. O parâmetro b_5 do modelo beta generalizado de Hau & Kranz (1990) foi significativamente maior nas curvas de germinação de urediniósporos em placas de poliestireno (2,14) do que nas folhas destacadas das duas cultivares de videira: 0,58 na cv. Niagara Rosada e 0,79 na cv. Cabernet Sauvignon (Tabela 1).

	Parâmetros	valor estimado	erro padrão	p valor
	<i>b1</i>	0,000	0,00	8,91E-01
	<i>b2</i>	13,2 a	2,50	5,00E-04
Placas	b3	35,6 a	3,52	3,25E-06
	<i>b4</i>	1,082	1,05	3,30E-01
	b5	2,14 a	1,55	2,02E-01
	<i>b1</i>	0,016	0,02	4,63E-01
	<i>b2</i>	9,6 b	2,94	3,06E-03
Niagara Rosada	b3	35 a	0,01	0,00E+00
	<i>b4</i>	0,972	0,36	1,31E-02
	<i>b5</i>	0,58 b	0,08	1,23E-07
	<i>b1</i>	0,0065	0,01	5,99E-01
Cali anna at	<i>b2</i>	10,6 b	2,90	1,62E-03
Capernet	<i>b3</i>	35 a	0,09	0,00E+00
	<i>b</i> 4	1,19 0,51		3,06E-02
	<i>b5</i>	0,79 b	0,14	1,75E-05

Tabela 1. Parâmetros obtidos pela equação beta generalizada*

*Equação beta generalizada de Hau e Kranz (1990): $y=b_1((x-b_2)^{b_4})((b_3-x)^{b_5})$, onde y representa a proporção de esporos germinados, x representa a temperatura e os parâmetros b_2 e b_3 representam, respectivamente, as temperaturas mínima e máxima. Os parâmetros b_1 , b_4 e b_5 não possuem significado biológico. Os parâmetros b_2 , b_3 e b_5 foram comparados entre os métodos pelo teste t de Student.

Em folhas completamente expandidas da cv. Niagara Rosada e da cv. Cabernet Sauvignon, nas três temperaturas com maior taxa de germinação (20, 25 e 30 °C) foi possível observar a alta frequência de formação de apressórios tanto sobre os estômatos (Figuras 3A, C, E e G; 4A, C, E e G) quanto sobre junções de células epidérmicas ordinárias (Figuras 3B, D, F e H; 4B, D, F e H). Fora dessa faixa, a 15 e 33 °C, apesar de se observar alta taxa de germinação, raramente se observou a formação de apressório.



Figura 3. Eletromicrografias de varredura da face abaxial de folhas completamente expandidas da videira cv. Niagara Rosada mantidas a 15 (A-B), 20 (C-D), 25 (E-F) e 30 °C (G-H), 24 horas após inoculação com *Neophysopella tropicalis*. A, C, E e G. Formação de apressório sobre estômato (setas vermelhas). B, D, F e H. Formação de apressório sobre junções de células epidérmicas ordinárias (setas azuis). Tubo germinativo = setas brancas.



Figura 4. Eletromicrografias de varredura da face abaxial de folhas completamente expandidas da videira cv. Cabernet Sauvignon mantidas a 15 (A-B), 20 (C-D), 25 (E-F) e 30 °C (G-H), 24 horas após inoculação com *Neophysopella tropicalis*. A, C, E e G. Formação de apressório sobre estômato (setas vermelhas). B, D, F e H. Formação de apressório sobre junções de células epidérmicas ordinárias (setas azuis). Tubo germinativo = setas brancas.

2.3.2. Efeito da temperatura no desenvolvimento de *Neophysopella tropicalis* em mudas de Niagara Rosada e Cabernet Sauvignon

Para a cv. Niagara Rosada e a cv. Cabernet Sauvignon foi verificado que o período de incubação e o período de latência coincidiram, pois, o aparecimento de lesões e a esporulação foram processos simultâneos. Para as temperaturas de 25 e 30 °C, em ambas as cultivares, o período foi de 7 dias, enquanto para 20 °C foi de 9 dias (Figura 5; Tabela 2). Pelo teste t de Student, os períodos de latência variaram significativamente entre 20 e 25 °C e 20 e 30 °C, em ambas as cultivares estudadas.

	Parâmetros	valor	erro	p-level
NT•	а	0,04	0,004	0,002
Niagara	b	-2,2	0,2	0,002
Kosaua	с	37,7	2,5	0,001
	а	0,05	0,014	0,040
Cabernet	b	-2,7	0,7	0,034
Sauvignon	с	43,3	8,8	0,016

 Tabela 2. Coeficientes obtidos para as regressões polinomiais de período de latência para duas cultivares.

Coeficientes obtidos para a equação de regressão polinomial: $y=a(x^2) + (bx) + c$, onde y representa o período de latência em dias, x representa a temperatura e os coeficientes a, b e c não possuem significado biológico. Os coeficientes a, b e c foram comparados entre os métodos pelo teste t de Student e não diferiram entre as cultivares.

Em mudas de cv. Niagara Rosada, a severidade da ferrugem (proporção da área foliar sintomática) na última avaliação variou de 0,18-0,9 a 20 °C, 0,2-1 a 25 °C e 0-0,82 a 30 °C (Figura 5E). A densidade de lesões variou de 28-87 pústulas/cm² a 20 °C, 108-275 pústulas/cm² a 25 °C e 27-171 pústulas/cm² a 30 °C (Figura 5E). Em mudas de cv. Cabernet Sauvignon, a severidade da ferrugem das folhas variou de 0,03-0,8 a 20 °C, 0,02-0,78 a 25 °C e 0,04-1 a 30 °C (Figura 5F). A densidade de lesões variou de 0-37 pústulas/cm² a 20 °C, 2-28 pústulas/cm² a 25 °C e 18-42 pústulas/cm² a 30 °C (Figura 5D).



Figura 5. Progresso da ferrugem da videira (*Neophysopella tropicalis*) em plantas submetidas a 20, 25 e 30 °C. Fotografias de regiões de 2 cm² de folhas de cv. Niagara Rosada (A) e cv. Cabernet Sauvignon (B) mantidas a 20, 25 e 30 °C, da esquerda para a direita respectivamente, aos 23 (A) e 26 (B) dias após a inoculação com *Neophysopella tropicalis*. Densidade de lesões (C e D), severidade da doença (E e F) e período de latência (G e H) em folhas de videira cv. Niagara Rosada (C, E e G) e cv. Cabernet Sauvignon (D, F e H) inoculadas e mantidas em temperaturas diferentes ao longo do tempo. DAI=dias após a inoculação.

Em todas as condições e em ambas as cultivares, foi possível notar a variação na relação entre a necrose da face adaxial e a formação de pústulas na face abaxial. Em ambas as cultivares, a 25 °C houve uma correspondência entre essas duas variáveis, com uma relação de valor 1. A diminuição da temperatura (20 °C) gerou uma redução nessa relação, enquanto o aumento da temperatura elevou essa relação (Tabela 3), indicando que a 30 °C, além da necrose correspondente às áreas das pústulas há a presença de outro tipo de necrose, que é semelhante à observada em plantas sadias mantidas nessa mesma temperatura.

Tabela 3. Relação entre as áreas da necrose da face adaxial da folha e as áreas ocupadas pelas pústulas formadas na face abaxial da folha.

T °C	Niagara Rosada	Cabernet Sauvignon
20	0,86	0,87
25	1,0	0,97
30	1,37	1,14

As análises nas folhas da cv. Niagara Rosada sadias mantidas a 25 e 30 °C por 14 dias mostrou que existem diferenças ultraestruturais ocorrendo já neste período (Figuras 6 e 7). A 25 °C, a parede periclinal externa da epiderme adaxial exibia projeções características distribuídas regularmente e revestidas pela cutícula contínua (Figura 6A e B). Já a 30 °C houve descontinuidade nas projeções parietais e alterações na deposição cuticular (Figura 6C-E).



Figura 6. Eletromicrografias de transmissão de folhas completamente expandidas de uva cv. Niagara Rosada mantidas 14 dias a 25 °C (A-B) e 30 °C (C-E). Epiderme da face adaxial (A-E). A, B. Ornamentações parietais características revestidas pela cutícula contínua. C-E. Alterações nas ornamentações parietais e na deposição cuticular. Pc = parede celular; Cu = cutícula.

Nas células do mesofilo das plantas controle (25 °C sadias), os cloroplastos apresentaram formato discoide com as membranas dos tilacoides bem organizadas e empilhadas (Figura 7A, C e E). Por sua vez, os cloroplastos das plantas mantidas a 30 °C apresentaram formato globular (Figura 7B, D e F), com desorganização no sistema de membranas e presença de muitos plastoglóbulos (Figura 7F). Em ambas as temperaturas se observou a presença de grãos de amido (Figura 7), indicando metabolismo ativo.



Figura 7. Eletromicrografias de transmissão de células do mesofilo de folhas completamente expandidas de uva cv. Niagara Rosada mantidas 14 dias a 25 °C (A, C, E) e 30 °C (B, D, F). Notar nos cloroplastos a diferença, entre as duas temperaturas, no formato e na organização das membranas dos tilacoides, bem como na presença de plastoglóbulos. Cl=cloroplasto; Va=vacúolo; Gr=grão de amido; Pl=plastoglóbulo.

As análises histológicas mostraram que há diferenças no mesofilo das folhas sadias da cv. Niagara Rosada quando mantidas a 25 e 30 °C (Figura 8). O parênquima paliçádico uniestratificado apresentou células mais alongadas e o parênquima lacunoso um número menor de camadas celulares (três) a 25 °C (Figura 8A), enquanto a 30 °C, o parênquima lacunoso apresentou cinco fileiras de células (Figura 8B). Além disso, o conteúdo fenólico, corado em verde pelo azul de toluidina, está mais evidenciado nas células do mesofilo a 25 °C (Figura 8A) do que a 30 °C (Figura 8B). A autofluorescência para os fenóis nas células do parênquima paliçádico também ficou mais intensa a 25 °C (Figura 8C) do que a 30 °C (Figura 8D) indicando que há uma diferença no conteúdo fenólico das células entre as temperaturas.



Figura 8. Micrografias de seções transversais de folhas completamente expandidas de videira cv. Niagara Rosada 14 dias após aspersão com água e mantidas a 25 (A, C) e 30 °C (B, D). Seções coradas com azul de toluidina (A, B). Seções não coradas analisadas em filtro UV mostrando a autofluorescência para os fenóis (setas brancas) mais intensa a 25 °C (C) do que a 30 °C (D). Ei = epiderme inferior; Es = epiderme superior; Pl = parênquima lacunoso; Pp = parênquima paliçádico.

As análises histológicas nas folhas da cv. Niagara Rosada 14 dias após serem inoculadas com *N. tropicalis* e mantidas a 25 e 30 °C indicaram variação nas lesões e nas regiões adjacentes às lesões (Figura 9). Na região das lesões foliares a 25 °C, as células do parênquima paliçádico passam a apresentar amplos espaços intercelulares (Figura 9A). Diferentemente das lesões observadas a 25 °C, a 30 °C, na região das lesões foi observada diminuição da espessura da lâmina foliar resultante da obliteração das células epidérmicas e do parênquima lacunoso (Figura 9B). Na região adjacente à lesão em folhas completamente expandidas a 25 °C não

apresentou alterações nas células (Figura 9C), já a 30 °C, a região adjacente à pústula apresentou hipertrofia nas células do parênquima lacunoso, reduzindo os espaços intercelulares do mesofilo e, em alguns casos, obstruindo a câmara subestomática (Figura 9D).



Figura 9. Micrografias de luz seções transversais de folhas completamente expandidas de videira cv. Niagara Rosada 14 dias após a incubação de plantas inoculadas com *Neophysopella tropicalis* mantidas a 25 °C (A e C) e 30 °C (B e D) coradas com azul de toluidina. Notar a diferença nas câmaras subestomáticas (seta preta) em cada tratamento com hipertrofia de células do parênquima e consequente preenchimento dos espaços intercelulares a 30 °C (B e D). Ei = epiderme inferior; Es = epiderme superior; Pl = parênquima lacunoso; Pp = parênquima paliçádico; Pu = pústula.

As análises ao microscópio de epifluorescência com Azul de Anilina, foi positivo em células colonizadas por *N. tropicalis* a 30 °C (Figura 10).



Figura 10. Micrografias de luz e de epifluorescência de seções transversais de folhas completamente expandidas de uva cv. Niagara Rosada após 14 dias da inoculação com *Neophysopella tropicalis* mantidas a 30 °C, coradas com azul de anilina analisadas sob filtro DAP. Setas brancas = calose; Es = epiderme superior; Pu = pústula.

2.4. Discussão

Nauzawa (2006) e Alves (2015), por meio da análise da germinação de urediniósporos de Neophysopella tropicalis in vitro, observaram que as temperaturas de 5 e 35 °C inibem completamente a germinação do patógeno e que a temperatura ótima para o desenvolvimento de N. tropicalis é entre 15 e 25 °C. Em seus estudos, a elevação da temperatura para 30 °C gerou redução na viabilidade dos esporos, que germinaram em média 7,26% (Naruzawa 2006) e 10% (Alves 2015). Para 30 °C, a germinação observada em placas neste trabalho foi em média de 18%, mas em folhas destacadas o valor foi de 84% em videira cv. Niagara Rosada e 87% em cv. Cabernet Sauvignon. Aplicando o modelo beta generalizado (Hau & Kranz, 1990), a grande variação entre os métodos resultou em valores de b5 diferentes. Esse parâmetro representa a magnitude da faixa de temperatura ótima para a germinação do patógeno. Assim quanto maior a faixa ótima, menor o valor de b_5 . Isso pôde ser observado neste trabalho, onde este parâmetro variou de 2,14 no método em placas, semelhante ao valor de 2,2 observado por Alves (2007) para Phakopsora pachyrhizi. Para o método de folhas destacadas obteve-se o valor de 0,58 em cv. Niagara Rosada e 0,79 em cv. Cabernet Sauvignon. Essas diferenças indicam que a folha estimula a germinação do patógeno, seja pela estrutura ou composição química de sua superfície. Além disso, nas faixas de 15-20 e 30-33 °C o patógeno germina bem e, há total inibição a 35 °C. As diferenças observadas nas taxas de germinação de urediniósporos in vitro e *in vivo*, sempre menores *in vitro*, constituem-se em um problema na experimentação com a ferrugem da videira, pois o protocolo usual para verificar a viabilidade do inóculo é realizado pela deposição da suspensão de esporos em placas de Petri. Demonstrou-se, neste trabalho que a metodologia in vitro subestima a taxa de germinação do inóculo. Também ficou evidente que a faixa ótima de temperatura para germinação de urediniósporos de *N. tropicalis* é de 20 a 30 °C.

A variação no processo de pré-penetração pôde ser visualizada por meio de análises em microscópio eletrônico de varredura. Tanto em folhas maduras de cv. Niagara Rosada como de cv. Cabernet Sauvignon nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C, 24 horas após a inoculação, foi possível observar a formação de apressórios sobre estômatos e junções de células epidérmicas, indicando que há tanto penetração indireta como direta, em concordância ao que já está documentado na literatura (Rasera et al. 2019). Nas temperaturas de 15 e 33 °C os urediniósporos de *N. tropicalis* produziram tubos germinativos, porém raramente se observou a formação de apressórios, indicando provável redução na velocidade do processo de infecção.

Em ferrugens, de modo geral, o período de latência coincide com o período de incubação, já que a presença das primeiras estruturas reprodutivas corresponde ao aparecimento de lesões. Ambos os componentes monocíclicos são considerados importantes para o entendimento de doenças policíclicas, pois ao final de cada período, com o aparecimento de lesões esporulantes, inicia-se uma nova geração da doença, ou seja, um ciclo secundário. Assim, quanto menor for o período de latência maior a velocidade dos ciclos secundários e maior seu impacto na lavoura (Kranz 2002). Neste trabalho o período de latência encontrado para *N. tropicalis* em cv. Niagara Rosada e cv. Cabernet Sauvignon foi semelhante ao observado por Angelotti et al. (2014) e Alves (2015), com valor de sete dias para as temperaturas de 25 e 30 °C, e nove para 20 °C. Os modelos obtidos, em ambas as cultivares, indicaram redução dos períodos de latência, com o aumento da temperatura e, consequentemente, maior número de ciclos da doença.

Em todas as temperaturas analisadas, bem como em ambas as cultivares, foi possível observar o aumento de severidade e densidade de lesões ao longo de todos os experimentos, o que é provocado pelo aumento no número de urédias em cada lesão (Primiano et al. 2019). Neste estudo, para cv. Niagara Rosada a severidade e a densidade de lesões foram maiores a 25 °C, seguida por 30 e 20 °C, enquanto para cv. Cabernet Sauvignon não houve diferença significativa entre os valores obtidos nas três temperaturas. Estudos com cv. Niagara Rosada indicaram severidade crescente com o aumento de temperatura e o maior valor a 30 °C (Alves 2015), enquanto a maior densidade de lesões foi observada a 20 °C (Angelotti et al. 2014). Essa variação pode ser decorrente das condições experimentais e de análise. A discrepância entre os resultados obtidos para cv. Niagara Rosada e cv. Cabernet Sauvignon ocorreram em função da maior susceptibilidade à doença que a cultivar da espécie *Vitis labrusca* possui (Angelotti et al. 2008).

As análises estruturais de folhas completamente expandidas inoculadas com *N. tropicalis* mantidas a 25 e 30 °C mostraram diferenças nas características das lesões formadas e do mesofilo ao redor das lesões, 14 dias após a inoculação. A 30 °C, é possível observar perda na conformação das células no local da lesão, dificultando a diferenciação dos tecidos e, na região ao redor da lesão há hipertrofia das células dos parênquimas paliçádico e lacunoso e redução completa dos espaços intercelulares. Um estudo recente sobre os processos de infecção e colonização de *N. tropicalis* em *V. vinifera* cv. Moscato mostrou a formação de halos encharcados ao redor da lesão, com hipertrofia de células do parênquima, redução nos espaços intercelulares e espessamento celulósico das paredes, como mecanismos induzidos de defesa para restringir a colonização fúngica (Navarro et al. 2019).

Como observado por Rasera et al. (2019) a 25 °C, nesse estudo identificou-se deposição de calose ao redor de estruturas intracelulares de *Neophysopella tropicalis* a 30 °C. O papel da calose em patossistemas biotróficos é altamente discutido (Hok et al. 2010), podendo atuar como defesa da planta (Donofrio & Delaney 2001; Glazebrook 2005; Meyer et al. 2009), com o encapsulamento do haustório e sua consequente morte, como observado em *P. pachyrhizi*-soja (Koch 1983) e *Puccinia striiformis*-trigo (Kang et al. 2002), resultando em resistência à doença. Entretanto, foi demonstrado que a enzima que produz a calose que circunda o neck haustorial diminui a sinalização de ácido salicílico em *Arabidopsis* (Jacobs et al. 2003; Nimishura et al. 2003), via relacionada à morte celular programada (Chisholm et al. 2006), linha de defesa contra patógenos biotróficos e hemibiotróficos (Bari & Jones 2009). Isso mostra que a deposição de calose ao redor do neck haustorial pode ser também um mecanismo do patógeno fundamental para sua estabilização e sucesso de sua colonização (Jacobs et al. 2003; Nimishura et al. 2003).

De maneira semelhante ao que foi observado por Alves (2015) em folhas de cv. Niagara Rosada, observou-se maiores valores de área necrosada na face adaxial das folhas na temperatura de 30 °C, em ambas as cultivares, e menor correspondência com a formação de pústulas na face abaxial da folha. Em relações de plantas e patógenos biotróficos, um mecanismo de defesa da planta é a reação de hipersensibilidade (Wellensiek 1927; Parlevliet e Kuiper 1977), que gera necrose foliar e está associada à baixa severidade da doença sem redução significativa da área foliar fotossinteticamente ativa (Beardmore et al. 1983, Godoy et al. 2016). No entanto, tanto neste trabalho como de Alves (2015), a presença de necrose foliar está associada a alta severidade. Assim, outro fator que pode ter interferido em nossas observações é a resposta da planta à ação da temperatura elevada causando alterações estruturais e subcelulares. Neste trabalho, a elevação da temperatura e manutenção constante

53

no ambiente controlado gerou alterações na estrutura e ultraestrutura das lâminas foliares de cv. Niagara Rosada. Nas células da epiderme de folhas sadias de plantas mantidas a 30 °C houve perda na ornamentação parietal e alteração na deposição da cutícula, em comparação com a epiderme de folhas mantidas a 25 °C. Alterações parietais e cuticulares foram observadas na epiderme por Ben Salem-Fnayou et al. (2011) em duas cultivares de *Vitis vinifera* submetidas à temperatura de 36 °C.

As lâminas foliares das mudas da cv. Niagara Rosada mantidas a 25 e 30 °C possuem a mesma espessura, entretanto, a proporção entre o parênquima paliçádico e o parênquima lacunoso variou entre as temperaturas. A 25 °C, o parênquima paliçádico apresentou maior comprimento e o parênquima lacunoso possui duas fileiras a menos de células que a 30 °C. A presença de células menores no parênquima paliçádico foi observada por Ben Salem-Fnayou et al. (2011) em videira cv. Raguezi e cv. Muscati Italia e, segundo Bañon et al. (2004), em ambientes de alta temperatura há uma tendência geral de redução no tamanho das células da planta. A ultraestrutura de folhas sadias mostrou que quando as plantas foram mantidas a 30 °C, os cloroplastos apresentaram características de gerontoplastos, com o sistema de tilacóides desorganizado e uma maior presença de plastoglóbulos. Segundo Bem Salem-Fnayou et al. (2011), plantas de cultivares viniferas apresentaram as mesmas variações nos cloroplastos sob estresse térmico e a presença de plastoglóbulos em maior número indicou o processo de degradação dos mesmos e início da senescência das folhas (Bertamini e Nedunchezhian 2003; Krupinska 2007), como também já foi observado em Vitis labrusca cv. Niagara Rosada em condição de estresse biótico (Rasera et al. 2019). O aumento da temperatura para 30 °C atuou como estresse térmico, que representa estresse oxidativo às plantas, tanto em sadias como inoculadas, visualizado pela alteração nos cloroplastos em plantas sadias e pela necrose foliar em plantas inoculadas aqui observados. Isso porque o estresse oxidativo leva a fotorrespiração ou ainda perda de elétrons, causando danos ao aparato fotossintético, como a degradação de cloroplastos e a morte celular programada (Sowden et al. 2017).

2.5. Conclusões

As análises de taxa de germinação de *Neophysopella tropicalis* com o apoio de microscopia eletrônica de varredura apontaram que a faixa ótima de desenvolvimento do patógeno é maior do que a documentada na literatura, situando-se entre 20 e 30 °C. O que indica que a escolha do método para análise pode subestimar o desenvolvimento do patógeno e, consequentemente, o seu potencial destrutivo com a variação de temperatura.

O estresse abiótico causado pela temperatura de 30 °C exacerba os efeitos da ferrugem, pois apesar de o patógeno provocar menor número de lesões na temperatura de 30 °C e de a planta utilizar seus mecanismos de defesa limitando a expansão do patógeno, a severidade da doença é similar àquela de plantas inoculadas e mantidas a 25 °C.

Referências

- Alves, R. F. 2015. Ferrugem da videira: Preservação de urediniósporos de *Phakopsora euvitis* e fatores relacionados à infecção do hospedeiro. Piracicaba, Universidade de São Paulo (dissertação de mestrado).
- Alves, S. A. M. 2007. Quantificação de parâmetros da pré-penetração e monocíclicos relacionados ao patossistema *Phakopsora pachyrhizi*-soja (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Angelotti, F.; Sacpin, C. R.; Tessmann, D. J.; Vida, J. B.; Canteri, M. G. 2014. The effect of temperature, leaf wetness and light on development of grapevine rust. Australasian Plant Pathology, Melbourne, V.43, n.1, p. 9-13.
- Angelotti, F.; Scapin, C. R.; Tessmann, D. J.; Vida, J. B.; Vieira, R. A.; Souto, E. R. 2008. Resistência de genótipos de videira à ferrugem. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 43(9), 1129-1134.
- ANVISA. 2016. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br
- Bañon, S.; Fernandez, J. A.; Franco, J. A.; Torrecillas, A.; Alarcón, J. J. & Sánchez-Blanco, M. J. 2004. Effects of water stress and night temperature preconditioning on water relations and morphological and anatomical changes of *Lotus creticus* plants. Scientia Horticulturae, 101(3), 333-342.
- Bari, R. & Jones, J. D. G. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. Plant Molecular Biology. 69: 473–488
- Beardmore, J.; Ride, J. P. & Granger, J. W. 1983. Cellular lignification as a factor in the hypersensitive resistance of wheat to stem rust. Physiological Plant Pathology, 22(2), 209-IN10.
- Ben Salem-Fnayou, A.; Bouamama, B.; Ghorbel, A. & Mliki, A. 2011. Investigations on the leaf anatomy and ultrastructure of grapevine (*Vitis vinifera*) under heat stress. Microscopy research and technique, 74(8), 756-762.

- Bertamini, M. & Nedunchezhian, N. 2003. Photosynthetic functioning of individual grapevine leaves (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) during ontogeny in the field. Vitis, 42(1), 13-17.
- Camargo, U. A.; Tonietto, J. & Hoffman, A. 2011. Progressos na viticultura brasileira. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. especial, n. 1, p. 144- 149.
- Chisholm, S. T.; Coaker, G.; Day, B. & Staskawicz, B. J. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, *124*(4), 803-814.
- Costa, T. V.; Tarsitano, M. A. A.; Conceição, M. A. F. 2012. Caracterização social e tecnológica da produção de uvas para mesa em pequenas propriedades rurais da região de Jales. Revista Brasileira de Fruticultura, 34: 766-773.
- Donofrio, N. M. & Delaney, T. P. 2001. Abnormal callose response phenotype and hypersusceptibility to *Peronospora parasitica* in defense-compromised *Arabidopsis* nim1-1 and salicylate hydroxylase-expressing plants. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14(4), 439-450.
- FAOSTAT Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 22. mai. 2020.
- Gindro, K.; Pezet, R.; Viret, O. 2003. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. Plant Physiology and Biochemistry 41: 846–853.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review of Phytopathology, 43, 205-227.
- Godoy, C.V.; Seixas, C.D.S.; Soares, R.M.; Marcelino-Guimarães, F.C.; Meyer, M.C.; Costamilan, L.M. 2016. Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. Pesquisa Agropecuária Brasileira 51: 407-421.
- Hau, B. & Kranz, J. 1990. Mathematics and statistics for analyses in epidemiology. In: Kranz, J. (Ed.) Epidemics of Plant Diseases: mathematical analyses and modeling. Berlin. Springer-Verlag. pp.12-52.
- Hennessy, C. R.; Daly, A. M. & Hearnden, M. N. 2007. Assessment of grapevine 214 cultivars for resistance to *Phakopsora euvitis*. Australasian Plant Pathology, 36(4), 313–317.
- Hok, S.; Attard, A. & Keller, H. 2010. Getting the most from the host: how pathogens force plants to cooperate in disease. Molecular plant-microbe interactions, 23(10), 1253-1259.
- IBGE. 2020. Levantamento Sistemático da produção agrícola. Brasília, Ministério do Planejamento, orçamento e gestão. 126 p.

- Jacobs, A. K.; Lipka, V.; Burton, R. A.; Panstruga, R.; Strizhov, N.; Schulze-Lefert, P. & Fincher, G. B. 2003. An *Arabidopsis* callose synthase, GSL5, is required for wound and papillary callose formation. The Plant Cell, 15(11), 2503-2513.
- Kang, Z.; Huang, L.; Buchenauer, H. 2002. Ultrastructural changes and localization of lignin and callose in compatible and incompatible interactions between wheat and *Puccinia striiformis*. Journal of Plant Diseases and Protection, 109, 25-37.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. Journal of Cell Biology, 27, 137-138.
- Koch, E.; Ebrahim-Nesbat, F. & Hoppe, H. H. 1983. Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in susceptible soybean leaves. Journal of Phytopathology, 106(4), 302-320.
- Kranz, J. 2002. The infection cycle or chain. In: Comparative epidemiology of plant diseases. Berlin: Springer, p. 49-92.
- Krupinska, K. 2007. Fate and activities of plastids during leaf senescence. In The structure and function of plastids (p. 433-449). Springer, Dordrecht.
- Meyer, D.; Pajonk, S.; Micali, C.; O'Connell, R. & Schulze-Lefert, P. 2009. Extracellular transport and integration of plant secretory proteins into pathogen-induced cell wall compartments. The Plant Journal, 57(6), 986-999.
- Naruzawa, E. S.; Celoto, M. I. B.; Papa, M. F. S.; Tomquelski, G. V.; Boliani, A. C. 2006. Estudos epidemiológicos e controle de *Phakopsora euvitis*. Fitopatologia Brasileira, 31, 41-45.
- Navarro, B. L.; Nogueira-Júnior, A.; Ribeiro, R. V. & Spósito, M. B. 2019. Photosynthetic damage caused by grapevine rust (*Phakopsora euvitis*) in *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*. Australasian Plant Pathology, 48(5), 509-518.
- Nishimura, M. T.; Stein, M.; Hou, B. H.; Vogel, J. P.; Edwards, H. & Somerville, S. C. 2003. Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. Science, 301(5635), 969-972.
- Nogueira Júnior, A. F.; Ribeiro, R. V.; Appezzato-da-Glória, B.; Soares, M. K. M.; Rasera, J.
 B.; Amorim, L. 2017. *Phakopsora euvitis* causes unusual damage to leaves and modifies carbohydrate metabolism in grapevine. Frontiers in plant science, 8, 1675.
- O'Brien, T. P.; Feder, N. & McCully, M. E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. Protoplasma, 59, 368–373.

- Parlevliet, J. E. & Kuiper, H. J. 1977. Resistance of some barley cultivars to leaf rust, *Puccinia hordei*; polygenic, partial resistance hidden by monogenic hypersensitivity. Netherlands journal of plant pathology, 83(2), 85-89.
- Primiano, I. V.; Loehrer, M.; Schaffrath, U. & Amorim, L. 2019. Formation of satellite uredinia as an important trait related to grapevine colonization by *Phakopsora meliosmae-myrianthae*. Plant Pathology, 68(9), 1732-1740.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/.
- Rasera, J. B.; Amorim, L.; Marques, J. P. R.; Soares, M. K. M. & Appezzato-da-Glória, B. 2019. Histopathological evidences of early grapevine leaf senescence caused by 43 *Phakopsora euvitis* colonisation. Physiological and Molecular Plant Pathology, 108, 101434.
 Ruzin, S. E. 1999. Plant Microtechnique and Microscopy, Oxford Press, Oxford, UK.
- Santos, R. F.; Primiano, I. V. & Amorim, L. 2020. Identification and pathogenicity of *Neophysopella* species associated with Asian grapevine leaf rust in Brazil. Plant Pathology.
- Sônego, O. R.; Garrido, L. R.; Gava, R. 2005. Ferrugem da videira. Comunicado técnico Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, n. 62, p. 1-3.
- Sousa, J. S. I. 2010. São Paulo berço da vitivinicultura brasileira. In: Vinhedo Paulista. (Eds) Bueno, S. C. S. et al. Campinas, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral – CATI, pp 3-15.
- Sowden, R. G.; Watson, S. J. & Jarvis, P. 2017. The role of chloroplasts in plant pathology. Essays in biochemistry, 62(1), 21-39.
- Vale, F. X. R.; Fernandes Filho, E. I. F.; and Liberato, J. R. 2001. QUANT a software for plant disease severity assessment, in Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology (Christchurch).
- Wellensiek, S. J. 1927. The nature of resistance in *Zea mays* L. to *Puccinia sorghi* Schw. Phytopathology 17: 815-825.
- Zhang, J. H.; Huang, W. D.; Liu, Y. P. & Pan, Q. H. 2005. Effects of temperature acclimation pretreatment on the ultrastructure of mesophyll cells in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Jingxiu) under cross-temperature stresses. Journal of Integrative Plant Biology, 47(8), 959-970.
- Zhang, H. & Sonnewald, U. 2017. Differences and commonalities of plant responses to single and combined stresses. The Plant Journal, 90(5), 839-855.

3. EFEITO DA FERRUGEM DA VIDEIRA E DA TEMPERATURA DO AR NAS TROCAS GASOSAS DE NIAGARA ROSADA E CABERNET SAUVIGNON

Resumo

O Brasil ocupa a 14^a posição no ranking de maiores produtores de uva do mundo, com uma produção de aproximadamente 1.5 milhões de toneladas. As alterações climáticas, caracterizadas pelo aumento tanto da temperatura como da concentração de gases do efeito estufa na atmosfera, provocaram um novo alerta na agricultura. A temperatura é um fator que interfere em quase em todas as fases de uma doença, podendo, também, aumentar ou reduzir a resistência de plantas a patógenos. A ferrugem da videira, causada por Neophysopella tropicalis, é atualmente endêmica no Brasil e possui grande importância no Estado de São Paulo. Estudo recente que avaliou alguns dos componentes monocíclicos da ferrugem da videira apontou que a elevação da temperatura gera aumento na severidade da doença. A hipótese deste trabalho foi de que a elevação da temperatura do ar, atuando como estresse térmico, afeta a interação videira-N. tropicalis de tal maneira que a severidade final nas folhas seja máxima, sendo o efeito do estresse combinado (ocorrência de ferrugem simultânea à temperatura elevada) maior que o dos estresses isolados (ferrugem ou temperatura elevada). O objetivo do estudo foi caracterizar as trocas gasosas de videiras cv. Niagara Rosada e cv. Cabernet Sauvignon sadias não inoculadas e inoculadas com N. tropicalis sob diferentes temperaturas. Os experimentos foram conduzidos em mudas envasadas de videiras cv. Niagara Rosada e cv. Cabernet Sauvignon sadias não inoculadas e inoculadas com N. tropicalis em câmaras com temperatura e luminosidade controladas. Avaliou-se semanalmente a severidade da ferrugem e variáveis de trocas gasosas ao longo de um mês. A presença do patógeno reduziu a assimilação de CO₂ a 25 °C e a 30 °C e essa redução seguiu um modelo exponencial negativo em função da severidade da doença. Na temperatura de 30 °C houve queda brusca na eficiência do uso da água, principalmente na cv. Niagara Rosada. Dessa forma, mesmo a temperatura de 30 °C não sendo a ideal para o desenvolvimento do patógeno, a combinação de estresses abiótico e biótico se mostrou tão prejudicial quanto à ocorrência de um estresse isolado.

Palavras-chave: fotossíntese, eficiência do uso da água, PhiPS2, severidade, lesão virtual.

Abstract

Brazil is the 14th largest producer of grapes in the world, with a production of approximately 1.5 million tons. Climate change, characterized by an increase in both temperature and concentration of greenhouse gases in the atmosphere, has triggered a new alert in agriculture. Temperature is a factor that interferes in almost all stages of a disease and can also increase or reduce the resistance of plants to pathogens. Grapevine rust, caused by Neophysopella tropicalis, is currently endemic in Brazil and has great importance in the State of São Paulo. A recent study that evaluated some of the monocyclic components of grapevine rust pointed out that the rise in temperature generates an increase in the severity of the disease. The hypothesis of this work was that the elevation of the air temperature, acting as thermal stress, affects the interaction of the grapevine-N. tropicalis in such a way that the final disease severity in the leaves is maximum, with the effect of combined stress (occurrence of simultaneous rust at elevated temperature) greater than the isolated stresses (rust or elevated temperature). The objective of the study was to characterize the gas exchange of grapevines cv. Niagara Rosada and cv. Cabernet Sauvignon healthy non inoculated and inoculated with N. tropicalis under different temperatures. The experiments were carried out on potted plants of cv. Niagara Rosada and cv. Cabernet Sauvignon healthy non inoculated and inoculated with N. tropicalis in cameras with controlled temperature and light. The severity of rust and gas

exchange variables are observed weekly over a month. The presence of the pathogen drastically reduces CO_2 assimilation at 25 °C and 30 °C and this reduction followed a negative exponential model due to the severity of the disease. At a temperature of 30 °C there was a sharp drop in the efficiency of water use, especially on cv. Niagara Rosada. Thus, even though the temperature of 30 °C is not ideal for the development of the pathogen, a combination of abiotic and biotic stresses is known to be as harmful as the occurrence of isolated stress.

Keywords: photosynthesis, water use efficiency, *PhiPS2*, severity, virtual lesion.

3.1. Introdução

A mudança de temperatura do ar altera as taxas de reações químicas e todos os organismos vivos, como plantas e patógenos, são produtos de muitas dessas reações que ocorrem dentro de suas células (Pollock 1990). Isso significa que tanto as plantas como os patógenos respondem a pequenas mudanças de temperatura, e a todo ambiente, o que é refletido no triângulo epidemiológico. O triângulo das doenças indica que a ocorrência de uma doença está condicionada à presença simultânea de um hospedeiro susceptível, um patógeno virulento e condições ambientais favoráveis para seu desenvolvimento (Stevens 1960). Se considerarmos o período de uma safra, as variações que ocorrem no triângulo da doença são principalmente relacionadas às variações no ambiente, já que hospedeiro e patógeno exibem baixa variação nesse período de tempo. Dessa forma, havendo hospedeiro susceptível e patógeno virulento, é o ambiente que governa a velocidade de desenvolvimento de epidemias. As alterações que ocorrem no ambiente podem ter efeito favorável, desfavorável ou neutro em um patossistema (Velásquez et al. 2018). A temperatura, como um fator de grande relevância no ambiente que interfere em quase em todas as fases de uma doença, pode aumentar ou reduzir a resistência de plantas e a capacidade infectiva dos patógenos (Garrett et al. 2006). Cada um dos organismos de um patossistema apresenta faixas de temperaturas mínimas e máximas, abaixo e acima das quais ele não se desenvolve, além de uma faixa ótima onde o desenvolvimento é favorecido (Velásquez et al. 2018). A frequência de ocorrência de temperaturas em cada uma dessas faixas modula o desenvolvimento da doença.

A videira é uma cultura de grande relevância no Brasil e as cultivares Niagara Rosada e Cabernet Sauvignon figuram entre as mais plantadas. Niagara Rosada é a videira mais plantada no Estado de São Paulo, terceiro maior produtor de uvas do Brasil e, a Cabernet Sauvignon é a cultivar vinífera mais plantada no Rio Grande Sul, maior produtor de uvas do Brasil. As videiras têm seu desenvolvimento ótimo a 25 °C, resposta típica de planta C3 (Atwell, Kriedemann & Turnbull 1999; Greer & Weedon 2012). O aumento da temperatura em parreirais eleva os processos de trocas gasosas nas plantas, como fotossíntese e transpiração, mas reduz o peso dos

frutos (Martínez-Lüscher et al. 2015). O estresse térmico, por sua vez, leva à redução da fotossíntese (Luo et al. 2011; Greer & Weedon 2012; 2013) e ao acúmulo de açúcares solúveis nos frutos (Greer & Weedon 2013).

Dentre os obstáculos da viticultura está a ferrugem da videira, causada por *Neophysopella tropicalis* (= *Phakopsora euvitis*), fungo basidiomiceto que interfere na translocação de amido das folhas, provoca desfolha precoce e, consequentemente, reduz o acúmulo de reservas para as próximas safras (Nogueira-Júnior et al. 2017; Rasera et al. 2019). A faixa de temperatura de 20 a 25 °C é ideal para o desenvolvimento do patógeno e, o aumento da temperatura para 30 °C resulta em intensa redução na taxa de germinação *in vitro* dos seus esporos (Naruzawa 2006; Alves 2015). A relação de ferrugens com a temperatura também é variada, para *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem da soja, elevações da temperatura durante o dia, como 1 hora a 37 °C, podem atrasar ou até impedir totalmente o desenvolvimento da doença na cultura (Bonde et al. 2012). Entretanto, no caso de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, causador da ferrugem amarela do trigo, observou-se o surgimento de raças mais agressivas que possuem boa adaptação a temperaturas mais elevadas (Milus et al. 2008), o que indica que novas raças de patógenos causadores de ferrugem podem se adaptar a temperaturas mais elevadas e causar danos ainda mais graves.

Tratando-se de dois organismos vivos em uma relação patógeno-hospedeiro, o efeito da variação de fatores ambientais pode ter diferentes consequências, o que faz necessário o estudo da combinação de estresses abióticos e bióticos (Atkinson e Urwin 2012). A análise de lesão virtual, proposta por Bastiaans (1991), mostra o efeito do patógeno na assimilação de CO₂ da folha além dos limites das lesões visíveis (lesão visual), dando real dimensão sobre o impacto da doença na fotossíntese da planta. Áreas próximas a lesões, embora assintomáticas, podem apresentar fotossíntese reduzida e a relação entre lesão virtual e visual pode ser determinada experimentalmente pelo parâmetro β do modelo y = 1 - (1 - x)^{\beta}, onde y corresponde à proporção da folha fotossinteticamente ativa (com lesão virtual) e x, à proporção da folha lesionada (lesão visual). O uso dessa ferramenta em patossistemas sujeitos a variações de temperatura pode ser bastante esclarecedor. Para o caso de patógenos causadores de ferrugens, classificados como biotróficos, o valor de β da equação de lesão virtual, geralmente, varia entre 1 e 2, sendo a área afetada pelo patógeno muito próxima à área lesionada (Bassanezi et al. 2001; Lopes & Berger, 2001). Para a ferrugem da soja, em sua temperatura de desenvolvimento ideal, Kumudini et al. (2010) obtiveram valores entre 2,1 e 2,5. Entretanto, para N. tropicalis, já foram registrados valores de β altos, como 5,78 em videira Niagara Rosada (Nogueira-Júnior et al. 2017) e 5,93

em Moscato Giallo (Navarro et al. 2019), valores semelhantes ao obtido para patógenos necrotróficos (Bastiaans 1991; Garry et al. 1998; Bassanezi et al. 2001).

Uma relação tão complexa como um patossistema abrange intensa comunicação entre os organismos envolvidos, com mecanismos do patógeno que impeçam seu reconhecimento pela planta, como a liberação de efetores, e mecanismos de defesa e resposta da planta em percepção ao patógeno, ativando, por exemplo, vias hormonais (Swoden et al. 2017). Todos esses mecanismos variam em função das características do patógeno e suas fases. Assim, sabese que para patógenos biotróficos, a via hormonal de defesa da planta é a do ácido salicílico, que inclui o início da morte celular programada (Bari & Jones 2009). A variação de temperatura pode afetar esses mecanismos de forma variada, aumentando ou reduzindo sua concentração, tendo, assim, relação direta com a resistência de plantas a patógenos (Velásquez et al. 2018).

Com base na literatura e em estudos prévios realizados pela equipe de trabalho, a hipótese desse trabalho é de que a elevação da temperatura do ar, juntamente com a presença da ferrugem da videira, causada por *Neophysopella tropicalis* cause danos intensos à planta, mesmo que o ambiente não seja o ideal para o desenvolvimento do patógeno, tendo em vista que a combinação de estresses abiótico e biótico seja mais prejudicial do que a presença de um único estresse isolado. Portanto, para testar a hipótese estabelecida, foram feitas análises nas trocas gasosas em plantas sadias não inoculadas e inoculadas de duas espécies de videira, *Vitis labrusca* L. cv. Niagara Rosada e *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon para verificação do potencial da doença com o aumento da temperatura do ar.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Preparo e condução dos experimentos

Estacas de videira das cultivares Cabernet Sauvignon enxertadas sobre porta-enxerto 1103 Paulsen e Niagara Rosada enxertadas sobre porta-enxerto IAC-766, de aproximadamente 30 cm de altura, foram adquiridas de viveirista localizado no município de Poços de Caldas-MG. As estacas foram plantadas em vasos de plástico de 7 L, contendo 6 L de substrato esterilizado de uma mistura de terra argilosa, areia e esterco curtido e mantidas em casa-de-vegetação. As adubações foram realizadas mensalmente via solo. Os vasos foram irrigados, diariamente, com 200 mL de água por vaso.

Os tratamentos aplicados estão representados na Figura 1. As mudas foram mantidas em condições controladas de temperatura de 25 e 30 °C, em câmaras de crescimento (Conviron, Winnipeg, Canadá) com fotoperíodo de 12 h e radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de 400 μ mol m ⁻² s ⁻¹. Foram utilizadas cinco plantas (repetições) em cada tratamento.



Figura 1. Diagrama ilustrativo dos tratamentos a aplicados nos experimentos onde se avaliou as combinações de estresse biótico (inoculação com *Neophysopella tropicalis*) e abiótico (30 °C). Cada vaso representa uma repetição e cada experimento foi conduzido ao menos 2 vezes.

Para todos os experimentos que foram realizados, utilizou-se o mesmo padrão de inoculação de *Neophysopella tropicalis*, para que os resultados fossem comparáveis. Urediniósporos de origem monopustular foram coletados de folhas de mudas de Niagara Rosada mantidas em casas de vegetação especificamente para a manutenção de inóculo. A partir de urediniósporos coletados foram feitas suspensões, adicionando-se 50 mL de água destilada e Tween 20 a 0,01%. A concentração final de cada suspensão foi ajustada para 10⁵ urediniósporos/mL, com auxílio da câmara de Neubauer. Em cada planta, cinco folhas com mais de 20 dias após a brotação foram inoculadas em sua face abaxial, por aspersão da suspensão do inóculo com o auxílio de um compressor (Ferrari Mega Air CFA 7.6/241) até o ponto de escorrimento. No tratamento testemunha, cinco folhas foram aspergidas, em sua face abaxial, com água destilada. As plantas foram mantidas em câmara úmida e no escuro por 24 horas. Ao final do período de câmara úmida, as plantas permaneceram nas câmaras com temperaturas de 25 e 30 °C e fotoperíodo de 12 h.

3.2.2. Trocas gasosas de videiras infectadas com *Neophysopella tropicalis* e mantidas em diferentes temperaturas

A quarta folha completamente expandida (a partir da base da planta) foi utilizada para avaliação das trocas gasosas em todos os experimentos. As avaliações foram realizadas pelo menos uma vez por semana na mesma área foliar de 2 cm², sendo a primeira medida antes da inoculação e as seguintes aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação. A assimilação líquida de CO₂ (*A*), a condutância estomática (g_s), a concentração intercelular de CO₂ (C_i) e a transpiração (*E*), foram estimadas em folhas doentes e sadias utilizando um analisador portátil de gás infravermelho (LI-6400XT, LI-COR Inc. Lincoln, NE, EUA). A concentração de CO₂ no ar (Ca) durante as medições foi de 400 μ mol mol⁻¹ e as trocas gasosas foram medidas sob densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) de 1000 μ mol m⁻² s⁻¹. As áreas das folhas selecionadas para avaliações de trocas gasosas foram fotografadas e imagens digitais foram processadas com o software Quant (Vale et al. 2001) para estimar a severidade da doença em cada avaliação. Foi considerada como área doente, a área das urédias, o eventual halo amarelado que circundava as urédias e toda área necrosada presente na amostra.

3.2.3. Estimativas de lesão virtual (β) usando o modelo de Bastiaans

A severidade da doença nas áreas foliares onde se avaliou as trocas gasosas foi relacionada à taxa relativa de assimilação de CO_2 por regressão não linear, de acordo com o modelo de Bastiaans (1991):

(1)
$$P_x/P_0 = (1 - x)^{\beta}$$

onde Px é a taxa fotossintética líquida de uma folha com severidade de x ferrugem e Poé a taxa fotossintética média de folhas saudáveis. O valor β corresponde ao efeito da severidade da doença na área verde da folha adjacente à lesão. Os valores de gs, $Ci \in E$ foram transformados em proporções em relação ao valor médio de cada variável em folhas saudáveis (gs_x/gs_o , Ci_x/Ci_o e E_x/E_o) em todos os experimentos. O modelo de Bastiaans também foi usado para ajustar os dados de gs_x/gs_o , E_x/E_o e $PhiPS2_x/PhiPS2_o$ (variáveis dependentes) vs. severidade da doença (variável independente).

3.2.4. Análise estatística

A área abaixo das curvas das variáveis de trocas gasosas foi estimada para cada tratamento por integração trapezoidal. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores de lesão virtual foram estimados por regressões não-lineares, de acordo com o modelo de Bastiaans (1991), pelo software STATISTICA 7.0.

3.3. Resultados

3.3.1. Vitis labrusca cv. Niagara Rosada

Os valores calculados pela integração trapezoidal (AUC – area under the curve) para a severidade da ferrugem e para a densidade de lesões foram significativamente superiores em mudas mantidas a 25 °C em relação a mudas mantidas a 30 °C em ambos experimentos realizados (Tabela 1). Os valores para a taxa de assimilação de CO₂ (*A*) (Figura 2A-B; 3A-B) foram menores nas plantas inoculadas em ambas as temperaturas analisadas, exceto no experimento 1, no qual plantas inoculadas e mantidas a 30°C mostraram valor de área sob a curva de *A* semelhante ao da testemunha (Tabela 1). A condutância estomática (*gs*) (Figura 2C-D; 3C-D) foi menor nas plantas inoculadas somente em um dos experimentos a 25 °C, não diferindo os valores entre plantas sadias e inoculadas a 30 °C. Os valores de AUC para a concentração intercelular de CO₂ (*Ci*) (Figura 2E-F; 3E-F) de plantas inoculadas foram maiores do que em plantas sadias a 25 °C somente em um dos experimentos, não havendo diferença significativa a 30 °C (Tabela 1). A transpiração (*E*) (Figura 2G-H; 3G-H) foi maior conforme o aumento da temperatura, sem apresentar diferenças entre plantas sadias e inoculadas (Tabela 1).

Para 25 °C, os valores de *A* em plantas sadias (Figura 2A e B) variaram de 10,2 a 18,4 μ mol m⁻² s⁻¹, com uma média de 11,2 μ mol m⁻² s⁻¹ no primeiro experimento e variaram de 7 a 18 μ mol m⁻² s⁻¹, com uma média de 11 μ mol m⁻² s⁻¹ no segundo experimento. Os valores de *gs* em plantas sadias variaram de 0,05 a 0,43 mol m⁻² s⁻¹ (Figura 2C e D). Os valores médios de *Ci* (Figura 2E e F) e *E* (Figura 2G e H) em plantas sadias foram, respectivamente, 248 μ mol mol⁻¹ e 4,1 mmol m⁻² s⁻¹.

A 30 °C, os valores de *A* em plantas sadias (Figura 2A e B) variaram de 7 a 17,3 µmol $m^{-2} s^{-1}$, com uma média de 11 µmol $m^{-2} s^{-1}$ no primeiro experimento e variaram de 4 a 20 µmol $m^{-2} s^{-1}$, com uma média de 11,5 µmol $m^{-2} s^{-1}$ no segundo experimento. Os valores de *gs* em plantas sadias variaram de 0,04 a 0,5 mol $m^{-2} s^{-1}$ (Figura 2C e D). Os valores médios de *Ci* (Figura 2E e F) e *E* (Figura 2G e H) em plantas sadias foram, respectivamente, 224 µmol mol⁻¹ e 4 mmol $m^{-2} s^{-1}$.

Para 25 °C, os valores de *A* em plantas inoculadas (Figura 3A e B) mostraram decréscimo ao longo do tempo e variaram de 16,2 μ mol m⁻² s⁻¹, no início do experimento, a 0,63 μ mol m⁻² s⁻¹, ao final das avaliações, com uma média de 6,5 μ mol m⁻² s⁻¹ no primeiro experimentoNo segundo experimento, a taxa de assimilação de CO₂ variou de 20 a 0 μ mol m⁻² s⁻¹, com uma média de 6 μ mol m⁻² s⁻¹. Os valores de *gs* em plantas inoculadas também mostraram redução ao longo do tempo e variaram de 0,39 a 0 mol m⁻² s⁻¹ (Figura 3C e D). As variáveis *Ci*

(Figura 3E e F) e *E* (Figura 3G e H) mostraram menor variação ao longo do experimento e seus valores médios foram, respectivamente, 288 μ mol mol⁻¹ e 2,87 mmol m⁻² s⁻¹.

A 30 °C, os valores de *A* em plantas inoculadas também apresentaram redução ao longo do experimento (Figura 3A e B) e variaram de 15,3 μ mol m⁻² s⁻¹ a 1,43 μ mol m⁻² s⁻¹com média de 7,9 μ mol m⁻² s⁻¹ no primeiro experimento. No segundo experimento os valores variaram de 15,4 μ mol m⁻² s⁻¹ a 0,67 μ mol m⁻² s⁻¹, com uma média de 9,12 μ mol m⁻² s⁻¹. Os valores de *gs* em plantas inoculadas foram semelhantes aos dasplantas mantidas a 25 °C e variaram de 0,42 mol m⁻² s⁻¹ a 0,04 mol m⁻² s⁻¹ (Figura 3C e D). Os valores médios de *Ci* (Figura 3E e F) e *E* (Figura 3G e H) foram, respectivamente, 252 μ mol mol⁻¹ e 3,4 mmol m⁻² s⁻¹.

Tabela 1. Valores das áreas abaixo das curvas em videiras cv. Niagara Rosada sadias e inoculadas com *Neophysopella tropicalis* mantidas a 25 e 30 °C nos experimentos 1 e 2. Taxa de assimilação de CO₂ (*A*), condutância estomática (*gs*), concentração intercelular de CO₂ (*Ci*) e taxa de transpiração (*E*), eficiência quântica do fotossistema dois (*PhiPS2*), taxa de transporte de elétrons (*ETR*), severidade da ferrugem da videira (Sev) e densidade de lesões (Den).

Exp.	T°C	Condição	Α	gs	Ci	E	PhiPS2	Sev	Den
1	25	Inoculado	5,5 b	82,8 a	259,3 a	1,7 c	2 b	3,7 a	3972,4 a
		Sadio	10,9 a	101,2 a	201,9 b	2,1 bc	3,2 a	-	-
	30	Inoculado	8,8 a	105,9 a	240,4 ab	3,1 ab	2,8 a	1,3 b	1619,7 b
		Sadio	11,2 a	159,7 a	247,1 a	4,1 a	3,1 a	-	-
2	25	Inoculado	3,6 C	58,1 B	153,4 A	1,6 B	1 B	7,8 A	3107,1 A
		Sadio	6,2 AB	152,8 A	155,6 A	1,7 B	1,8 A	-	-
	30	Inoculado	5,7 BC	61,6 B	157,8 A	2,3 AB	1,4 AB	3,5 B	1567 B
		Sadio	8 A	76,6 AB	139,7 A	2,6 A	1,6 AB	-	-

Teste de Tukey: letras diferentes na coluna indicam valores que diferem significativamente entre si em cada experimento. Tamanhos diferentes correspondem a experimentos diferentes. Dados processados pelo software R. Unidades: A (mol de CO_2/m^2), gs (kmol de H_2O/m^2), Ci (mol de CO_2 /mol.s), E (kmol de H_2O/m^2), PhiPS2 (por dia), ETR (mol elétrons/m²), Sev (por dia) e Den (n° de pústulas/cm². dia).



Figura 2. Taxa de assimilação de CO₂ (*A*), condutância estomática (*gs*), concentração intercelular de CO₂ (*Ci*) e taxa de transpiração (*E*) nos experimentos 1 (A, C, E e G) e 2 (B, D, F e H) em folhas de videira cv. Niagara Rosada aspergidas com água (sadias) mantidas em diferentes temperaturas (25 e 30 °C) ao longo do tempo. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média (n=5 em ambos os experimentos). DAI=dias após a inoculação.



Figura 3. Taxa de assimilação de CO₂ (*A*), condutância estomática (*gs*), concentração intercelular de CO₂ (*Ci*) e taxa de transpiração (*E*) nos experimentos 1 (A, C, E e G) e 2 (B, D, F e H) em folhas de videira cv. Niagara Rosada inoculadas com *Neophysopella tropicalis* mantidas em diferentes temperaturas (25 e 30 °C) ao longo do tempo. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média (n=5 em ambos os experimentos). Linhas vermelhas marcam o aparecimento dos sintomas de ferrugem. DAI=dias após a inoculação.

A redução nas taxas relativas de assimilação de CO₂ foi maior a 25 °C do que a 30 °C nos dois experimentos (Figuras 4A-B). Houve redução de 50% na taxa relativa de *A* nos primeiros sete dias em ambos os experimentos a 25 °C (Figura 4A-B). A 30 °C houve queda de 20% nos mesmos primeiros sete dias e a relação se manteve aproximandamente constante, pois, nesse caso, houve redução na taxa de assimilação de CO₂ tanto em plantas inoculadas como em plantas sadias (Figura 4A-B). As taxas relativas para condutância estomática (Figuras 4C-D) e transpiração (Figuras 4G-H) também apresentaram queda gradativa ao longo do tempo nas plantas incubadas a 25 e a 30°C. As taxas relativas da concentração intercelular de CO₂ mostraram aumento nos primeiros dias e redução ao final das avaliações nas plantas incubadas a 25 °C (Figuras 4E-F). Menor variação foi observada nas taxas relativas da concentração intercelular de CO₂ em plantas mantidas a 30 °C (Figuras 4E-F).



Figura 4. Dados relativos (inoculado/sadio) de taxa de assimilação de $CO_2(A)$, condutância estomática (*gs*), concentração intercelular de $CO_2(Ci)$ e taxa de transpiração (*E*) nos experimentos 1 (A, C, E e G) e 2 (B, D, F e H) em folhas de videira cv. Niagara Rosada mantidas em diferentes temperaturas (20, 25 e 30 °C) ao longo do tempo. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média (n=5 em ambos os experimentos). Linhas vermelhas marcam o aparecimento dos sintomas de ferrugem. DAI=dias após a inoculação.

A eficiência quântica efetiva do fotossistema 2 (Figura 5) foi reduzida com a presença do patógeno a 25 °C, não havendo diferença estatística nos demais tratamentos (Tabela 1). As taxas relativas da eficiência quântica apresentaram redução ao longo do tempo a 25 °C, ficando entre 0-0,4 ao final dos experimentos (Figura 5E-F). A 30 °C, houve redução na taxa relativa da eficiência quântica no primeiro experimento, mas essa variável se mostrou constante e próxima a 1 ao longo do segundo experimento (Figura 5E-F).



Figura 5. Eficiência quântica do fotossistema 2 (*PhiPS2*) em folhas de videira cv. Niagara Rosada sadias (A e B) e inoculadas com *Neophysopella tropicalis* (C e D) e dados relativos (inoculado/sadio) de eficiência quântica do fotossistema 2 (*PhiPS2*) nos experimentos 1 (A, C e E) e 2 (B, D e F) mantidas em diferentes temperaturas (25 e 30 °C) ao longo do tempo. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média (n=5 em ambos os experimentos). Linhas vermelhas marcam o aparecimento dos sintomas de ferrugem. DAI=dias após a inoculação.
Com o modelo de lesão virtual de Bastiaans foi observada uma diminuição acentuada na taxa de assimilação de CO₂ relativa, mesmo com baixa severidade da ferrugem (Figura 6). Os valores do parâmetro β , estimados pelo modelo de Bastiaans, foram 5,36 a 25 °C e 4,13 a 30 °C. Pelo modelo estimou-se que houve reduções de 70% e 60% na assimilação de CO₂ com uma severidade de ferrugem de 20%, a 25 e 30 °C, respectivamente.



Figura 6. A-B. Relação entre a taxa fotossintética relativa (*Px/Po*) e a severidade de ferrugem (*Neophysopella tropicalis*) em folhas de videira cv. Niagara Rosada mantidas a 25 °C (A) e 30 °C (B). Os círculos pretos representam os dados do primeiro experimento e os círculos brancos os dados do segundo experimento. A linha representa o modelo $y = (1 - x)^{\beta}$.

A eficiência do uso da água (EUA) foi maior em plantas sadias a 25 °C em relação aos demais tratamentos (Figura 7; Tabela 2). O coeficiente angular (Tabela 2) das curvas de EUA (Figuras 7) foi maior em mudas sadias a 25 °C e houve uma redução de 50% em mudas inoculadas. Em mudas sadias a 30 °C a redução, em comparação a 25 °C, foi de 74,5%, e mudas inoculadas apresentaram redução de 16% em relação às sadias na mesma temperatura.



Figura 7. Eficiência do uso da água (EUA) de videiras cv. Niagara Rosada sadias (A-B) e inoculadas com *Neophysopella tropicalis* (C-D) mantidas a 25 (A e C) e 30 °C (B e D).

Tabela 2. Coefficiente angular das curvas de enciencia do uso da agua.						
Condição	EUA(µmol CO2 mmol H2O ⁻¹)					
Inoculada	3,16					
Sadia	6,44					
Inoculada	1,45					
Sadia	1,65					
	Condição Inoculada Sadia Inoculada Sadia					

Tabela 2. Coeficiente angular das curvas de eficiência do uso da água.

3.3.2. Vitis vinifera cv. Cabernet Sauvignon

Os valores calculados pela integração trapezoidal (AUC – area under the curve) para a severidade da ferrugem e para a densidade de infecção foram significativamente superiores em mudas mantidas a 25 °C em relação a mudas mantidas a 30 °C somente no segundo experimento, no qual a severidade da ferrugem nas plantas mantidas a 30 °C foi próxima a zero (Tabela 3). Curiosamente, nesse experimento não houve diferença entre os tratamentos nos valores acumulados de taxa de assimilação de CO₂ (*A*), condutância estomática (*gs*) e concentração intercelular de CO₂ (*Ci*) (Tabela 3). No primeiro experimento, os valores de *A* (Figura 8A-B; 9A-B) foram menores nas plantas inoculadas do que nas plantas sadias e mantidas a 25° C (Tabela 3). Os valores de *A* nas plantas inoculadas a 30° C no primeiro

experimento não diferiram daqueles das plantas mantidas a 25 °C, mas também não diferiram das plantas sadias (Tabela 3). A condutância estomática (*gs*) (Figura 8C-D; 9C-D) foi menor nas plantas inoculadas somente a 25 °C, não diferindo os valores entre plantas sadias e inoculadas a 30 °C. Os valores de AUC para a concentração intercelular de CO₂ (*Ci*) (Figura 8E-F; 9E-F) foram iguais em todos os tratamentos (Tabela 3). A transpiração (*E*) (Figura 8G-H; 9G-H) foi maior conforme o aumento da temperatura, sem apresentar diferenças entre plantas sadias e inoculadas (Tabela 3).

Para 25 °C, os valores de *A* em plantas sadias (Figura 8A e B) variaram de 5,3 a 11,7 μ mol m⁻² s⁻¹, com uma média de 8,4 μ mol m⁻² s⁻¹ no primeiro experimento e variaram de 5,6 a 15 μ mol m⁻² s⁻¹, com uma média de 10,7 μ mol m⁻² s⁻¹ no segundo experimento. Os valores de *gs* em plantas sadias variaram de 0,04 a 0,17 mol m⁻² s⁻¹ (Figura 8C e D). Os valores médios de *Ci* (Figura 8E e F) e *E* (Figura 8G e H) em plantas sadias foram, respectivamente, 215,3 μ mol mol⁻¹ e 1,35 mmol m⁻² s⁻¹.

A 30 °C, os valores de *A* em plantas sadias (Figura 8A e B) variaram de 1 a 13 μ mol m⁻² s⁻¹, com uma média de 7,9 μ mol m⁻² s⁻¹ no primeiro experimento e variaram de 7 a 18 μ mol m⁻² s⁻¹, com uma média de 12,5 μ mol m⁻² s⁻¹ no segundo experimento. Os valores de *gs* em plantas sadias variaram de 0,02 a 0,16 mol m⁻² s⁻¹ (Figura 8C e D). Os valores médios de *Ci* (Figura 8E e F) e *E* (Figura 8G e H) em plantas sadias foram, respectivamente, 225,3 μ mol mol⁻¹ e 2 mmol m⁻² s⁻¹.

Para 25 °C, os valores de *A* em plantas inoculadas (Figura 9A e B) mostraram decréscimo ao longo do tempo e variaram de 11 µmol m⁻² s⁻¹, no início do experimento, a 0 µmol m⁻² s⁻¹, ao final das avaliações, com uma média de 5,49 µmol m⁻² s⁻¹ no primeiro experimento. No segundo experimento, a taxa de assimilação de CO₂ variou de 14,4 a 3,2 µmol m⁻² s⁻¹, com uma média de 9,6 µmol m⁻² s⁻¹. Os valores de *gs* em plantas inoculadas também mostraram redução ao longo do tempo e variaram de 0,13 a 0 mol m⁻² s⁻¹ (Figura 9C e D). As variáveis *Ci* (Figura 9E e F) e *E* (Figura 9G e H) mostraram menor variação ao longo do tempo e seus valores médios foram, respectivamente, 221,4 µmol mol⁻¹ e 0,97 mmol m⁻² s⁻¹.

A 30 °C, os valores de *A* em plantas inoculadas também apresentaram redução ao longo do experimento (Figura 9A e B) e variaram de 13,7 a 0 μ mol m⁻² s⁻¹, com média de 7,25 μ mol m⁻² s⁻¹ no primeiro experimento. No segundo experimento os valores variaram de 17 a 7 μ mol m⁻² s⁻¹, com média de 12,5 μ mol m⁻² s⁻¹. Os valores de *gs* em plantas inoculadas foram semelhantes aos das plantas mantidas a 25 °C e variaram de 0,21 a 0 mol m⁻² s⁻¹ (Figura 9C e D). Os valores médios de *Ci* (Figura 9E e F) e *E* (Figura 9G e H) foram, respectivamente, 215,4 μ mol mol⁻¹ e 1,92 mmol m⁻² s⁻¹.

Tabela 3. Valores das áreas abaixo das curvas em videiras cv. Cabernet Sauvignon sadias e inoculadas com *Neophysopella tropicalis* mantidas a 25 e 30 °C nos experimentos 1 e 2. Taxa de assimilação de CO2 (A), condutância estomática (gs), concentração intercelular de CO₂ (*Ci*) e taxa de transpiração (*E*), eficiência quântica do fotossistema dois (*PhiPS2*), taxa de transporte de elétrons (*ETR*), severidade da ferrugem da videira (Sev) e densidade de lesões (Den).

Exp.	$T^{\circ}C$	Condição	Α	gs	Ci	Ε	PhiPS2	Sev	Den
1	25	Inoculado	6,4 b	61,9 b	244,96 a	1,12 b	2 b	2,6 a	377,6 a
		Sadio	9,5 a	95,89 a	244,51 a	1,5 ab	2,59 ab	-	-
	30	Inoculado	8,4 ab	84,88 ab	238,29 a	2,13 a	2,53 ab	3,25 a	669 a
		Sadio	9,15 a	78,85 ab	254 a	2,27 a	3,01 a	-	-
2	25	Inoculado	11,2 A	114 A	250,3 A	2,1 B	3,8 A	0,65 A	321,4 A
		Sadio	12,8 A	150 A	286,7 A	2,6 B	3,3 A	-	-
	30	Inoculado	14,6 A	164 A	266,6 A	4,1 A	3,8 A	0 B	1,8 B
		Sadio	14,1 A	156 A	251,5 A	3,9 A	3,2 A	-	-

Teste de Tukey: letras diferentes na coluna indicam valores que diferem significativamente entre si em cada experimento. Tamanhos diferentes correspondem a experimentos diferentes. Dados processados pelo software R. Unidades: A (mol de CO2/m²), gs (kmol de H2O/m²), Ci (mol de CO2 /mol.s), E (kmol de H2O/m²), PhiPS2 (por dia), ETR (mol elétrons/m²), Sev (por dia) e Den (n° de pústulas/cm². dia).



Figura 8. Taxa de assimilação de CO₂ (*A*), condutância estomática (*gs*), concentração intercelular de CO₂ (*Ci*) e taxa de transpiração (*E*) nos experimentos 1 (A, C, E e G) e 2 (B, D, F e H) em folhas de videira cv. Cabernet Sauvignon aspergidas com água (sadias) mantidas em diferentes temperaturas (25 e 30 °C) ao longo do tempo. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média (n=5 em ambos os experimentos). DAI=dias após a inoculação.



Figura 9. Taxa de assimilação de CO₂ (*A*), condutância estomática (*gs*), concentração intercelular de CO₂ (*Ci*) e taxa de transpiração (*E*) nos experimentos 1 (A, C, E e G) e 2 (B, D, F e H) em folhas de videira cv. Cabernet Sauvignon inoculadas com *Neophysopella tropicalis* mantidas em diferentes temperaturas (25 e 30 °C) ao longo do tempo. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média (n=5 em ambos os experimentos). Linhas vermelhas marcam o aparecimento dos sintomas de ferrugem. DAI=dias após a inoculação.

A relação inoculado/sadio de *A*, *gs* e *E* foi diferente de 1 somente a 25 °C, mantendo-se próximo a 1 a 30 °C ao longo de todo o experimento (Figura 10A-D; G-H). De maneira semelhante a cv. Niagara Rosada, a 30 °C houve aumento no início dos experimentos e posterior redução na taxa de fotossíntese de maneira simultânea em plantas sadias e inoculadas, causando a relação mais alta. O *Ci* relativo teve o mesmo comportamento nas duas temperaturas, mantendo-se próximo ou maior que 1 (Figura 10E-F).



Figura 10. Dados relativos (inoculado/sadio) de taxa de assimilação de $CO_2(A)$, condutância estomática (*gs*), concentração intercelular de $CO_2(Ci)$ e taxa de transpiração (*E*) nos experimentos 1 (A, C, E e G) e 2 (B, D, F e H) em folhas de videira cv. Cabernet Sauvignon mantidas em diferentes temperaturas (20, 25 e 30 °C) ao longo do tempo. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média (n=5 em ambos os experimentos). Linhas vermelhas marcam o aparecimento dos sintomas de ferrugem. DAI=dias após a inoculação.

Não houve diferença entre a eficiência quântica efetiva do fotossistema 2 dos diferentes tratamentos (Figura 11; Tabela 3), o que pode ser visualizado pela relação inoculado/sadio próxima a 1 para 25 e 30 °C ao longo de todo o experimento (Figura 11E-F).



Figura 11. Eficiência quântica do fotossistema 2 (*PhiPS2*) em folhas de videira cv. Cabernet Sauvignon (A e B) e inoculadas com *Neophysopella tropicalis* (C e D) e dados relativos (inoculado/sadio) de eficiência quântica do fotossistema 2 (*PhiPS2*) nos experimentos 1 (A, C e E) e 2 (B, D e F) mantidas em diferentes temperaturas (25 e 30 °C) ao longo do tempo. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média (n=5 em ambos os experimentos). Linhas vermelhas marcam o aparecimento dos sintomas de ferrugem. DAI=dias após a inoculação.

Com o modelo de lesão virtual de Bastiaans foi observada uma diminuição acentuada na taxa de assimilação de CO₂ relativa, mesmo com baixa severidade da ferrugem (Figura 12), principalmente a 25 °C (Figura 12A). Os valores do parâmetro β , estimados pelo modelo de Bastiaans, foram 4,33 a 25 °C e 2,16 a 30 °C. Pelo modelo estimou-se que houve reduções de 62% e 38% na assimilação de CO₂ com uma severidade de ferrugem de 20%, a 25 e 30 °C, respectivamente.



Figura 12. A-B. Relação entre a taxa fotossintética relativa (*Px/Po*) e a severidade de ferrugem (*Neophysopella tropicalis*) em folhas de videira cv. Cabernet Sauvignon mantidas a 25 °C (A) e 30 °C (B). Os círculos pretos representam os dados do primeiro experimento e os círculos brancos os dados do segundo experimento. A linha representa o modelo $y = (1 - x)^{\beta}$.

A eficiência do uso da água (EUA) mostrou-se maior em plantas sadias a 25 °C (Figuras 13; Tabela 4). O coeficiente angular (Tabela 4) das curvas de EUA (Figura 13) foi maior em mudas sadias a 25 °C e houve uma redução de 18% em mudas inoculadas. Em mudas sadias a 30 °C a redução, em comparação a 25 °C, foi de 35% e mudas inoculadas a 30 °C apresentaram redução de 27% em relação às sadias mantidas na mesma temperatura.



Figura 13. Eficiência do uso da água (EUA) de videiras cv. Cabernet Sauvignon sadias (A-B) e inoculadas com *Neophysopella tropicalis* (C-D) mantidas a 25 (A e C) e 30 °C (B e D).

T°C	Condição	EUA(µmol CO2 mmol H2O ⁻¹)
25	Inoculada	5,46
25	Sadia	6,63
20	Inoculada	3,19
	Sadia	4,36

Tabela 4. Coeficiente angular das curvas de eficiência do uso da água.

3.4. Discussão

A literatura aborda diferentes tipos de respostas fisiológicas de videiras como consequência da elevação de temperatura do ar (Luo et al. 2011; Greer & Weedon 2012; Greer & Weedon 2013; Martínez-Lüscher et al. 2015). Essa diversidade de respostas se deve à variação das condições experimentais que empregam tratamentos de alta temperatura num curto prazo, como aqui analisados (Luo et al. 2011; Martínez-Lüscher et al. 2015) em comparação a estudos de plantas cultivadas em ambiente de altas temperaturas (Greer & Weedon 2012; Greer & Weedon 2013). Independentemente dessa divergência, sabe-se que a temperatura ideal para a fotossíntese de videiras no campo e em ambiente controlado é de 25 °C e está de acordo com

a resposta típica de planta C3 (Atwell, Kriedemann & Turnbull 1999; Greer & Weedon 2012). Nos experimentos aqui descritos, plantas mantidas a 25 °C apresentaram taxas de assimilação de CO₂ semelhantes às das plantas mantidas a 30 °C, independentemente da cultivar de videira.

A eficiência do uso da água, relação entre a taxa de assimilação de CO_2 e taxa de transpiração, geralmente é maior em condições de déficit hídrico, sendo estratégia de defesa da planta, que reduz sua transpiração em resposta à falta de água (Du et al. 2008). A elevação da temperatura provoca aumento na transpiração (Greer & Weedon 2012), como aqui observado e assim, há grande redução na EUA, como foi possível observar a 30 °C. Quando comparamos os coeficientes angulares das curvas de EUA, o melhor valor é registrado em plantas sadias a 25 °C. A redução nessa variável foi maior com o aumento da temperatura para 30 °C em plantas sadias do que com a presença do patógeno a 25 °C.

De maneira semelhante à ferrugem do feijoeiro comum (Bassanezi et al., 2002) e ao que foi documentado para ferrugem da videira a 25 °C (Nogueira-Júnior et al. 2017), nas duas temperaturas analisadas (25 e 30 °C) houve baixa relação entre gs e E vs. severidade da doença, não sendo observado aumento nessas variáveis em plantas inoculadas, demonstrando o leve efeito do patógeno na resistência estomática. Dessa forma, a redução nos coeficientes angulares de EUA em plantas inoculadas foi resultado do efeito do patógeno na taxa de assimilação de CO₂ e não na transpiração, como em plantas sadias a 30 °C.

O efeito da presença do patógeno nas trocas gasosas foi evidente, principalmente a 25 °C, temperatura ótima para o desenvolvimento do patógeno, na qual se obteve a maior severidade da doença. Nos dois experimentos realizados com a cultivar Niagara Rosada, e em um dos experimentos realizados com Cabernet Sauvignon, foi observada a redução da taxa de assimilação de CO₂ de plantas inoculadas quando comparadas às sadias na temperatura de 25 °C. Isso porque o fungo *Neophysopella tropicalis* danifica o aparato fotossintético de videiras (Nogueira-Júnior et al. 2017; Rasera et al. 2019).

O dano na taxa de assimilação de CO₂ nas folhas de videiras cv. Niagara Rosada e cv. Cabernet Sauvignon nas duas temperaturas estudadas foi causado pelos efeitos do patógeno nos tecidos verdes, sem sintomas, que circundam as pústulas, quantificados pelo parâmetro β . Para ferrugens, valores β maiores que 2 são incomuns, Kumudini et al. (2010) obtiveram valores de β de 2,1 a 2,5 para *Phakopsora pachyrhizi* em soja, mesmo com os graves danos que são causados à cultura. Os valores de β obtidos nos nossos ensaios, de 5,36 e 4,13 para 25 e 30 °C respectivamente, em cv. Niagara Rosada e, de 4,33 e 2,16 para 25 e 30 °C respectivamente, em cv. Cabernet Sauvignon, tiveram a magnitude de dano semelhante ao causado por patógenos necrotróficos ou hemibiotróficos. Alves (2015) observou que a 30 °C há um menor período de latência e alta severidade, composta por baixo número de pústulas e intensa necrose.

A concentração intercelular de CO₂ manteve-se igual em todos os tratamentos aqui estudados. Esse processo elimina a hipótese de que a redução da fotossíntese se deve a limitação estomática (Dias & Brüggemann 2010; Carretero et al. 2011; Wang et al. 2012). De fato, Nogueira-Júnior et al. (2017) verificaram que a condutância de CO₂ no mesofilo foi o fator mais afetado na presença de *N. tropicalis*, bem como o transporte aparente de elétrons através do fotossistema 2, o que pode ser causado pelo dano e destruição de cloroplastos na região da lesão (Scholes & Rolfe 1996; Nogueira-Júnior et al. 2017; Rasera et al. 2019). Neste trabalho, observou-se esse processo em Niagara Rosada a 25 °C, entretanto, não foi possível observar diferenças estatísticas nos demais tratamentos quanto à eficiência quântica do fotossistema 2.

Houve alta variabilidade nos valores de trocas gasosas obtidos para cada tratamento neste trabalho. Essa variabilidade nos dados é decorrente de limitações presentes no estabelecimento e execução dos experimentos. Todos os experimentos foram realizados em câmaras de crescimento, que possuem limitação espacial, determinando um número máximo de mudas (repetições) por tratamento. Além disso, o aparelho utilizado para a realização de medidas de trocas gasosas e as análises em si possuem limite de tempo, pois o ideal é que as medidas sejam feitas nas mesmas condições e momento do dia. Dessa forma, foi preciso buscar o melhor número de repetições para se adequar a essa situação.

2.5. Conclusões

As análises indicaram que não houve diferença nas trocas gasosas de plantas sadias mantidas em temperatura diferentes, com exceção da transpiração, que aumentou a 30 °C, o que afetou diretamente a eficiência do uso da água. A presença do patógeno *Neophysopella tropicalis* reduziu drasticamente a fotossíntese na cv. Niagara Rosada a 25 °C, corroborando ao que está documentado para a temperatura ótima de desenvolvimento do patógeno. A 30 °C, a menor severidade da ferrugem, em comparação a 25 °C, resultou em menores valores de beta e um menor efeito do patógeno na fotossíntese da videira. Na cv. Cabernet Sauvignon, o efeito do patógeno em suas trocas gasosas foi menor que em Niagara Rosada, reforçando a maior susceptibilidade desta cultivar.

Referências

- Alves, R. F. 2015. Ferrugem da videira: Preservação de urediniósporos de *Phakopsora euvitis* e fatores relacionados à infecção do hospedeiro. Piracicaba, Universidade de São Paulo (dissertação de mestrado).
- Angelotti, F.; Scapin, C. R.; Tessmann, D. J.; Vida, J. B.; Vieira, R. A.; Souto, E. R. 2008. Resistência de genótipos de videira à ferrugem. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 43(9), 1129-1134.
- Atkinson, N. J. & Urwin, P. E. 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. Journal of experimental botany, 63(10), 3523-3543.
- Atwell, B. J.; Kriedemann, P. E. & Turnbull, C. G. N. 1999. Plants in Action: Adaptation in Nature Performance in Cultivation. MacMillan Publishers, South Yarra, Australia.
- Bari, R. & Jones, J. D. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. Plant molecular biology, 69(4), 473-488.
- Bassanezi, R. B.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Hau, B. & Berger, R. D. 2001. Accounting for photosynthetic efficiency of bean leaves with rust, angular leaf spot and anthracnose to assess crop damage. Plant Pathology, 50, 443–452.
- Bassanezi, R. B.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A. & Berger, R. D. 2002. Gas exchange and emission chlorophyll fluorescence during the monocycle of rust, angular leaf spot and anthracnose on bean leaves as a function of their trophic characteristics. Journal of Phytopathology. 150, 37–47.
- Bastiaans, L. 1991. Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due leaf blast. Phytopathology 81, 611–615.
- Bonde, M. R.; Nester, S. E. & Berner, D. K. 2012. Effects of daily temperature highs on development of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean. Phytopathology, 102(8), 761-768.
- Carretero, R.; Bancal, M. O.; Miralles, D. J. 2011. Effect of leaf rust (*Puccinia triticina*) on photosynthesis and related processes of leaves in wheat crops grown at two contrasting sites and with different nitrogen levels. European Journal of Agronomy, 5:237-246.
- Dias, M. C. & Brüggemann, W. 2010. Limitations of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* under drought stress: gas exchange, chlorophyll fluorescence and Calvin cycle enzymes. Photosynthetica, 48(1), 96-102.
- Du, T.; Kang, S.; Zhang, J.; Li, F. & Yan, B. 2008. Water use efficiency and fruit quality of table grape under alternate partial root-zone drip irrigation. Agricultural water management, 95(6), 659-668.

- Garrett, K. A.; Dendy, S. P.; Frank, E. E.; Rouse, M. N.; Travers, S. E. 2006 Climate change effects on plant disease: genomes to ecosystems. Annual Review of Phytopathology 44: 489–509.
- Garry, G.; Jeuffroy, M. H.; Ney, B. & Tivoli, B. 1998. Effects of Aschochyta blight (*Mycosphaerella pinodes*) on the decrease in photosynthesizing leaf area and the photosynthetic efficiency of the green leaf area of dried-pea (*Pisum sativum*). Plant Pathology 47, 473–479.
- Greer, D. H. & Weedon, M. M. 2012. Modelling photosynthetic responses to temperature of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Semillon) leaves on vines grown in a hot climate. Plant, Cell & Environment, 35(6), 1050-1064.
- Greer, D. H. 2013. The impact of high temperatures on *Vitis vinifera* cv. Semillon grapevine performance and berry ripening. Frontiers in plant science, 4, 491.
- Kumudini, S.; Godoy, C. V.; Kennedy, B.; Prior, E.; Omielan, J.; Boerma, H. R.; et al. 2010.Role of host-plant resistance and disease development stage on leaf photosynthetic competence of soybean rust infected leaves. Crop Science. 50, 2533–2542.
- Lopes, D. B., and Berger, R. D. 2001. The effects of rust and anthracnose on the photosynthetic competence of diseased bean leaves. Phytopathology 91:212-220
- Luo, H. B.; Ma, L.; Xi, H. F.; Duan, W.; Li, S. H.; Loescher, W.; et al. 2011. Photosynthetic responses to heat treatments at different temperatures and following recovery in grapevine (*Vitis amurensis* L.) leaves. PLoS one, 6(8).
- Martínez-Lüscher, J.; Morales, F., Sánchez-Díaz, M.; Delrot, S.; Aguirreolea, J.; Gomès, E. & Pascual, I. 2015. Climate change conditions (elevated CO₂ and temperature) and UV-B radiation affect grapevine (*Vitis vinifera* cv. Tempranillo) leaf carbon assimilation, altering fruit ripening rates. Plant Science, 236, 168-176.
- Milus, E. A.; Kristensen, K. & Hovmøller, M. S. 2009. Evidence for increased aggressiveness in a recent widespread strain of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* causing stripe rust of wheat. Phytopathology, 99(1), 89-94.
- Naruzawa, E. S.; Celoto, M. I.; Papa, M. F.; Tomquelski, G. V. & Boliani, A. C. 2006. Estudos epidemiológicos e controle químico de Phakopsora euvitis. Fitopatologia Brasileira, 31(1), 41-45.
- Navarro, B. L.; Nogueira-Júnior, A.; Ribeiro, R. V. & Spósito, M. B. 2019. Photosynthetic damage caused by grapevine rust (*Phakopsora euvitis*) in *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*. Australasian Plant Pathology, 48(5), 509-518.

- Nogueira Júnior, A. F.; Ribeiro, R. V.; Appezzato-da-Glória, B.; Soares, M. K. M.; Rasera, J.
 B.; Amorim, L. 2017. *Phakopsora euvitis* causes unusual damage to leaves and modifies carbohydrate metabolism in grapevine. Frontiers in plant science, 8, 1675.
- Pollock, C. J. 1990. The response of plants to temperature change. The Journal of Agricultural Science, 115(1), 1-5.
- Rasera, J. B.; Amorim, L.; Marques, J. P. R.; Soares, M. K. M. & Appezzato-da-Glória, B.
 2019. Histopathological evidences of early grapevine leaf senescence caused by *Phakopsora euvitis* colonisation. Physiological and Molecular Plant Pathology, 108, 101434.
- Scholes, J. D. & Rolfe, S. A. 1996. Photosynthesis in localized regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. Planta. 199:573-582.
- Soar, C. J.; Collins, M. J. & Sadras, V. O. 2009. Irrigated Shiraz vines (*Vitis vinifera*) upregulate gas exchange and maintain berry growth in response to short spells of high maximum temperature in the field. Functional Plant Biology, 36: 801–814.
- Sowden, R. G.; Watson, S. J. & Jarvis, P. 2017. The role of chloroplasts in plant pathology. Essays in biochemistry, 62(1), 21-39.
- Stevens, R.B. 1960. Cultural practices in disease control. In Plant Pathology: An Advanced Treatise, volume III: The Diseases Population Epidemics and Control, J.G. Horsfall, ed. (London: Academic Press Inc.), pp. 357-429.
- Vale, F. X. R.; Fernandes Filho, E. I. F.; and Liberato, J. R. 2001. QUANT a software for plant disease severity assessment, in Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology (Christchurch).
- Velásquez, A. C.; Castroverde, C. D. M. & He, S. Y. 2018. Plant–pathogen warfare under changing climate conditions. Current Biology, 28(10), R619-R634.
- Wang, Z. X; Chen, L.; Ai, J.; Qin, H. Y.; Liu, Y. X.; Xu, P. L.; ... & Zhang, Q. T. 2012. Photosynthesis and activity of photosystem II in response to drought stress in Amur Grape (*Vitis amurensis* Rupr.). Photosynthetica, 50(2), 189-196.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este trabalho, foi possível determinar que a faixa ótima para o processo de prépenetração do fungo causador da ferrugem asiática da videira *Neophysopella tropicalis* é de 20 a 30 °C. O estresse abiótico causado pela temperatura de 30 °C exacerba os efeitos da ferrugem na cv. Niagara Rosada, pois apesar de o patógeno provocar menor número de lesões e a planta apresentar mecanismos de defesa, limitando a expansão do patógeno, a severidade final da doença é similar àquela de plantas inoculadas e mantidas a 25 °C. Os valores de severidade e densidade de lesões na cv. Cabernet Sauvignon indicam a maior susceptibilidade da cv. Niagara Rosada à doença.

Os dados de trocas gasosas reforçam o efeito negativo do patógeno a 25 °C, temperatura ideal para o seu desenvolvimento. Entretanto, a 30 °C, não houve diferença estatística entre os valores obtidos para as mudas inoculadas e não inoculadas, e o comportamento das trocas gasosas das plantas nessas condições seguiu um padrão semelhante. Essa contradição entre os dados médios de severidade final de folhas de videira Niagara Rosada a 30 °C e o menor efeito do patógeno nas trocas gasosas das plantas nessa mesma temperatura indica que a alta severidade final é resultado tanto de lesões causadas pelo fungo como do efeito negativo da temperatura.

Mesmo não havendo diferença significativa entre as trocas gasosas das plantas sadias mantidas a 25 e 30 °C, a elevação na temperatura teve impacto na redução da eficiência do uso da água com a elevação da temperatura em ambas as cultivares, de maneira mais intensa em Niagara Rosada.

Portanto, mesmo a temperatura de 30 °C não sendo a ideal para o desenvolvimento do patógeno, a combinação de estresses abiótico e biótico se mostrou tão prejudicial quanto a ocorrência de um estresse isolado em folhas da cv. Niagara Rosada.