

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DO
ATAQUE DA PÉROLA-DA-TERRA, *Eurhizococcus brasiliensis* (WILLE, 1922)
(HEMIPTERA: MARGARODIDAE), EM VIDEIRAS

Marcelo Zart
Mestre em Agronomia/UNESP

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Ênfase Horticultura

Porto Alegre (RS), Brasil
Julho de 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Zart, Marcelo
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA E
BIOQUÍMICA DO ATAQUE DA PÉROLA-DA-TERRA,
Eurhizococcus brasiliensis (WILLE, 1922) (HEMIPTERA:
MARGARODIDAE), EM VIDEIRAS / Marcelo Zart. -- 2012.
98 f.

Orientador: Paulo Vitor Dutra de Souza.
Coorientador: Henrique Pessoa dos Santos.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Manejo Integrado de Pragas. 2. Fruticultura.
3. Porta-enxerto. 4. Interação inseto-planta. 5.
Fotossíntese. I. Souza, Paulo Vitor Dutra de, orient.
II. Santos, Henrique Pessoa dos, coorient. III.
Título.

MARCELO ZART
Engenheiro Agrônomo - UFPel
Mestre em Agronomia - UNESP

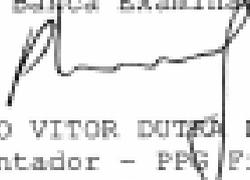
TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOUTOR EM FITOTECNIA

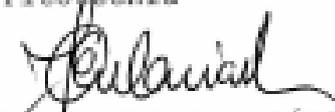
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

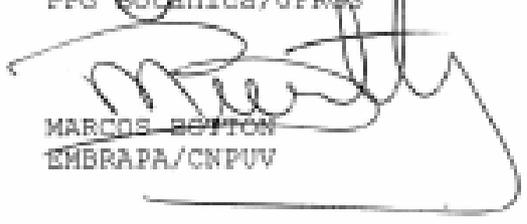
Aprovado em: 23.07.2012
Pela Banca Examinadora


PAULO VITOR DUTRA DE SOUZA
Orientador - PPG Fitotecnia


HENRIQUE PESSOR DOS SANTOS
Codirigente - EMBRAPA/CNPV

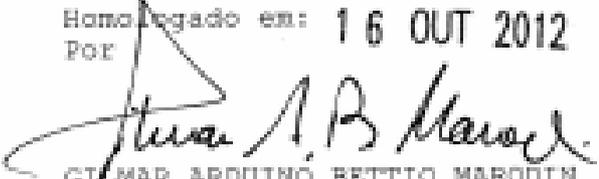

GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN
PPG Fitotecnia

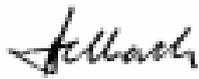

JORGE ERNESTO DE ARAÚJO MARIATH
PPG Botânica/UFRGS


MARCOS BRITTON
EMBRAPA/CNPV


CRISTIANO JOÃO ARIOLI
EPAGRI
Caçador/SC

Homologado em: 16 OUT 2012
Por


GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia


PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade
de Agronomia

Dedico este trabalho à minha esposa Carolina Modesto Zart,
por ser parte viva do meu sonho, e aos
meus pais Arnane e Lurdes Zart, que
são os meus maiores mestres.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Paulo Vitor Dutra de Souza, pela orientação e liberdade necessária para a realização da tese;

Ao Pesquisador Dr. Henrique Pessoa dos Santos, pelo auxílio em todas as esferas possíveis e necessárias para a realização da tese, como também, pela amizade;

Ao Assistente do Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Uva e Vinho, Daniel Antunes de Sousa, pelo auxílio em todas as fases do trabalho no campo e laboratório, mas também, pela amizade que existiu durante estes anos;

Ao Pesquisador Dr. Marcos Botton, pela estrutura dos experimentos realizados na casa-de-vegetação, pelas gaiolas de Gallotti e pela amizade ainda do tempo do mestrado;

À Assistente do Laboratório de Entomologia Vânia Maria Ambrosi Sganzerla, por todo auxílio prestado durante a elaboração e avaliação dos experimentos e pela amizade construída ao longo destes anos;

À doutoranda Aline Nondillo, pelo auxílio nas coletas das formigas e pérolas no campo, por possibilitar a avaliação das plantas do experimento de interação entre pérola e formigas, e pela amizade;

Aos colegas de Laboratório Leonardo Curi, Rafael Anzanello, Rodrigo Crozetta, Johnatan Marini, Rafael Gottardo, Diana Denardi, Daiana e Cristiane Badalotti, pela amizade e auxílio na condução, elaboração e avaliação dos experimentos da tese;

À Professora Dra. Luiza Rodrigues Redaelli, por disponibilizar o Laboratório de Biologia e Ecologia de Insetos durante os primeiros meses de doutorado e pela participação na banca de qualificação;

Aos Professores Dr. Josué Sant'Ana, Dra. Simone Mundstock Jahnke e aos colegas de laboratório Caio Efron, Deise Altafini, Rafael Meirelles, Diogo Pereira Rego, Cláudia Bernardes, Rita de Cássia e Ricardo Bisotto, pela boa convivência que tivemos durante minha passagem no Bioecolab;

À secretária do Programa de Pós Graduação-Fitotecnia Marisa Carvalho Bello pelo auxílio prestado em todas as burocracias necessárias para o andamento da tese;

Ao Pesquisador Dr. Luís Fernando Révers, a Analista Vanessa Buffon e aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular Vitor Falavinha, Diogo Porto, Roberta, Aline, Carol Tessale, Jaiana Malabarba, pela amizade e auxílio nos experimentos;

À Pesquisadora Dra. Vera Maria Quecini e as Assistentes Iraci Sinski e Daniela Dal Bosco, do Laboratório de Cultura de Tecidos, pela multiplicação do material utilizado para a realização da tese;

À Pesquisadora Dra. Rosemary Hoff, pelas caronas entre Porto Alegre e Bento Gonçalves e pela amizade que temos;

Ao Pesquisador Dr. George Wellington Bastos de Melo e ao Assistente Volmir Scanagatta, pela disponibilidade e auxílio das análises realizadas no Laboratório de Análise de Solos;

Aos funcionários das Casas-de-Vegetação Sérgio Zarpelon, Heitor Corbelini, Fabrício Aramis Barbosa, Irineu Casagrande, pela manutenção das plantas de videiras;

Aos funcionários dos Campos Experimentais Roque Zílio, Valdair Debiasi, Fábio Baggio, Alexandre Baggio, Giorge Balotin, Jânio Lazzarini, Edir Argenta, Denis Pedroti, Gilmar Soligo, pelo auxílio nos experimentos;

Aos colegas de curso Leonardo Curi, Rafael Anzanello e Emiliano Santarosa pela amizade construída durante o curso;

Ao Prof. Dr. Gilmar Bettio Marodin, pela participação nas bancas de qualificação e defesa da tese;

Ao Assistente Dalton Antônio Zatt, pela disponibilidade dos equipamentos e auxílio na coleta dos dados meteorológicos durante a realização dos trabalhos;

Ao Pesquisador Dr. Fábio Rossi, pelas análises das atividades enzimáticas e auxílio na identificação de alguns fungos de solo;

Ao pesquisador Dr. Lucas Garrido, à Analista Renata Gava e ao Assistente Léo Carollo, pelo auxílio na elaboração dos experimentos com infestação, manutenção e identificação dos fungos de solo;

Ao Pesquisador Dr. Thor Fajardo, pelo auxílio na identificação das doenças viróticas da videira;

Aos Professores Dr. Jorge Ernesto de Araújo Mariath e a Dra. Alexandra Antunes Mastroberti, pela disponibilidade dos recursos do laboratório e auxílio nas análises anatômicas para a tese;

À Técnica do Laboratório de Anatomia Vegetal Juliana Troleis, e aos colegas Marcos Gaeta, Juca San Martin, Adriano Silvério e Érica Duarte, pelo auxílio prestado e convivência no laboratório;

Aos colegas do Laboratório de Entomologia da Embrapa Uva e Vinho Daniel Bernardi, Cléber Barônio, Alexandre da Silva, Aline Bertin, Cindy Chaves, Ruben Marchota, Lígia De Bortolli, por todo auxílio e amizade que tivemos durante as coletas de pérolas e formigas;

Ao Sr. Valério Mascarello, por colaborar nas coletas de pérolas e formigas em sua propriedade;

Ao Engenheiro Agrônomo João Carlos Rigo, da Vinícola Aurora, por auxiliar na busca de área infestada por pérola-da-terra e ao Sr. João Pavan, por ceder os vinhedos onde foram instalados os experimentos de campo;

Aos colegas que passaram pela pousada da Embrapa Uva e Vinho, Daniel Bernardi, Cleber Barônio, Cyndi Corrêa, Mari Flores, Tati Storch, Renata Moura, Caroline Silveira, Gisele Colussi, Marcos Basso, Cíntia Borges, Diogo Goularte, Oscar Netto, Leonardo Ferrari, Gustavo Tonillo, Alexandre Silva, Rafael Philippus, Caio Efron, Rubens Marchota, Diogo Denardi e Júlio César.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela possibilidade e recursos para custear a pós graduação;

À Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, pela possibilidade de executar parte dos trabalhos da tese, ceder um local para minha estadia e disponibilizar recursos utilizados neste trabalho;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de auxílio e pesquisa, sem a qual não seria possível minha dedicação exclusiva;

Às inúmeras pessoas anônimas que influenciaram na realização do trabalho, deixo o meu muito obrigado.

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DO
ATAQUE DA PÉROLA-DA-TERRA, *Eurhizococcus brasiliensis* (WILLE, 1922)
(HEMIPTERA: MARGARODIDAE), EM VIDEIRAS¹

Autor: Marcelo Zart
Orientador: Paulo Vitor Dutra de Souza
Co-orientador: Henrique Pessoa dos Santos

RESUMO

A pérola-da-terra, *Eurhizococcus brasiliensis*, é considerada a principal praga da videira no Brasil devido a mortalidade de plantas em áreas infestadas. Contudo não há informação de como o inseto causa os sintomas e a morte de videiras. Esse trabalho teve como objetivo estudar as características sintomatológicas de plantas atacadas pela pérola-da-terra. Foram realizados experimentos em três diferentes ambientes para avaliar contrastes nas características químicas, físicas e biológicas das plantas com e sem a presença da pérola. A campo foi avaliado o crescimento, brotação e aspectos fisiológicos das plantas. Em canteiros de alvenaria foi avaliada a produção de estacas de 'Paulsen 1103' e os aspectos fisiológicos das cultivares-copas 'Isabel', 'Cabernet Sauvignon', híbrido '548-15' e 'Paulsen 1103'. Em casa-de-vegetação foram cultivadas plantas de 'Paulsen 1103' com substrato esterilizado, infestação controlada de pérola, formiga (*Linepithema micans*) e inóculo do fungo causador da podridão de raízes (*Cylindrocarpon destructans*). Avaliou-se, em diferentes interações, os aspectos fisiológicos, bioquímicos, morfológicos e nutricionais das plantas. Também foram avaliadas videiras infestadas e não infestadas quanto à atividade de peroxidases (GPx) e polifenoloxidasas (PPO) em raízes; expressão gênica de Estilbeno Sintase, Chalcona Sintase e a proteína Pathogenesis Related (PR-2) em folhas; e análises anatômicas de raízes de videiras suscetíveis ('Paulsen 1103' e 'Isabel') e tolerantes ('Magnólia' e '548-15') quanto à distinção da metil esterificação de pectinas de paredes com o anticorpo monoclonal JIN7. A campo foram observados sintomas foliares nas plantas avaliadas, identificados em laboratório como sendo causados por fungo (*Botryosphaeria* sp.) e vírus (enrolamento da folha da videira, GLRaV). Estacas de plantas atacadas por pérola sofrem alterações morfológicas, porém não há diferença no percentual de brotação e enraizamento quando comparadas com estacas de plantas não atacadas. Não foram observadas alterações sintomáticas em folhas, no crescimento (ramos e folhas), nas taxas de fotossíntese, teores de clorofilas (α , β e total) e percentual de amido em folhas e ramos das plantas em canteiros. Em casa-de-vegetação não foram observados sintomas foliares do ataque de pérola nas plantas infestadas por mais de 20 meses. Não houve alteração da expressão de Estilbeno Sintase, Chalcona Sintase e PR-2 de plantas com e sem pérola. Diante de todas as estratégias adotadas pode-se concluir que isoladamente a pérola não promove restrições ao metabolismo da videira.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (98p.) Julho, 2012.

MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL
CHARACTERISATION OF GROUND PEARL, *Eurhizococcus brasiliensis* (WILLE,
1922) (HEMIPTERA: MARGARODIDAE), ATTACK IN GRAPEVINE¹

Author: Marcelo Zart
Adviser: Paulo Vitor Dutra de Souza
Co-adviser: Henrique Pessoa dos Santos

ABSTRACT

The ground-pearl *Eurhizococcus brasiliensis* is considered as the main pest of vineyards in Brazil because the association with mortality of vines in infested areas. However, until the moment, there isn't information on how this insect can cause symptoms and death of vines. This work aimed to study the symptomatic characteristics of plants attacked by ground-pearl. Assays were performed with plants attacked and not attacked by the pest in three different environments, with the intention to evaluate contrasts chemical, physical and biological between plants. The growth, sprouting and physiological aspects of plants were evaluated at the field. In plant-bed, with the control of infestation of ground pearl, we evaluated the production of cuttings 'Paulsen 1103' and the physiological aspects of cultivars-tops 'Isabel', 'Cabernet Sauvignon', hybrid '548-15' and 'Paulsen 1103'. In greenhouse, 'Paulsen 1103' rootstock seedlings were grown using sterilized substrate and controlled infestation of ground pearl, ant (*Linepithema micans*) and the fungus that causes black foot rot (*Cylindrocarpon destructans*). We evaluated in different interactions, the physiological, biochemical, morphological and nutritional aspects of plants. We also evaluated infested and not-infested vines and the activity of peroxidases (GPx) and polifenoloxidasas (PPO) in roots; Stilbene Synthase and Chalcone Synthase gene expression, and Pathogenesis Related (PR-2) protein in leaves, and anatomical analysis of roots vines susceptible ('Paulsen 1103' and 'Isabel') and tolerant ('Magnolia' and '548-15') regarding distinction of methyl esterification of pectins from walls with the monoclonal antibody JIN7. In the field were observed foliar symptoms at the plants, identified in the laboratory as being caused by fungus (*Botryosphaeria* sp.) and viruses (GLRaV). Cuttings of plants attacked by ground-pearl suffer morphological modifications, but there wasn't difference in the percentage of sprouting and rooting cuttings compared with plants not attacked. In symptomatological aspects in plant-bed were not observed modifications symptomatic in leaves, growth (stems and leaves), in the rates of photosynthesis, chlorophyll contents and percentage of starch in leaves and stems. In greenhouse were not observed typical foliar symptoms of the attack of ground-pearl in the plants infested for over 20 months. There wasn't modifications in the expression of Stilbene Synthase, Chalcone Synthase and PR-2, analyzed in leaves. Due to all the strategies adopted in this work to characterize the isolated effects of ground-pearl, one can conclude that this insect alone does not promote the metabolism of the vine restrictions.

¹ Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (98p.) July, 2012.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Videira: origem e importância.....	5
2.2 Pérola-da-terra.....	6
2.2.1 Classificação e bioecologia.....	6
2.2.2 Disseminação e interação com outros organismos.....	9
2.2.3 Tolerância de porta-enxertos à pérola-da-terra.....	10
2.2.4 Sintomas e danos.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Condições experimentais.....	13
3.1.1 Ensaio em vinhedo comercial infestado por pérola-da-terra.....	13
3.1.2 Ensaio em canteiros infestados e não infestados por pérola-da-terra.....	16
3.1.2.1 Experimento 1 - Comportamento de mudas de videiras em canteiros com e sem infestação por pérola-da-terra.....	17
3.1.2.2 Experimento 2.....	22
a) Avaliação de mudas formadas de estacas de plantas de ‘Paulsen 1103’ cultivadas em canteiros com e sem a infestação de pérola-da-terra.....	22
b) Avaliação de diferentes copas enxertadas sobre ‘Paulsen 1103’ em canteiros com e sem a infestação de pérola-da-terra.....	24
3.1.3 Ensaios em casa de vegetação com monitoramento de infestação..	27
3.1.3.1 Avaliação sintomática, bioquímica e morfo-fisiológica de plantas de videira ‘Paulsen 1103’ com diferentes interações entre pérola-da-terra e formigas.....	29
3.1.3.2 Avaliação de sintomas e de desenvolvimento de diferentes enxertos em ‘Paulsen 1103’ cultivado com e sem infestação de pérola-da-terra e formiga.....	34
3.1.3.3 Avaliação do desenvolvimento, crescimento, aspectos bioquímicos e morfo-fisiológicos de plantas de ‘Paulsen 1103’ cultivadas em diferentes interações com pérola-formiga e <i>Cylindrocarpon destructans</i>	35
3.1.3.4 Relação da infestação de pérola-da-terra com o grau de metil esterificação em diferentes espécies de videira.....	39
3.2 Análise estatística.....	41

	Página
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Avaliação realizada em vinhedo comercial.....	42
4.2 Ensaio ambientado em canteiros.....	46
4.2.1 Experimento 1. Avaliação do comportamento de mudas de videiras em canteiros com e sem infestação controlada de pérola-da-terra.....	46
4.2.2 Experimento 2.....	49
a) Avaliação de mudas formadas de estacas coletadas de plantas de ‘Paulsen 1103’ cultivadas em canteiros com e sem a infestação de pérola-da-terra.....	49
b) Avaliação de diferentes copas enxertadas sobre ‘Paulsen 1103’ em canteiros com e sem a infestação de pérola-da-terra.....	52
4.3 Avaliação sintomática, bioquímica e morfo-fisiológica de plantas de videira ‘Paulsen 1103’ com diferentes interações entre pérola-da-terra e formiga.....	60
4.4 Avaliação do desenvolvimento, crescimento, aspectos bioquímicos e morfo-fisiológicos de plantas de ‘Paulsen 1103’ cultivadas em diferentes interações com pérola, formiga e o fungo <i>Cylindrocarpon destructans</i>	68
4.5 Relação da infestação de pérola-da-terra com o grau de metil esterificação em diferentes espécies de videira.....	81
5. CONCLUSÕES.....	84
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
8. VITA.....	98

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

1. Resultados das análises de solo dos canteiros (1 ao 8) em duas diferentes datas de coleta (jun/2009 e jan/2010) com os valores de pH (em H₂O); percentuais de Argila e Matéria Orgânica (MO) (%); teores de fósforo (P), potássio (K), enxofre (S), zinco (Zn), cobre (Cu), boro (B) e manganês (Mn) em mg/dm³; cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em cmolc/dm³. Bento Gonçalves, jan/2010..... 18
2. Análise do substrato utilizado para cultivo de videiras em gaiola de Gallotti, quanto ao pH (em H₂O); argila (%) e matéria orgânica (MO, em %); fósforo (P), potássio (K), enxofre (S), zinco (Zn), cobre (Cu), boro (B) e manganês (Mn) em mg/dm³; cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em cmolc/dm³. Bento Gonçalves, dez/2010..... 29
3. Valores médios (\pm erro padrão) do comprimento de entrenó (CME), diâmetro de entrenó (DME), massas fresca (MF) e seca (MS) de entrenó de ramos de plantas de ‘Cabernet Franc’ (C.F.) e ‘Cabernet Sauvignon’ (C.S.) (*Vitis vinifera*), observadas a campo com (CP) e sem (SP) a infestação de pérola-da-terra nas raízes. Pinto Bandeira, set/2010..... 43
4. Valor médio (\pm erro padrão) do diâmetro (Θ) do colo (mm), diâmetro do ramo (mm), comprimento (cm) e massas fresca e seca do ramo basal (formado por gemas) de plantas das cultivares ‘548-15’, ‘1113-10’, ‘Isabel’, Paulsen 1103’, Cabernet Sauvignon’ e enxertos de ‘Cabernet Sauvignon’ (P1103 + CS) e ‘Isabel’ (P1103 + Isabel) enxertados sobre ‘Paulsen 1103’, cultivadas em canteiros com (CP) e sem (SP) a infestação de pérola-da-terra. Bento Gonçalves, set/2011..... 48
5. Valor médio (\pm erro padrão) do número de brotações, número de gemas, comprimento total das brotações, número de raízes primárias, comprimento (cm) de duas raízes e a massa fresca (g) das raízes das estacas de plantas cultivadas em canteiros com pérola (CP) e sem pérola (SP). Bento Gonçalves, dez/2011..... 51
6. Valor médio (\pm erro padrão) do número de cistos, diâmetro do colo (Θ , mm), massa fresca (MF, g) e massa seca (MS, g) da parte aérea e raiz de plantas porta-enxertos (‘Paulsen 1103’) cultivadas em canteiros com pérola (CP) e sem pérola (SP). Bento Gonçalves, mar/2011..... 52

7. Valor médio (\pm erro padrão) do comprimento de entrenó (C, cm), massa fresca (MF, g) e massa seca (MS, g) de entrenó e folha e área foliar (cm^2) de plantas das cultivares de videira '548-15', 'Paulsen 1103', 'Isabel' e 'Cabernet Sauvignon', enxertadas sobre 'Paulsen 1103' cultivadas em canteiros com pérola (CP) e sem pérola (SP). Bento Gonçalves, mar/2012..... 53
8. Valor médio (\pm erro padrão) da estimativa de clorofila α , β e total, pelo índice de clorofila Falker (ICF), obtido através de leituras com clorofilômetro portátil (clorofiLOG 1030) em folhas de videiras das cultivares '548-15', 'Paulsen 1103', 'Isabel' e 'Cabernet Sauvignon' (CS), enxertadas sobre 'Paulsen 1103' e cultivadas em canteiros com pérola (CP) e sem pérola (SP). Bento Gonçalves, mar/2012..... 55
9. Valores médios (\pm erro padrão) do percentual de amido em folhas e ramos de plantas das cultivares de videira '548-15', 'Paulsen 1103', 'Isabel' e 'Cabernet Sauvignon', enxertadas sobre 'Paulsen 1103' cultivadas em canteiros com pérola (CP) e sem pérola (SP). Bento Gonçalves, 2012..... 58
10. Número de brotações por planta, gemas e feminelas por ramo, comprimento de entrenós e área foliar observada em plantas de 'Paulsen 1103', cultivadas por 10 meses em gaiolas de Galotti com solo esterilizado e com as interações Videira (V), Videira e Formiga (V+F), Videira, Pérola e Formiga (V+P+F) e Videira e Pérola (V+P). Bento Gonçalves, out/2010..... 61
11. Massa média fresca (MF) e seca (MS) de entrenós e foliar e conteúdo de água nos entrenós e folhas, observado de plantas de 'Paulsen 1103' cultivadas por 10 meses em gaiolas de Galotti com solo esterilizado e com as interações Videira (V), Videira e Formiga (V+F), Videira, Pérola e Formiga (V+P+F) e Videira e Pérola (V+P). Bento Gonçalves, out/2010..... 61
12. Número médio (\pm erro padrão) do diâmetro do colo (mm), número de brotos por planta, número de gemas por broto, comprimento de entrenó (cm) e número de feminelas por planta de videira 'Paulsen 1103' nos tratamentos Videira (V), V + pérola + formiga (V+P+F), V+P+F+ fungo *Cylindrocarpon destructans* (C) e V+C, cultivadas em gaiolas de Gallotti, em casa de vegetação, após 330 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. Bento Gonçalves dez/2012..... 69
13. Análise do substrato utilizado para cultivo de videiras em gaiola de Gallotti, quanto ao pH (em H_2O); argila (%) e matéria orgânica (MO, em %); fósforo (P), potássio (K), enxofre (S), zinco (Zn), cobre (Cu), boro (B) e manganês (Mn) em mg/dm^3 ; cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em cmolc/dm^3 . Bento Gonçalves, ago/2011..... 70
14. Períodos de observação da umidade (m^3/m^3) do substrato das gaiolas de Gallotti (com sensor de barra, PR2, Delta-T Devices Ltda) em diferentes profundidades, umidade relativa do ar (%) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) com termohigrógrafo de penas gráficas (marca LAMBRECHT, modelo 252). Bento Gonçalves, jan/2012..... 71

15. Valor médio (\pm erro padrão) da estimativa de clorofila α , β e total, pelo índice de clorofila Falker (ICF), obtido através de leituras com clorofilômetro portátil (clorofiLOG 1030) em folhas de 'Paulsen 1103' cultivadas em gaiolas de Gallotti em condições controladas nas interações Videira (V), V - pérola - formiga (P+F), V - P - F - *Cylindrocarpon* (C) e V - C, cultivadas em casa de vegetação, após 360 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. Bento Gonçalves, jan/2012..... 75
16. Percentual (%) de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, e mg.Kg¹ de zinco, manganês, boro, ferro e cobre em folhas coletadas de videiras 'Paulsen 1103' cultivadas em gaiolas de Gallotti e casa de vegetação, nas interações Videira (V); V - Pérola (P) - Formiga (F) (V+P+F); V - P - F - *Cylindrocarpon* (C) e V - C. Análise após 180 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. Bento Gonçalves, jan/2012..... 76
17. Médias do diâmetro (mm) e comprimento (cm) de entrenós, massas (g) fresca (MF) e seca (MS) de entrenós e folhas, percentual de água de folhas e área foliar (cm²) observado em plantas de 'Paulsen 1103', cultivadas por 380 dias em gaiolas de Galotti com solo esterilizado nas interações Videira (V); Videira, Pérola e Formiga (V+P+F); Videira, Pérola, Formiga e *Cylindrocarpon* (V+P+F+C) e Videira e *Cylindrocarpon* (V+C). Bento Gonçalves, mar/2012..... 79

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Fases da pérola-da-terra; cisto amarelo (A), cisto branco (B) e fêmea móvel (C). Bento Gonçalves, dez/2010. (Foto: Zart).....	7
2. Raízes de videira infestadas por pérola-da-terra. Bento Gonçalves, dez/2010. (Foto: Mariath).....	7
3. Folhas de videira (<i>V. labrusca</i>) sem sintomas (A), com sintomas de clorose (B) e necrose (C), atribuído à pérola-da-terra. Pinto Bandeira, jan/2005. (Foto: De César).....	11
4. Videira (<i>V. labrusca</i>) em área infestada por pérola, com baixo vigor e entrenós curtos. Bento Gonçalves, nov/2010 (Foto: Zart).....	11
5. Localização das áreas de videira (<i>V. vinifera</i>) ‘Cabernet Sauvignon’ (A) e ‘C. Franc’ (B). Pinto Bandeira, ago/2010 (Imagem: Google Earth).....	14
6. Avaliação da infestação de pérola em raízes de videira a campo. Pinto Bandeira, ago/2010 (Foto: Zart).....	14
7. Estádio de ponta verde. Pinto Bandeira, ago/2010 (Foto: Zart).....	15
8. Características dos canteiros de alvenaria utilizados, com estruturas para suporte do sombrite, arames de sustentação, hastes para condução das plantas e irrigação. Bento Gonçalves, mar/2010 (Foto: Zart).....	16
9. Imagem da localização dos canteiros (retângulo vermelho) na sede da Embrapa Uva e Vinho – Bento Gonçalves, ago/2010 (Imagem: Google Earth).....	17
10. Croquis da área utilizada nos experimentos, com a numeração dos canteiros. Bento Gonçalves, abr/2009 (Imagem: Zart).....	17
11. Distribuição das plantas (representados pelos pontos amarelos), das linhas e das parcelas dentro do canteiro. Bento Gonçalves, jan/2010 (Imagem: Zart).....	18
12. Enxertia de fenda simples, amarrada com vime. Bento Gonçalves, set/2010 (Foto: Kuhn).....	20

13. Local da enxertia protegida com serragem em copo plástico, para não desidratar. Bento Gonçalves, dez/2010 (Foto: Zart).....	20
14. Ramo subdividido em três estacas com quatro gemas cada: basal (A), mediana (B) e apical (C). Bento Gonçalves, set/2011 (Foto: Zart).....	23
15. Estaca plantada em copo plástico com substrato. Bento Gonçalves, out/ 2011 (Foto: Zart).....	23
16. Videira ‘Paulsen 1103’ em canteiro com quatro diferen-tes copas enxertadas (círculos vermelhos). Bento Gonçalves, dez/2011. (Foto: Zart).....	25
17. Enxerto verde realizado em 21/12/2011 sobre ‘Paulsen 1103’, cultivado em canteiro. Bento Gonçalves, dez/2011. (Foto: Zart).....	25
18. Casa de vegetação utilizada nos experimentos em ambiente controlado. Bento Gonçalves, mar/2012 (Foto: D. Sousa).....	27
19. Gaiola de Gallotti com detalhes das suas medidas. Bento Gonçalves, mar/2011 (Foto: Zart).....	28
20. Gaiola de Gallotti aberta (sem eucatex), mostrando o vidro com vista do solo e raízes. Bento Gonçalves, mar/2011 (Foto: Zart).....	28
21. Gaiolas de Gallotti nas bancadas, com bandeja (presença de for-migas) e sem bandeja (ausência de formigas). Bento Gonçalves, mar/2011 (Foto: Zart).....	31
22. Disposição geral das gaiolas na casa-de-vegetação, sobre as bancadas. Bento Gonçalves, mar/2011 (Foto: Zart).....	31
23. Enxertia verde do tipo fenda simples, mostrando a ligação entre enxerto e porta-enxerto. Bento Gonçalves, out/2011. (Foto: Zart).....	35
24. Videira da cultivar ‘Paulsen 1103’ enxertada com quatro copas diferentes. Bento Gonçalves, out/2011. (Foto: Zart).....	35
25. Placa de Petri contendo colônias do fungo <i>C. destructans</i> em meio BDA, dividido para inoculação nas gaiolas de Gallotti. Bento Gonçalves, fev/2011 (Foto: Zart).....	36
26. Perfil da gaiola de Gallotti aber-ta para realização da inoculação do meio de cultura BDA, com o fungo <i>C. destructans</i> . Bento Gonçalves, fev/2011 (Foto: Zart).....	36
27. Inoculação de <i>C. destructans</i> nas raízes de videira ‘Paulsen 1103’ com solução contendo esporos na concentração de $1 \times 10^5 \text{.ml}^{-1}$. Bento Gonçalves, fev/2011 (Foto: Zart).....	37

28. Curvas do potencial de fotossíntese de videiras ‘Cabernet Franc’ cultivadas em vinhedo comercial pré-amostradas como: **1)** plantas controle e sem sintomas de pérola-da-terra (SP); **2)** plantas infestadas, mas sem sintomas foliares de pérola-da-terra (P); e **3)** plantas infestadas e com sintomas foliares (PD). Pinto Bandeira, dez/2010..... 44
29. Sintoma em ‘Cabernet Franc’ causado pelo vírus do enrolamento da folha (GLRaV). Pinto Bandeira, dez/2010 (Foto: Zart)..... 45
30. Sintoma em ‘Cabernet Franc’ de podridão descendente da videira causado pelo fungo *Botryosphaeria* sp. Pinto Bandeira, dez/2010 (Foto: Zart)..... 45
31. Curva de fotossíntese com gradiente de radiação entre 0, 100, 200, 400, 800, 1000, 2000 e 2500 μmol de ftons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em plantas de ‘Isabel’ cultivadas em canteiros com (CP) e sem (SP) pérola-da-terra. As barras de erro correspondem à observação de 9 plantas. Bento Gonçalves, jan/2011..... 47
32. Médias observadas das massas (g) frescas (cinza claro) e secas (cinza escuro) (A); diâmetros (mm) (B) e comprimentos (cm) (C) de estacas (com quatro gemas) de videiras (‘Paulsen 1103’) cultivadas em canteiros com e sem a infestação de pérola-da-terra. Bento Gonçalves, set/2011..... 50
33. Percentual de amido em estacas de videiras da cultivar ‘Paulsen 1103’ coletadas de plantas em canteiros sem pérola e com pérola. Bento Gonçalves, jan/2012..... 51
34. Folhas de videiras das cultivares ‘Isabel’, ‘548-15’, ‘Cabernet Sauvignon’ (C.S.), e ‘Paulsen 1103’ (enxerto) enxertadas sobre plantas de ‘Paulsen 1103’ (porta-enxerto) infestadas (CP) e não infestadas (SP) por pérola-da-terra, durante três anos com média 4,25 cistos por planta. Bento Gonçalves, mar/2012 (Foto: Zart)..... 55
35. Curvas de fotossíntese ($\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) com gradiente de radiação (PAR) entre 0, 100, 400, 800, 2000 e 2500 μmol de ftons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em plantas de ‘548-15’ (A), ‘Paulsen 1103’ (B), ‘Isabel’ (C) e ‘Cabernet Sauvignon’ (D), cultivadas em canteiros com (CP, linha pontilhada) e sem (SP, linha sólida) pérola-da-terra. As barras de erro padrão correspondem a 4 plantas. Bento Gonçalves, mar/2012..... 57
36. Atividades de peroxidases (GPx, EC 1.11.1.9) (A) e polifenoloxidasas (PPO, EC. 1.14.18.1) (B) em raízes de videira ‘Paulsen 1103’ infestadas (CP) e não infestadas (SP) com pérola-da-terra, durante três anos (Tempo). Uma unidade de atividade foi definida como a variação de uma unidade de absorvância (GPX = 480nm e PPO = 410nm) por miligrama de proteína por minuto (UA $\text{mgP}^{-1} \text{min}^{-1}$). Barras de erros indicam desvio-padrão da média com quatro plantas. Bento Gonçalves, mar/2012..... 59
37. Gaiola de Gallotti aberta (sem o vidro) com tunelamento de formigas pela interação, juntamente, com pérola e videira. Bento Gonçalves, mar/2012. (Foto: Zart)..... 62

38. Detalhe do tunelamento de formigas próximo ao cisto de pérola, fixada em raiz de videira, cultivada em gaiola de Gallotti. Bento Gonçalves, mar/2012. (Foto: Zart)..... 62
39. Comparação de folhas de ‘Paulsen 1103’ cultivadas em condições controladas (solo esterilizado), com $(35,21 \pm 6,33)$ cistos por planta) e sem pérola-da-terra, durante 10 meses. Bento Gonçalves, nov/2010. (Foto: Zart).... 63
40. Percentual (%) de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em folhas coletadas de ‘Paulsen 1103’ cultivadas em gaiolas de Gallotti, com quatro interações diferentes e em condições controladas com infestação por 10 meses. As barras de erro referem-se à 11, 20, 9 e 19 repetições, respectivamente aos tratamentos de Videira (V); Videira e Formiga (V+F); Videira e Pérola (V+P); Videira, Pérola e Formiga (V+P+F). Bento Gonçalves, out/ 2010..... 63
41. Relações entre os percentuais de nitrogênio (A), fósforo (B), potássio (C), cálcio (D) e magnésio (E) em folhas de ‘Paulsen 1103’ e o número de cistos de pérola observado em plantas cultivadas em gaiolas de Gallotti com condições controladas, após 10 meses de infestação. Bento Gonçalves, nov/2010..... 64
42. Percentual de aminoácidos totais em folhas de videiras da cultivar ‘Paulsen 1103’ nas interações: videira (V); videira x formiga (V+F); videira x pérola (V+P) e videira x pérola x formiga (V+P+F), cultivadas em gaiolas de Gallotti e casa de vegetação, após 300 dias de infestação de pérola. NS: não significativo pelo teste de Tukey ($p>0,05$). Bento Gonçalves, nov/2010..... 65
43. Percentual de proteínas totais em folhas de videiras da cultivar ‘Paulsen 1103’ nas interações: videira (V); videira x formiga (V+F); videira x pérola (V+P) e videira x pérola x formiga (V+P+F), cultivadas em gaiolas de Gallotti e casa de vegetação, após 300 dias de infestação de pérola. NS: não significativo pelo teste de Tukey ($p>0,05$). Bento Gonçalves, nov/2010..... 65
44. Percentual de amido em folhas de videiras da cultivar ‘Paulsen 1103’ nas interações: videira (V); videira e formiga (V+F); videira e pérola (V+P) e videira, pérola e formiga (V+P+F), cultivadas em gaiolas de Gallotti após 300 dias de infestação de pérola com médias de 2 e 35,2 cistos/planta para V+P e V+P+F, respectivamente. Letras diferentes representam significância pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Bento Gonçalves, nov/2010..... 66
45. Relação entre o percentual de amido em folha e o número de cistos de pérola-da-terra observado nas raízes de videiras ‘Paulsen 1103’ cultivadas em gaiola de Gallotti com 10 meses de infestação. Bento Gonçalves, nov/2010..... 66

46. Curvas de fotossíntese ($\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) com gradiente de radiação (PAR) entre 0, 100, 200, 400, 800, 1000, 2000 e 2500 $\mu\text{mol de ftons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ em plantas de 'Paulsen 1103' cultivadas em gaiolas de Gallotti nas interações videira e formiga (V+F); videira e pérola (V+P) e videira, pérola e formiga (V+P+F), em casa de vegetação, após 10 meses de infestação. As barras de erro padrão correspondem a 4 plantas. Diferença não significativa pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Bento Gonçalves, nov/2010..... 67
47. Percentual de brotações em plantas de videira 'Paulsen 1103' nas interações: Videira (V); Videira, Pérola e Formiga (V+P+F); Videira, Pérola, Formiga e *Cylindrocarpon* (V+P+F+C) e Videira e *Cylindrocarpon* (V+C), cultivadas em gaiolas de Gallotti, em casa de vegetação, após 150 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. Bento Gonçalves, ago/2011..... 69
48. Vista geral das placas contendo meio de cultura (BDA) com o crescimento das colônias de diferentes espécies de fungos contidos no substrato. Bento Gonçalves, ago/2011 (Foto: Zart)..... 70
49. Placa com crescimento de colônia de *Cylindrocarpon* (circulada em vermelho), identificada visualmente e posteriormente comprovada por isolamento. Bento Gonçalves, ago/2011 (Foto: Zart)..... 70
50. Potencial de água na folha ao longo de um dia (05/01/2012), avaliado em plantas de 'Paulsen 1103' nas interações videira (V), videira, pérola e formiga (P+F), videira, pérola, formiga e *Cylindrocarpon* (C) e videira e *Cylindrocarpon*, cultivadas em gaiolas de Gallotti, em casa de vegetação, após 360 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. Bento Gonçalves jan/2012..... 72
51. Médias de fotossíntese ($\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) avaliadas ao longo de um dia (05/01/12) em plantas de 'Paulsen 1103' cultivadas em gaiolas de Gallotti em condições controladas nas interações videira (V), videira, pérola e formiga (P+F), videira, pérola, formiga e *Cylindrocarpon* (C) e videira e *Cylindrocarpon*, cultivadas em gaiolas de Gallotti e em casa de vegetação, após 360 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. Bento Gonçalves, jan/2012..... 73
52. Curvas de fotossíntese ($\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) com gradiente de radiação (PAR) entre 0, 100, 200, 400, 800, 1000, 2000 e 2500 $\mu\text{mol de ftons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ em plantas de 'Paulsen 1103' nas interações videira (V), videira, pérola e formiga (P+F), videira, pérola, formiga e *Cylindrocarpon* (C) e videira e *Cylindrocarpon*, cultivadas em gaiolas de Gallotti e em casa de vegetação, após 360 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. As barras de erro padrão correspondem a 3 plantas. *Diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Bento Gonçalves, jan/2012..... 74

53. Percentual de amido em ramos (A) e folhas (B) de videiras da cultivar ‘Paulsen 1103’ nas interações: videira (V); videira, pérola e formiga (V+P+F); videira, pérola, formiga e *Cylindrocarpon* (V+P+F+C) e videira e *Cylindrocarpon* (V+C), cultivadas em gaiolas de Gallotti após 360 dias da infestação de pérola e inoculação do fungo. Letras diferentes representam significância pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Bento Gonçalves, jan/2012..... 76
54. Percentual de brotações em plantas de videira ‘Paulsen 1103’ nas interações: videira (V); videira, pérola e formiga (V+P+F); videira, pérola, formiga e *Cylindrocarpon* (V+P+F+C) e videira e *Cylindrocarpon* (V+C), cultivadas em gaiolas de Gallotti, após 360 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. Bento Gonçalves, jan/2012..... 77
55. Número total de brotações em plantas de videira ‘Paulsen 1103’ nas interações: videira (V); videira, pérola e formiga (V+P+F); videira, pérola, formiga e *Cylindrocarpon* (V+P+F+C) e videira e *Cylindrocarpon* (V+C), cultivadas em gaiolas de Gallotti, após 360 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. Bento Gonçalves, jan/2012..... 78
56. Relação do desenvolvimento de folhas ao longo do período avaliado (18/01 – 15/03/2012), em plantas de videira ‘Paulsen 1103’ nas interações: videira (V); videira, pérola e formiga (V+P+F); videira, pérola, formiga e *Cylindrocarpon* (V+P+F+C) e videira e *Cylindrocarpon* (V+C), cultivadas em gaiolas de Gallotti após 380 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. As barras de erro padrão correspondem a 20 plantas. *Diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Bento Gonçalves, mar/2012..... 79
57. Amplificação dos genes das enzimas Estilbeno Sintase (A) e Chalcona Sintase (B) e da proteína PR-2 (C) em folhas de videira ‘Paulsen 1103’, cultivadas em gaiolas de Gallotti nas interações videira (V), videira, pérola e formiga (V+P+F) e videira, pérola, formiga e *Cylindrocarpon* (V+P+F+C), cultivadas casa de vegetação, após 380 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. Valores entre parêntese significam média de pérolas nas raízes das plantas. Bento Gonçalves, mar/ 2012..... 80
58. Cortes transversais de raízes de videira ‘Paulsen 1103’ (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*). Microscopia óptica de fluorescência sem a presença de anticorpo primário JIM7 (A). Microscopia óptica de fluorescência apresentando emissão de verde pelo fluorocromo (FITC) ligado ao anticorpo JIM7 (B). Porto Alegre, 2012..... 81
59. Cortes transversais de raízes de videiras das cultivares ‘Paulsen 1103’ (A); ‘548-15’ (B); ‘Isabel’ (C) e ‘Magnólia’ (D). Microscopia de fluorescência apresentando emissão de verde pelo fluorocromo ligado ao anticorpo JIM7. Escala em barras de 50,0 μm . A coloração vermelha é referente à autofluorescência de amido. Porto Alegre, mai/2012..... 84

1 INTRODUÇÃO

A viticultura apresenta elevado destaque econômico e social nas regiões onde a espécie é cultivada comercialmente. Com exceção da Antártida, em todos os outros continentes existe um ou mais países produtores de uvas com destaque mundial, fato relacionado ao alto valor agregado que a uva e seus derivados alcançam na balança comercial. Aliados ao apelo lucrativo do segmento somam-se ainda as políticas sociais desenvolvidas nas regiões produtoras, os rituais religiosos associados ao consumo do vinho e, entre outros, a descendência cultural no cultivo de videiras existente nas etnias que migraram das regiões do mediterrâneo, principalmente da Itália e França, para as novas regiões produtoras.

Um dos aspectos de elevada importância para o manejo da cultura da videira é a incidência de pragas e doenças, sendo as últimas mais valorizadas dentro de ações de controle fitossanitário. No Brasil, doenças fúngicas podem ser responsáveis por até 30% do custo de produção em regiões onde o clima é favorável ao seu desenvolvimento (Sônego & Garrido, 2007). Tal fato é comprovado pelo número de fungicidas registrados para a cultura (44), comparado com o de acaricidas - inseticidas (13) (Agrofit, 2012). Artrópodes pragas são relatados como de importância secundária na cultura da videira (Botton *et al.*, 2003), embora ao se observar mais atentamente, a baixa qualidade do produto final pode estar relacionada com a incidência de insetos-praga (Botton *et al.*, 2005). Também, em recente análise para encontrar resíduos de agrotóxicos em alimentos no país, a uva apresentou resultado insatisfatório com produtos não autorizados para a cultura ou valor de resíduo acima do limite máximo permitido em 56,4% das amostras avaliadas (ANVISA, 2011). No total dos agrotóxicos encontrados na uva, 46,3% representava ser de inseticidas, o que demonstra uma possível defasagem dos ingredientes químicos utilizados ou mesmo, uma falta de controle no uso dos inseticidas permitidos por parte dos viticultores.

Tratando-se especificamente de insetos-pragas, a pérola-da-terra (também conhecida como margarodes ou carrapato-da-videira), *Eurhizococcus brasiliensis* (Wille, 1922) (Hemiptera: Margarodidae), é de elevada importância para a cultura da videira. Esta cochonilha é considerada como um dos principais agentes desencadeadores do declínio e morte de plantas, principalmente pela dificuldade de um controle eficiente em áreas infestadas (Botton *et al.*, 2004). É uma cochonilha subterrânea que se alimenta especificamente da seiva das plantas, infestando as raízes de seus hospedeiros, e que é praticamente imóvel durante quase todo o seu ciclo de vida (aproximadamente um ano). Desde a sua descoberta, em 1922, a pérola-da-terra tem sido considerada o principal inseto praga das videiras no Sul do país (Soria & Gallotti, 1986). Este fato tornou-se um estigma, por parte dos técnicos e produtores, de que em áreas infestadas com pérola-da-terra a produção de uvas é comprometida ou inviabilizada. Diante deste cenário, houve grandes esforços técnicos na seleção de produtos químicos eficazes para o controle deste inseto sem nenhuma preocupação no entendimento de como esse inseto provoca os sintomas na videira. Contudo, até a presente data não se dispõe de um controle químico que seja totalmente eficaz para evitar o ataque, havendo constância de infestação e disseminação deste inseto em áreas de cultivo no Brasil.

Atualmente, o manejo da pérola-da-terra em áreas infestadas se baseia no uso de inseticidas neonicotinóides, aplicado nas raízes, replantio de plantas mortas (sem uma precisa identificação da sintomatologia e tratamento prévio do local de plantio), aumento na adubação e manejo de cobertura verde na área (Botton *et al.*, 2009, Botton *et al.*, 2010).

Na implantação de um vinhedo em área infestada a recomendação tem sido a drenagem dos locais com problema de solo encharcado e plantio das mudas em “camaleão” (elevação do solo na linha de plantio), dando-se preferência para escolha de material vegetativo comprovadamente sadio (Dal Bó *et al.*, 2007). Algumas observações preliminares na Serra Gaúcha, em Santa Catarina e no Paraná, salientam que híbridos da espécie *Vitis rotundifolia* apresentam tolerância à infestação de pérola da terra (Dal Bó *et al.*, 2007; Botton & Colleta, 2010; Broetto *et al.*, 2011). Contudo, estes materiais também apresentam mortalidade de plantas em solos muito úmidos (baixadas) e/ou com problemas da falta de drenagem. De modo geral, o manejo da pérola-da-terra na viticultura é oneroso e, em muitos casos, há falta de interesse dos produtores por cultivos em áreas infestadas, impactando diretamente a pequena

propriedade rural que predomina nestas regiões vitivinícolas brasileiras (Protas *et al.*, 2002).

Na análise da interação inseto-plantas, salienta-se que o gênero *Vitis* é exótico para as condições brasileiras, forçando muitos insetos nativos a se adaptar à fitofagia sobre as diferentes espécies e cultivares de videiras, adquirindo o status de praga (Silva *et al.*, 1967). A pérola-da-terra é um exemplo de espécie nativa que atingiu um nível de adaptação em plantas exóticas, conseguindo sobreviver em videiras, por exemplo. Contudo, plantas de videiras apresentam baixa produtividade, desenvolvem sintomas e morrem quando infestadas por pérola-da-terra, o que levanta a hipótese de que a videira não se adaptou a esse inseto pelo tempo restrito de coevolução (Boton *et al.*, 2009). Esta hipótese é corroborada pelo fato de muitas espécies de plantas nativas não manifestarem os mesmos sintomas de ataque apresentados pelas videiras. Entretanto, algumas plantas exóticas infestadas pela pérola-da-terra também não padecem com os mesmos sintomas observados em videiras, tais como macieira, podendo no máximo ter o vigor reduzido pela infestação, fato que intriga o aspecto de colonização da pérola no gênero *Vitis*.

Devido aspectos intrínsecos da pérola-da-terra, como ciclo de vida longo, hábito subterrâneo, alimentação exclusiva em tecido vivo (não existe dieta artificial), interação com formigas (Hickel, 1994; Nondillo *et al.*, 2010) e possivelmente simbiotes (Zucchi *et al.*, 2011), há muitas dificuldades para se ter avanços sobre a bioecologia deste inseto. Portanto, o conjunto destes entraves se apresenta como o principal fator do limitado conhecimento que existe sobre a interação entre a pérola-da-terra e videira, apesar da importância desta praga na viticultura nacional.

Esse trabalho teve como meta a caracterização histológica, morfológica, fisiológica e bioquímica da interação pérola-da-terra e videira, buscando identificar os mecanismos envolvidos na sintomatologia de ataque. Como estratégia de estudo, buscou-se o comparativo de plantas atacadas e não atacadas, considerando áreas comerciais de vinhedo e ensaios em condições controladas de ambiente, substrato e de infestação. Para isso, o trabalho foi estruturado com a intenção de atender as seguintes questões técnico-científicas:

- Comparar a evolução dos sintomas foliares de plantas de videiras atacadas e não atacadas por pérola-da-terra, em relação a pigmentos de clorofila, nutrientes, respostas fotossintéticas, taxas respiratórias e fluxo transpiratório em folhas;

- Avaliar a influência da interação entre pérola-da-terra e formiga argentina em plantas de videira em condições controladas de infestação e sanidade do substrato;

- Caracterizar sintomas do ataque da pérola-da-terra em plantas copas de diferentes cultivares/espécies, enxertadas sobre porta-enxerto suscetível ('Paulsen 1103'), em contrastes com e sem pérola;

- Caracterizar o grau de metilesterificação das pectinas presentes nas raízes de plantas suscetíveis, tolerantes e resistentes ao ataque da pérola-da-terra, com o intuito de selecionar causas de resistência;

- Avaliar modificações na distribuição de reservas temporárias (carboidratos e proteínas) em ramos e folhas de videiras ('Paulsen 1103') infestadas e não infestadas por pérola-da-terra;

- Verificar se a presença de pérola-da-terra interfere na colonização de *Cylindrocarpon destructans* em videira 'Paulsen 1103';

- Analisar a atividade de enzimas relacionadas com estresses bióticos e abióticos em tecido de raiz de plantas com e sem pérola-da-terra;

- Analisar a indução de genes relacionados com a defesa de videiras contra patógenos, em 'Paulsen 1103' cultivadas em ambiente com controle da infestação de pérola-da-terra e *C. destructans*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Videira: origem e importância

A videira é uma planta de clima temperado, porém com plasticidade genética que a possibilita multiplicar-se em regiões de contrastes, com diferentes latitudes, longitudes e altitudes. É uma planta cosmopolita, pertencente ao gênero *Vitis* L. (Família: Vitaceae), e abrange aproximadamente 60 espécies (Mullins *et al.*, 1992). Ainda não existe uma teoria que explique onde e quando surgiu o gênero *Vitis*, porém estudos com sementes fossilizadas encontradas na Europa mostram que espécies muito semelhantes ao gênero atual existiram entre 2 - 8 milhões de anos. Acredita-se que a partir do hemisfério norte do planeta a dispersão destas plantas teve duas direções principais: uma américo-asiática e outra euro-asiática (Giovannini, 2008).

Espécies do gênero *Vitis* são encontradas, na sua forma nativa, somente no hemisfério norte do planeta (Jackson, 2008), estando distribuídas em três centros de origem: Euroasiático, Asiático e Americano. Nas classificações mais aceitas este gênero é subdividido em duas seções (ou sub-gêneros), cada qual com a devida distinção: Euvitis, que apresentam diafragma entre os ramos, canal medular interrompido, gavinhas bífidas ou trífidas, não apresentam lenticelas visíveis e possuem 38 cromossomos; e Muscadinea, que apresentam canal medular contínuo, gavinhas simples, casca com lenticelas proeminentes e 40 cromossomos (Mullins *et al.*, 1992). Na seção Euvitis encontram-se as videiras mais populares (ou verdadeiras, conforme alguns autores), como as espécies produtoras *Vitis vinifera*, *Vitis labrusca* e as espécies utilizadas como porta-enxerto *Vitis rupestris*, *Vitis riparia* e *Vitis berlandieri*. Na seção Muscadinea encontra-se a espécie *Vitis rotundifolia*, rústica e com grande potencial para o melhoramento de porta-enxertos resistentes a pragas de solo (Sousa & Martins, 2002; Giovannini, 2008; Botton & Colletta, 2010). O melhoramento se dá principalmente pela formação de híbridos, devido à incompatibilidade genética entre as seções Euvitis e Muscadinea (Torregrosa & Bouquet, 1995).

Devido a uva ser uma das frutas mais antigas utilizadas na alimentação humana, o cultivo da videira acompanhou a migração dos primeiros agricultores, com domesticação e adaptação de espécies e uma vasta gama de cultivares (Sousa & Martins, 2002; Giovannini, 2008). Segundo dados de 2010, a área mundial de vinhedos abrange 7.280.468 hectares, sendo 53,58% localizados na Europa, 28,83% na Ásia; 13,06% na América, 4,81% na África e 2,73% Oceania (OIV, 2012). No Brasil a área de plantio comercial de videiras abrange aproximadamente 81 mil hectares, com produção de 1.351.160 toneladas da fruta (IBGE, 2012). No ano de 2009, no cenário internacional, o Brasil encontrava-se na 19^a posição em área cultivada e em 14^a na produção de uvas (Mello, 2012a), com 43% de uvas destinadas para indústria (suco, vinho, geléias, etc) e 57% de uvas para o comércio como fruta fresca (Mello, 2012b).

No balanço comercial brasileiro as exportações de uva como fruta fresca representou 59.391 toneladas para o ano de 2011 (Mello, 2012a), alcançando o quinto lugar em volume e o segundo em renda, quando comparado com as demais frutas, somando US\$135.782.857,00 (Brazilianfruit, 2012). No comércio de produtos industrializados o setor está representado, principalmente, pelo suco de uva e pelos vinhos finos e espumantes, que corresponderam com 4.452 toneladas e 1,33 milhões de litros, respectivamente (Mello, 2012b). Entretanto, existem grandes perspectivas de aumento para o futuro devido a abrangência de novas regiões produtoras que o país oferta ao setor (Protas *et al.*, 2002).

2.2 Pérola-da-terra

2.2.1 Classificação e bioecologia

A pérola-da-terra é um inseto que pertence ao grande grupo conhecido como cochonilhas (Superfamília: Coccoidea), que se caracterizam por serem desprovidos de filamentos no ápice das antenas e apresentarem o rostro surgindo entre as coxas anteriores (Figura 1) (Lima, 1945). É uma cochonilha subterrânea (hipógea) e de fitofagia exclusiva de raízes (Figura 2), tanto de plantas cultivadas como silvestres, sendo prejudicial no primeiro, segundo e terceiro ínstares, visto que os adultos são desprovidos de aparelho bucal (Soria & Gallotti, 1986; Foldi, 2005). O termo “pérola-da-terra” deriva da similaridade destes insetos (quando na fase de cisto) com as pérolas verdadeiras, que são produzidas por alguns moluscos marinhos (Foldi, 2005). Este termo é designado para um grupo de aproximadamente 105 espécies descritas,

distribuídas em 10 gêneros, pertencentes à família Margarodidae e com ocorrência em quase todos os continentes do planeta, com exceção da Antártida (Foldi, 2005).



FIGURA 1. Fases da pérola-da-terra; cisto amarelo (A), cisto branco (B) e fêmea móvel (C). Bento Gonçalves, dez/2010. (Foto: Zart).



FIGURA 2. Raízes de videira infestadas por pérola-da-terra. Bento Gonçalves, dez/2010. (Foto: Mariath).

O gênero *Eurhizococcus* Silvestre 1936 é nativo da América do Sul, com três espécies descritas: *Eurhizococcus brasiliensis* (Wille, 1922); *Eurhizococcus brevicornis* (Silvestri, 1901); *Eurhizococcus colombianus* (Jakubski, 1965) (Foldi, 2005). Das espécies deste gênero, apenas *E. brasiliensis* foi identificada se alimentando de videiras. Todavia, apresenta elevada polifagia, com sobrevivência constatada em mais de 70 espécies de plantas, o que abrange 20 diferentes famílias botânicas (Botton *et al.*, 2004). No Brasil, *E. brasiliensis* foi constatada pela primeira vez em 1921, no município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, infestando videiras (Wille, 1922). Inicialmente a espécie foi identificada por Wille em 1922 como *Margarodes brasiliensis* (Willie, 1922), sendo posteriormente transferida para um novo gênero, *Eurhizococcus* (Silvestri, 1936).

A pérola-da-terra encontra-se distribuída por várias regiões do país. No Estado do Rio Grande do Sul já foram encontrados insetos se alimentando de videiras em praticamente todas as regiões vitícolas (com exceção da Serra do Sudeste e Campanha Gaúcha). A exemplo disso, destacam-se os registros de ocorrência nos Estados de Santa Catarina, na região do Vale do Rio do Peixe (Matos & Schuck, 1988; Milanez, 2001); Paraná, nos municípios de Rio Negro (Figueira Júnior, 1970) e Curitiba (Gallotti, 1976; Morales, 2001); São Paulo, nos municípios de Santa Rita do Passa Quatro e Guareí

(Novo, 1978) e Louveira (Lourenção *et al.*, 1989). Mais recentemente a pérola-da-terra foi também encontrada na região do Vale do São Francisco, nos Estados de Pernambuco e Bahia (Haji & Alencar, 2000; Haji *et al.*, 2004).

A biologia da pérola-da-terra apresenta grande dificuldade de ser estudada, principalmente por se tratar de um inseto de vida subterrânea e apresentar um ciclo longo (aproximadamente 1 ano). Com base em observações de campo, sabe-se que sua multiplicação pode ser tanto assexuada como sexuada e que nas condições ambientais do Rio Grande do Sul ocorre principalmente por partenogênese telítica, uma forma assexuada em que fêmeas produzem fêmeas (Soria & Gallotti, 1986; Soria & Dal Conte, 2005).

O ciclo é considerado univoltino (uma geração anual), apresentando fases de ovo, ninfa e adulto, porém, há suposições de alterações do ciclo devido observações a campo de todas as fases durante todo o período do ano (Dal Bó *et al.*, 2007). O ciclo assexuado da pérola-da-terra se caracteriza por apresentar um estágio de cisto, inicialmente de cor amarelada, mas geralmente, antes de se romper e liberar os ovos, de coloração branca. Neste cisto é onde os ovos são depositados pela fêmea, que morre após a postura, o que no campo, ocorre entre os meses de novembro e março. Destes ovos eclodem as ninfas móveis de primeiro ínstar que pressionam e rompem as paredes (que se tornam frágeis) do cisto. A ninfa de primeiro instar é móvel e desloca-se para uma raiz para se alimentar (Gallotti, 1976; Foldi, 1990; Hickel, 1998; Botton *et al.*, 2000; Soria & Dal Conte, 2000). Após localização e início da alimentação a ninfa se fixa à planta. Na troca de ínstar as ninfas perdem os apêndices (pernas e antenas) e, já estando fixas nas raízes, encerram-se no interior de sua própria cutícula, o que assume um formato esférico. A ninfa de terceiro instar, também imóvel, atinge o máximo de crescimento nos meses de outubro e novembro, possuindo formato globoso e coloração amarelada (como uma pérola), completando o ciclo assexuado (Foldi, 2005; Botton *et al.*, 2009).

No ciclo sexuado da pérola-da-terra o cisto se rompe para a saída de uma fêmea móvel, geralmente de corpo piloso, neotênica (não apresenta asas), desprovida de aparelho bucal, apresentando o primeiro par de pernas do tipo fossorial (adaptado para escavar) e de coloração amarelo-laranja (Figura 1) (Hickel, 1998; Soria & Dal Conte, 2000; Botton *et al.*, 2009). Com função apenas reprodutiva, nesta fase o inseto escava em direção da superfície do solo para o acasalamento com o macho, que por sua vez é alado e também desprovido de aparelho bucal. Após o acasalamento a fêmea volta para

o interior do solo, para realizar as posturas. Porém para a espécie *E. brasiliensis* não existem registros de ocorrência no campo (Hickel, 1998; Soria & Dal Conte, 2000). Poucas informações encontram-se disponíveis sobre o que ocorre com as fêmeas móveis após a fecundação, como também, sobre os fatores que levam ao aparecimento de machos na espécie (Foldi, 1990).

2.2.2 Disseminação e interação com outros organismos

A dispersão da praga se deve muito ao transporte por outros organismos. Para longas distâncias a disseminação ocorre principalmente pela ajuda do homem, seja através do solo retido em meios de transporte; em implementos agrícolas e, na maioria dos casos, através de mudas com presença de ninfas nas raízes (Mariconi & Zamith, 1973); fato provavelmente responsável pelo aparecimento da praga em vinhedos de Petrolina, PE (Haji *et al.*, 2004).

Em curtas e médias distâncias, dentro de um vinhedo, destacam-se as formigas, principalmente a espécie *Linepithema micans* (Forel, 1908) (Hymenoptera: Formicidae), as quais associam-se aos cistos de pérola em busca de excrementos açucarados conhecidos como melato (do inglês *honeydew*). Desta associação resulta um aumento na dispersão da praga dentro e fora do parreiral, pois as formigas protegem e transportam as ninfas móveis recém eclodidas de um local para outro, adotando-as como suas próprias crias (Hickel, 1994). Isso é crucial para a permanência da praga na planta, conforme demonstrado por Nondillo *et al.* (2010) (Nondillo *et al.*, 2012a; 2012b). Também pode ocorrer o transporte de cistos e ninfas por efeito de chuvas, que por meio de enxurrada carregam as formas infestantes de áreas com maior cota para áreas de menor cota (Hickel, 1998).

Até o momento não existe comprovação que a pérola-da-terra seja vetor de doenças em plantas. Porém, em situação de áreas com morte de plantas por pérola-da-terra, tem-se observado, de modo concomitante a presença do inseto, a existência de doenças fúngicas de solo, com prevalência da espécie *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten (Garrido & Sônego, 1999), principal causador da doença conhecida como podridão do pé da videira ou pé-preto (Garrido *et al.*, 2004a). Até o presente momento não existe uma forma eficaz de controle desta doença e não existe uma caracterização da sintomatologia que esse fungo pode promover nas plantas atacadas. Além disso, não há nenhuma evidência de que a pérola-da-terra possa atuar na infestação deste fungo em raízes de videiras.

2.2.3 Tolerância de porta-enxertos à pérola-da-terra

O uso de porta-enxertos tolerantes mostrou-se eficiente quando utilizado materiais da espécie *V. rotundifolia* (Botton & Coleta, 2010; Broetto *et al.*, 2011). Como esta espécie apresenta incompatibilidade genética ($2n=40$) com videiras comerciais ($2n=38$), como *V. vinifera* e *V. labrusca*, o uso de híbridos interespecíficos parece ser o caminho em busca de cultivares de porta-enxertos resistentes e compatíveis com as cultivares copas (Torregosa & Bouquet, 1995). Entretanto, híbridos de *V. rotundifolia* são de difícil multiplicação por métodos convencionais, como estaquia (Botelho *et al.*, 2005), e apresentam elevado vigor, o que acaba transmitindo para a cultivar copa, considerada característica indesejável para a produção de vinhos finos. Também, durante a fase de seleção dos materiais propícios ao desenvolvimento de resistência à pérola-da-terra, os materiais são cultivados em áreas com a presença da praga, porém a copa observada para o surgimento de sintomas foliares é sempre de cultivar do porta-enxerto (que muitas vezes não demonstra sintomas) e, sem a presença do enxerto na planta testada, a planta sobrevive sem manifestar redução no vigor (Botton & Coleta, 2010).

Questões sobre a estratégia de resistência e/ou tolerância da espécie *V. rotundifolia* ao ataque de pérola-da-terra são pouco estudadas. Sabe-se que insetos sugadores produzem tipos específicos de enzimas digestivas, contidas em glândulas salivares de seu aparato bucal, as quais são introduzidas nos tecidos da planta para facilitar a entrada dos estiletos alimentares no hospedeiro (Miles, 1999). Entre os diferentes tipos de enzimas já estudadas em insetos, destaca-se o grupo das pectinases, que atuam diretamente nos componentes pécticos da parede celular vegetal (Ma *et al.*, 1990). De maneira geral, a parede primária das células vegetais (dicotiledôneas) é rica em polissacarídeos pécticos, que são polímeros complexos e apresentam diferentes graus de metilesterificação (Willats *et al.*, 2001). O grau de metilesterificação tem influência sobre as propriedades gelificantes das pectinas e a ação de pectinases sobre os polissacarídeos (Sakai *et al.*, 1993). Quanto menor o grau de metilesterificação das pectinas, maior será a interação iônica das pectinas com cálcio, o que proporciona maior rigidez e resistência à degradação destes polímeros (Caffall & Mohnen, 2009). Com isso, estudos imunocitoquímicos com anticorpos monoclonais têm sido utilizados para mostrar a localização espacial e temporal de específicos sítios moleculares dos diferentes constituintes da parede celular (como metilesterificação), denominados de epitopos. Destas análises, podem ser selecionados parâmetros bioquímicos importantes

para caracterização de resistência em plantas a estresses bióticos (ex.: ataque de fungos e insetos). Anticorpos monoclonais já foram testados em diferentes espécies vegetais e demonstraram importantes resultados quanto à presença de metilesterificação e localização de pectinas na parede celular (Willats *et al.*, 2001).

2.2.4 Sintomas e danos

Até o momento, acredita-se que o definhamento de videiras atacadas por pérola-da-terra se deve apenas à sucção e/ou ação toxicogênica em decorrência da incompatibilidade bioquímica entre o inseto e a planta (Botton *et al.*, 2000). Argumentação esta amparada principalmente pelas diferentes origens do gênero *Eurhizococcus*, que é da América do Sul (Foldi, 2005) e das principais espécies de videiras comerciais, *V. vinifera*, da Europa e *V. labrusca*, da América do Norte (Giovanini, 2008). A suposição de co-evolução entre espécies (inseto - planta) também pode explicar a relação da praga com espécies nativas, como em goiabeira-serrana (*Acca sellowianna* Berg.), que é uma planta da família Myrtaceae e não apresenta danos quando infestada pela praga (Hickel & Ducroquet, 1995).

Em plantas de videira com sintomas ligados à presença da pérola-da-terra, as folhas apresentam clorose entre as nervuras, de maneira similar à deficiência de magnésio, e começam a encarquilhar, ocorrendo, em alguns casos, necroses nas bordas (Figura 3) (Hickel, 1998). Plantas com estes sintomas geralmente apresentam baixo vigor, entrenós curtos, entram em declínio, deixam de produzir e morrem (Figura 4).

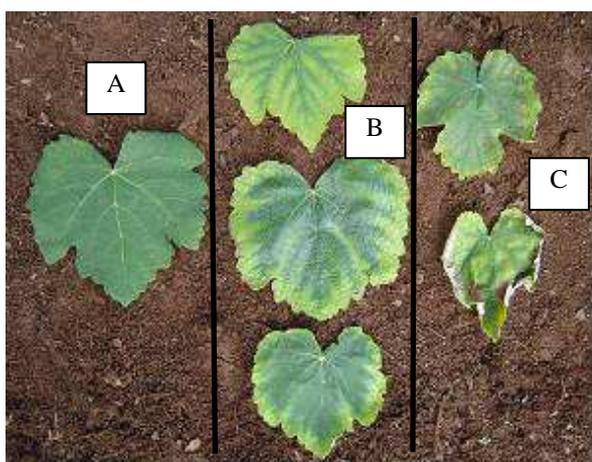


FIGURA 3. Folhas de videira (*V. labrusca*) sem sintomas (A), com sintomas de clorose (B) e necrose (C), atribuído à pérola-da-terra. Pinto Bandeira, jan/2005. (Foto: De César).



FIGURA 4. Videira (*V. labrusca*) em área infestada por pérola, com baixo vigor e entrenós curtos. Bento Gonçalves, nov/2010 (Foto: Zart).

Na maioria das vezes, no primeiro ano, as mudas já enxertadas se desenvolvem normalmente e atingem, no segundo ano, uma brotação fraca e desuniforme, ocorrendo sua morte a partir do terceiro ano (De Césaró, 2008). Plantas adultas, possivelmente por possuírem o sistema radicial mais desenvolvido (possibilidade de escape), demoram mais para morrer após a infestação da praga na área (Botton *et al.*, 2000).

Nas fases em que a pérola-da-terra se alimenta, estando fixa na planta, sabe-se que ela explora tecidos parenquimáticos das raízes (Foldi, 2005; De Césaró, 2008). Entretanto, pelo fato das folhas manifestarem os sintomas de clorose, supõe-se que há um efeito sistêmico deste ataque nas raízes. Resultados recentes, obtidos em plantas adultas de área comercial infestada por pérola-da-terra, salientam que esse inseto pode interferir diretamente no metabolismo de carbono nas folhas (De Césaró, 2008). As folhas cloróticas e necróticas, apesar de apresentarem grandes reduções de atividade fotossintética, apresentaram acúmulos extremos de amido, o que corrobora com a idéia de bloqueio do transporte de fotoassimilados destes órgãos produtores (folhas) para outras partes das plantas. Apesar desta evidência, não há certeza de que essa sintomatologia possa ser provocada exclusivamente pela pérola-da-terra. Entretanto, trabalhos com afídeos salientam que insetos sugadores podem intervir diretamente sobre o metabolismo de carbono (Miles, 1999), o que levanta a hipótese de uma toxina sistêmica da pérola-da-terra atuando nas folhas de videira.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condições experimentais

Os experimentos foram realizados em situações distintas de controle de infestação por pérola-da-terra, os quais corresponderam ao: I) ambiente de campo (sem controle), em um vinhedo comercial; II) ambiente de canteiros de alvenaria (com controle intermediário); e III) ambiente de casa-de-vegetação (com o máximo rigor de controle). A partir destes três ambientes, todo o material coletado foi levado para o laboratório para realização das análises. Estes três ambientes foram empregados de forma evolutiva, buscando minimizar as dificuldades encontradas no controle da interação entre pérola-da-terra e a planta hospedeira, para garantir plantas infestadas e não infestadas pela pérola, e também para se isolar o efeito da pérola sobre a videira.

3.1.1 Ensaio em vinhedo comercial infestado por pérola-da-terra

Nessa estratégia de ensaio, além de mimetizar os experimentos anteriormente realizados com pérola-da-terra com outros genótipos de videira (De César, 2008), buscou-se identificar *in loco* as variáveis que podem estar contribuindo para a sintomatologia de ataque deste inseto. Nesta prospecção foi selecionada uma propriedade comercial localizada na região vitícola de Pinto Bandeira/RS (latitude 29°05' S, longitude 51°26' O e altitude aproximada de 650 m) (Figura 5). Foram demarcados dois vinhedos com as cultivares *Vitis vinifera* 'Cabernet Sauvignon' e 'Cabernet Franc'. Ambas as áreas apresentavam plantas com sete anos (plantio em 2003), enxertadas sobre 'Paulsen 1103' (*Vitis berlandiere* x *Vitis rupestris*), espaçadas a 1,5 m entre plantas e 2,5 m entre linhas e conduzidas no sistema latada.

Para cada cultivar foram marcadas 34 plantas, considerando 12 plantas sem a presença de pérola-da-terra nas raízes e 22 com a presença da praga. O objetivo do maior número de plantas marcadas com pérola-da-terra foi devido a possibilidade de morte de plantas, não permitindo número suficiente de repetições nas futuras avaliações.

Também, devido a necessidade de um maior número de plantas com possibilidades de manifestar os sintomas característicos do ataque da pérola-da-terra, principalmente nas folhas. Para a seleção de cada grupo de plantas (infestado e controle), cada planta foi submetida a uma análise visual das raízes após remoção de uma parte do solo no entorno do tronco (0,4 m de profundidade por 1,0 m de diâmetro) (Figura 6). Nesta seleção inicial também foram considerados a distribuição das plantas na área, buscando-se uma aleatorização, e as características de crescimento dos ramos do ciclo anterior.



FIGURA 5. Localização das áreas de videira (*V. vinifera*) ‘Cabernet Sauvignon’ (A) e ‘C. Franc’ (B). Pinto Bandeira, ago/2010 (Imagem: Google Earth).



FIGURA 6. Avaliação da infestação de pérola em raízes de videira a campo. Pinto Bandeira, ago/2010 (Foto: Zart).

Entre os dias 23 e 24 de agosto de 2010 foi realizada a poda das plantas, deixando-se sete varas e 25 esporões, numa soma total de 100 gemas por planta. Neste momento da poda, foram coletados três ramos de cada planta e levados para laboratório, com 12 gemas cada ramo, para avaliação de crescimento e morfologia. Os ramos coletados de cada planta foram avaliados em laboratório quanto ao comprimento (tomando-se a medida entre as gemas terminais com régua graduada), diâmetro (no entrenó mediano utilizando paquímetro digital, marca Digimess, modelo 100.174 BL) e massas fresca e seca, medidas em balança digital (precisão de 0,01g, marca Deltarange Mettler, modelo PC 4400). Para massa seca os ramos foram desidratados em estufa de passagem de ar forçada a 60 ± 5 °C, por 120h.

Durante a brotação, entre os dias 13 e 15 de outubro de 2010, foi registrado a evolução do percentual de brotação das plantas marcadas, considerando-se gema brotada aquelas em estágio de ponta-verde, ou ‘0’ na escala de Lorenz *et al.*, (1995)

(Figura 7), separando-se essa informação por gemas da vara e dos esporões. A partir desta fase inicial foram efetuadas avaliações semanais nas duas áreas, ao longo do desenvolvimento das plantas, registrando-se o crescimento, desenvolvimento e o surgimento de sintomas foliares.



FIGURA 7. Estádio de ponta verde. Pinto Bandeira, ago/2010 (Foto: Zart).

No dia 17 de novembro de 2010, após o desenvolvimento de sintomas foliares, foram separados três grupos de plantas na área da ‘Cabernet Franc’: **1)** plantas controle e sem sintomas de pérola-da-terra (SP); **2)** plantas infestadas, mas sem sintomas foliares de pérola-da-terra (P); e **3)** plantas infestadas e com sintomas foliares (PD). Neste mesmo dia, foi realizada avaliação do potencial fotossintético das plantas de cada grupo citado, em duas folhas por planta, marcadas previamente, com duas plantas para cada grupo. Essas avaliações foram efetuadas no período das 9h as 14h, utilizando-se um analisador portátil de fotossíntese, marca Li-Cor, modelo LI-6400, equipado com fonte artificial de radiação fotossinteticamente ativa (RFA), modelo LI-6400-2B. Cada folha foi submetida a um gradiente de radiação nos níveis de 0, 100, 200, 400, 800, 1000, 2000 e 2500 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Nestas áreas também foram coletadas partes de raízes, ramos e folhas das plantas, considerando os três grupos sintomáticos avaliados, os quais foram levados para o laboratório para se diagnosticar a presença ou ausência de outros organismos causadores de doenças (como fungos e vírus). A análise foi realizada nos laboratórios de fitopatologia e virologia da Embrapa Uva e Vinho, seguindo os protocolos de análises para as principais doenças fúngicas (Sônego & Garrido, 1999; Garrido *et al.*,

2004b) e viróticas (Fajardo *et al.*, 2000; Basso *et al.*, 2010b) de ocorrência na região da Serra Gaúcha.

3.1.2 Ensaio em canteiros infestados e não infestados por pérola-da-terra

Considerando que em vinhedos comerciais existem dificuldades de garantir o controle da infestação da pérola-da-terra, apesar das precauções adotadas, e não apresentam as mesmas condições edafoclimáticas para diferentes contrastes de genótipos, foram montados ensaios em canteiros com infestação induzida. Foram utilizados canteiros de alvenaria (0,9 m x 11,4 m por 1,0 m de altura cada) (Figura 8), distanciados 2,2 m entre sí, construídos em disposição leste oeste, na área experimental do Centro Nacional de Pesquisa Uva e Vinho, da Embrapa de Bento Gonçalves, RS (latitude 29°12'S, longitude 51°32'W e altitude aproximada 605m) (Figura 9).

Os canteiros foram separados para o desenvolvimento de dois experimentos distintos (Figura 10), os quais serão detalhados separadamente na sequência.



FIGURA 8. Características dos canteiros de alvenaria utilizados, com estruturas para suporte do sombrite, arames de sustentação, hastes para condução das plantas e irrigação. Bento Gonçalves, mar/2010 (Foto: Zart).



FIGURA 9. Imagem da localização dos canteiros (retângulo vermelho) na sede da Embrapa Uva e Vinho – Bento Gonçalves, ago/2010 (Imagem: Google Earth).

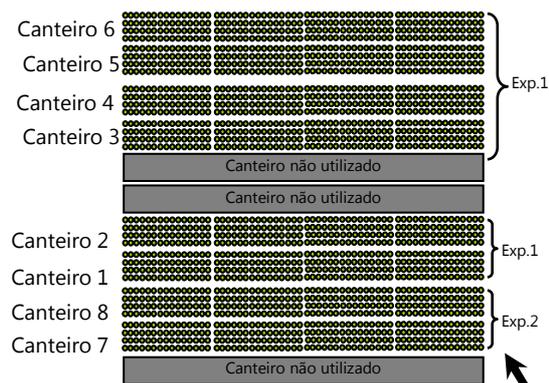


FIGURA 10. Croquis da área utilizada nos experimentos, com a numeração dos canteiros. Bento Gonçalves, abr/2009 (Imagem: Zart).

3.1.2.1 Experimento 1 - Comportamento de mudas de videiras em canteiros com e sem infestação por pérola-da-terra

O experimento foi realizado com seis canteiros (canteiros numerados de um a seis, Figura 10) separados em três pares (blocos), sendo três canteiros com a presença de pérola-da-terra (infestados) e três canteiros sem o inseto (controle). Previamente ao plantio das mudas nos canteiros foram coletadas amostras de solo, separadamente, e analisadas quimicamente quanto aos valores de fertilidade, conforme Tedesco *et al.*, (1995), em agosto de 2009, no Laboratório de Análise de Solo e Tecidos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Devido aos elevados valores apresentados pelas análises no teor de cobre e por haver diferenças quantitativas de argila, matéria orgânica e de nutrientes do solo nos canteiros (Tabela 1, análise de junho), foi realizada uma homogeneização entre canteiros de cada bloco, e adicionado uma parte de solo para diluir o excesso de cobre. Não houve necessidade de se fazer correção para fertilidade após homogeneização (Tabela 1, análise de janeiro).

Após homogeneização do solo entre canteiros foi efetuada uma fumigação preventiva, para evitar a ocorrência de pérola-da-terra nos canteiros controle. Para tanto, em dezembro de 2009, o canteiro controle de cada bloco foi coberto por lona plástica preta e fumigado com Gastoxin® B57 (seis gramas do produto comercial por m³ de solo), permanecendo cobertos pela lona plástica por um período de 120 horas para garantir o controle total dos insetos. Após a retirada da lona dos canteiros o solo foi novamente revolvido e preparado para o plantio das mudas.

TABELA 1. Resultados das análises de solo dos canteiros (1 ao 8) em duas diferentes datas de coleta (jun/2009 e jan/2010) com os valores de pH (em H₂O); percentuais de Argila e Matéria Orgânica (MO) (%); teores de fósforo (P), potássio (K), enxofre (S), zinco (Zn), cobre (Cu), boro (B) e manganês (Mn) em mg/dm³; cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em cmolc/dm³. Bento Gonçalves, jan/2010.

Amostra/ Canteiro	Data/ Análise	pH (H ₂ O)	Argila (%)	MO (%)	Ca (cmolc/dm ³)	Mg (cmolc/dm ³)	P	K	S	Zn	Cu	B	Mn
1	jun/09	5,8	43,0	3,6	12,9	5,3	>100	173	9,3	29,0	12,0	0,6	4,0
2		6,1	38,0	4,3	12,6	4,1	>100	289	6,2	63,0	52,0	0,8	5,0
3	jun/09	6,5	30,0	3,9	13,0	4,3	>100	260	5,5	34,0	45,0	1,4	7,5
4		6,3	27,0	5,0	15,9	6,3	>100	>400	13,1	62,0	19,5	3,0	1,5
5	jun/09	6,6	35,0	5,1	17,3	6,4	>100	>400	8,4	74,0	23,0	1,8	1,5
6		6,5	24,0	4,8	15,8	9,2	>100	>400	17,0	100,0	11,0	3,0	2,0
7	jun/09	5,5	39,0	3,3	11,8	4,3	>100	206	7,3	21,0	8,6	0,6	8,0
8		5,6	38,0	3,0	12,9	4,6	>100	327	10,0	22,0	11,0	0,6	7,0
1	jan/10	5,5	33,0	3,1	10,5	3,0	>100	261	12,0	21,0	8,6	0,4	23,5
2		5,5	26,0	3,0	10,5	3,5	>100	254,5	13,5	20,0	11,0	0,4	42,5
3	jan/10	5,5	24,0	2,8	9,7	2,3	>100	201	11,5	11,5	9,6	0,3	37,0
4		6,2	18,5	3,4	10,4	3,6	>100	301,5	6,1	21,0	27,5	0,4	21,0
5	jan/10	6,4	22,0	3,1	11,8	3,0	>100	266	5,3	24,5	32,0	0,4	23,5
6		6,4	22,0	3,7	11,8	4,0	>100	254,5	5,2	23,0	35,0	0,5	24,5
7	jan/10	6,4	24,0	3,7	12,2	3,4	>100	>400	7,1	34,0	24,0	0,7	19,0
8		6,5	21,0	3,7	11,9	4,5	>100	362	7,0	24,5	27,5	0,5	15,5

O plantio das mudas ocorreu entre os meses de janeiro e abril de 2010, considerando a disponibilidade de cada genótipo (aquisição das mudas e multiplicação em laboratório). As mudas foram plantadas em espaçamento de 0,23 m entre plantas por 0,18 m entre linhas nos canteiros, com quatro linhas divididas por quatro parcelas amostrais (Figura 11). As plantas utilizadas foram: goiabeira-serrana (*A. sellowiana*), ‘Paulsen 1103’ (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*), ‘Isabel’ (*Vitis labrusca*), ‘Cabernet Sauvignon’ (*Vitis vinifera*), híbrido ‘548-15’ (*V. rotundifolia* x *V. labrusca*) e híbrido ‘1110-13’ (*V. rotundifolia* x *V. vinifera*).

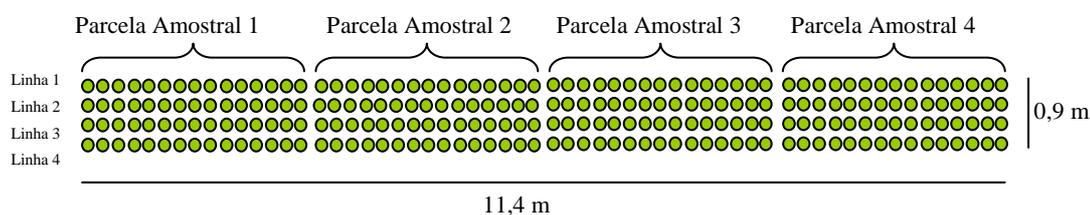


FIGURA 11. Distribuição das plantas (representados pelos pontos amarelos), das linhas e das parcelas dentro do canteiro. Bento Gonçalves, jan/2010 (Imagem: Zart).

Plantas de goiabeira-serrana (*A. sellowiana*) foram multiplicadas por sementes, coletadas em Bento Gonçalves entre janeiro e fevereiro de 2009. A semeadura foi realizada em bandejas de isopor (0,68 x 0,35m por 0,12 m de altura), próprias para

semeadura, e ficaram acondicionadas em casa de vegetação durante o desenvolvimento de plântula (mar/2009 – fev/2010), até o transplante para os canteiros.

A cultivar ‘Paulsen 1103’ foi adquirida de viveiro comercial (estacas enraizadas) e ‘Isabel’ em casa-de-vegetação na Embrapa Uva e Vinho, ambas multiplicadas por estaquia. As cultivares ‘C. Sauvignon’, ‘548-15’ e ‘1110-13’ foram multiplicada em laboratório, por cultura de tecidos. A multiplicação ocorreu no Laboratório de Cultura de Tecidos, localizado na Embrapa Uva e Vinho, através da propagação de meristemas conforme Castro *et al.*, (1994) e Bernd *et al.*, (2007). Esta técnica de multiplicação foi necessária devido a dificuldades encontradas para multiplicação de materiais de *V. rotundifolia* e seus híbridos por métodos tradicionais, como a estaquia (Botelho *et al.*, 2005), como também para garantia de limpeza das mudas de vírus. A multiplicação deste material necessita de um período para aclimação. Devido a isso, após o crescimento inicial das plântulas em laboratório, em tubo de ensaio contendo meio de enraizamento (Galzy acrescido de $8,05 \text{ mM} \cdot 10^{-3}$ de ANA, 3% de sacarose e 0,8% de ágar, pH 6,4), as mudas passaram para copos de plástico (300 ml), com mistura de substrato vermiculita:plantmax® (2:1), cobertos por copos transparentes e com diferentes regimes de troca gasosa (copos fechados, com um, três e cinco furos). Após duas semanas nestas condições, as mudas foram para casa de vegetação com umidade ($70 \pm 10 \%$ UR), temperatura ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e luz controlada (com sombrite). Após 20 dias nestas condições as mudas foram transplantadas para sacos plásticos furados (capacidade de um litro) com mistura de substrato (vermiculita:plantmax®:solo na proporção 1:2:3, respectivamente), previamente esterilizado, e transferidas para casa de vegetação com controle de luz (com sombrite). Após 60 dias as mudas foram transplantadas para os canteiros.

Goiabeira-serrana, ‘Isabel’ e ‘Cabernet Sauvignon’ foram plantadas em número de 16 por canteiro, enquanto ‘Paulsen 1103’, ‘548-15’ e ‘1110-13’ foram em número de 48 plantas por canteiro. O uso de um número maior para estes materiais foi devido a finalidade de se enxertar em 1/3 de cada material com ‘Cabernet Sauvignon’, 1/3 de ‘Isabel’ e no 1/3 restante as plantas permaneceram em pé franco (sem enxertia), com o intuito de se comparar o efeito de diferentes copas num mesmo porta-enxerto. Essa enxertia ocorreu em setembro de 2010, pelo método de fenda simples, prendendo-se com ramo de vime o local da soldadura (Figura 12), protegida com um copo plástico cheio de serragem úmida para não ocorrer desidratação (Figura 13). Este copo permaneceu no local da enxertia até janeiro de 2011. Os materiais ‘548-15’ e ‘1110-13’

não puderam ser enxertados devido não alcançarem diâmetro suficiente para realização da enxertia. Para condução das plantas foi instalada uma haste de ferro em cada planta, sendo esta haste amarrada em um fio de arame esticado sobre a linha de plantio (num total de quatro fios por canteiro).



FIGURA 12. Enxertia de fenda simples, amarrada com vime. Bento Gonçalves, set/2010 (Foto: Kuhn).



FIGURA 13. Local da enxertia protegida com serragem em copo plástico, para não desidratar. Bento Gonçalves, dez/2010 (Foto: Zart).

A escolha dos materiais vegetativos utilizados neste experimento foi devido às diferenças observadas de tolerância entre as espécie/cultivares e ao ataque de pérola. Goiabeira-serrana, que é nativa da América do Sul como a pérola-da-terra, apresenta registros de que não sofre alterações pelo ataque da praga, mesmo em grandes infestações (Hickel & Ducroquet, 1995). Híbridos da espécie *V. rotundifolia* foram testados por mais de dez anos em ambientes infestados por pérola-da-terra na Embrapa Uva e Vinho e os materiais '548-15' e '1110-13' foram promissores, apresentando alto e médio vigor de copa, respectivamente (Camargo, informação verbal). A cultivar 'Isabel' é uma das cultivares mais utilizadas comercialmente em plantios com mudas franqueadas (sem utilização de porta-enxerto) e 'Paulsen 1103' é o porta-enxerto mais utilizado na Serra Gaúcha, porém ambos apresentam suscetibilidade ao ataque de pérola-da-terra (Schuck *et al.*, 2001; Botton *et al.*, 2009).

Para evitar a queima das plantas pelo sol no momento do plantio foi instalada uma cobertura de sombrite em janeiro de 2010 (com 25% de bloqueio de luz, Figura 8), com a sua retirada em setembro de 2011, quando as plantas já estavam formadas. Foi realizado monitoramento do conteúdo de água nos canteiros com sensor de barra, por campos eletromagnéticos, modelo PR2, da marca Delta-T Devices Ltda, acionando a irrigação por gotejamento até quando o teor de água ultrapassasse $0,1 \text{ m}^3.\text{m}^{-3}$. Também foi realizado controle manual de plantas concorrentes e controle químico, com pulverizador costal, de outras pragas, como ácaro branco, *Polyphagotarsonemus latus* (Banks, 1904) (Acari: Tarsonemidae), e de míldio, *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni, 1888.

Nos canteiros definidos como infestados por pérola-da-terra, foram realizadas infestações entre os meses de janeiro a março de 2010 e 2011, com as coletas realizadas em um vinhedo comercial com histórico de pérola-da-terra, localizada em Flores da Cunha, RS (latitude $29^{\circ}01'S$, longitude $51^{\circ}10'W$ e altitude aproximada 750m). Os cistos de pérola foram coletados pela remoção do solo no perfil das raízes das videiras, coletando-se solo com cistos de coloração branca, fase em que há ovos e ninfas em seu interior, e levados ao laboratório em recipientes devidamente fechados. Para as infestações foi empregado solo, misturado com cistos, ovos e ninfas de pérola, adicionando na cova do plantio e sobre o perfil do canteiro, após plantio das mudas. Juntamente com a pérola foi realizada infestação com colônias de formigas argentinas (*Linepithema micans*) em fevereiro e agosto de 2010 e março de 2011, coletadas na mesma propriedade. Cada infestação com formiga foi realizada com oito colônias por canteiro, havendo em cada colônia aproximadamente cinco rainhas. Em ambas as coletas (pérola e formiga) houve auxílio da equipe do Laboratório de Entomologia da Embrapa Uva e Vinho para coleta, realização da triagem dos cistos e identificação das formigas.

No primeiro ano de brotação, ciclo 2010/11, o manejo nos canteiros foi de poda de formação, deixando-se uma brotação por planta. A brotação principal foi conduzida até o arame da haste de sustentação da planta, a qual a planta foi amarrada, numa altura de aproximadamente 1,2 m, realizando-se poda verde de desponte, no ramo principal, e nos ramos “ladrões” (feminelas), conforme brotavam nas plantas.

Foi realizada avaliação do potencial fotossintético das plantas da cultivar ‘Isabel’, no dia 02/02/2011, utilizando três plantas por canteiro, o que totalizou nove plantas de cada grupo de canteiros (com e sem infestação). As plantas foram marcadas

previamente, com as avaliações efetuadas no período das 9h as 14h, utilizando-se um analisador portátil de fotossíntese, conforme citado no item 3.1.1. Cada folha foi submetida a um gradiente de radiação nos níveis 0, 100, 200, 400, 800, 1000, 2000 e 2500 μmol de fotons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Foi realizada análise somente nesta cultivar ('Isabel') devido às demais cultivares apresentarem sintomas de danos nas folhas, ocasionados por ácaro-branco, filoxera e míldio.

Entre os dias 26 de setembro e 6 de outubro de 2011 foi realizada poda nas plantas destes canteiros, coletando-se os ramos para ser realizada análise morfológica de crescimento, em laboratório, como também, tomada a medida do diâmetro do colo das plantas de videira, nos canteiros. Nos ciclos 2010/2011 e 2011/2012 as plantas foram observadas quanto ao surgimento de sintomas foliares e diferenças nos crescimentos das brotações.

Entre janeiro e fevereiro de 2012, duas plantas de cada genótipo foram coletadas dos canteiros 2, 4 e 6 (canteiros com infestação de pérola), com raízes, para observação do grau de infestação por pérola-da-terra, contando-se o número de cistos nas raízes.

3.1.2.2 Experimento 2

a) Avaliação de mudas formadas de estacas de plantas de 'Paulsen 1103' cultivadas em canteiros com e sem a infestação de pérola-da-terra

Entre os sintomas observados em videiras infestadas por pérola-da-terra, a redução no vigor pode ter conseqüências na formação dos ramos produtivos, o que causa danos econômicos pela redução em flores e frutos. Como a videira é multiplicada principalmente por estaquia, em plantas matrizes a redução do vigor dos ramos (estacas) é diretamente relacionada à perda de produção e, conseqüentemente, dano econômico para o viveirista produtor de mudas. Para elucidar se existe baixa viabilidade em estacas de videiras infestadas por pérola-da-terra, buscou-se avaliar a influência da infestação de pérola-da-terra no desenvolvimento de plantas matrizes de 'Paulsen 1103' e na propagação do material vegetativo oriundo destas.

O experimento foi realizado nos canteiros 7 e 8 (figura 10), com mudas enraizadas de 'Paulsen 1103' transplantadas em número de 30 por canteiro, em abril de 2009, com o canteiro infestado por pérola-da-terra desde 2005 (De César, 2008). Em cada canteiro as plantas foram marcadas e, quando realizada a poda (15 de setembro de 2011) foram coletados quatro ramos (com 12 gemas cada) de cada planta para as

avaliações. Os ramos foram subdivididos em três estacas, denominadas basal, mediana e apical (Figura 14). Cada estaca foi avaliada quanto ao crescimento e morfologia, medindo o diâmetro, comprimento e massas (fresca e seca), conforme citado no item 3.1.1. Para massa seca foram utilizados dois ramos por planta, utilizando-se os outros dois ramos para avaliação de brotação e formação da muda.

Para a avaliação de brotação foi realizado plantio das estacas frescas, em copos plásticos (Figura 15), com quatro gemas cada em substrato (mistura solo: plantmax®: vermiculita, na proporção de 3:2:1). As estacas plantadas foram acondicionadas em casa-de-vegetação avaliando-se a brotação 30 dias após o plantio, que foi realizada considerando-se como estaca brotada aquela que apresentasse pelo menos uma gema em estágio de ponta verde (Figura 7). Após 120 dias do plantio as mudas foram avaliadas quanto ao número de estacas brotadas, número de brotações por estaca, número de gemas por brotação e comprimento total das brotações. Após estas avaliações as estacas foram retiradas do substrato, avaliando-se o número de raízes primárias da estaca, comprimento das duas maiores raízes (com auxílio de régua) e massa total das raízes (com balança semianalítica, citada anteriormente).



FIGURA 14. Ramo subdividido em três estacas com quatro gemas cada: basal (A), mediana (B) e apical (C). Bento Gonçalves, set/2011 (Foto: Zart).



FIGURA 15. Estaca plantada em copo plástico com substrato. Bento Gonçalves, out/2011 (Foto: Zart).

Após serem secas as estacas foram trituradas em moinho de Willei, acoplado a peneira de 40 mesh, com o material moído novamente em almofariz com nitrogênio líquido, até a formação de uma amostra coloidal. Com esta amostra foi realizado análise de amido, conforme adaptação do método descrito por Amaral *et al.*, (2007). Para cada parcela foram utilizadas 300 mg de peso seco (alíquotas de 100mg cada), adicionando-

se 3 ml (1 ml.triplicata⁻¹) de etanol 80% e incubando-as em banho-maria a 80°C por 20 min com agitações a cada 10 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 13400g por 5 min em temperatura ambiente, repetindo-se estas etapas quatro vezes e descartando-se as frações dos sobre-nadantes. Após o último descarte do sobre-nadante, o precipitado resultante foi mantido em estufa a 60°C por 12 h, para a evaporação do etanol, e em seguida, adicionado 500 µL de água destilada para ressuspender o precipitado. Na sequência foram adicionados 100µL de enzima α -amilase (3000 U.mL⁻¹, Megazyme) por amostra, incubando-se em banho-maria a 80°C por 60 min., sob agitação a cada 20 min. Após incubação, adicionaram-se 500 µL de solução de acetato de sódio 0,03 M, pH 4,8, e 30 µL de amiloglucosidase (3260 U.mL⁻¹, Megazyme), incubando-se em banho-maria a 50°C por 30 min sob agitação. Na etapa seguinte foram adicionados 500 µL de ácido perclórico 0,8 M, agitando-se vigorosamente e centrifugando-se a 13400 g por 5 min em temperatura ambiente. A partir dos sobrenadantes, foi determinada a concentração de glicose proveniente da degradação enzimática do amido, utilizando-se 10 µL de amostra acrescidos de 10 µL de água destilada e 150 µL de GOD POD (Glicose PAP Liquiform). Cada mistura foi depositada em microplaca de titulação (96 poços) de fundo plano, incubada a 30°C por 15 min e submetida a leitura da absorbância em 490 nm. A concentração de glicose obtida em cada amostra foi multiplicada por 0,9 para obtenção da concentração de amido.

b) Avaliação de diferentes copas enxertadas sobre ‘Paulsen 1103’ em canteiros com e sem a infestação por pérola-da-terra

Os principais sintomas atribuídos ao ataque da pérola-da-terra em videira são observados nas folhas das plantas atacadas (Figura 3). Empiricamente é atribuído que cultivares das espécies *V. vinifera* e *V. labrusca* apresentam maior suscetibilidade para manifestarem sintomas nas folhas, quando comparadas com cultivares de porta-enxerto, reconhecidamente menos suscetíveis ao ataque de pragas e doenças (Souza & Martins, 2002). Com o intuito de se avaliar diferentes cultivares/espécies de videiras, quanto ao crescimento e atributos fisiológicos, este experimento foi realizado com plantas em condições controladas de infestação por pérola-da-terra, utilizando canteiros de alvenaria (Figura 8).

Nas mesmas plantas dos canteiros 7 e 8 (Figura 10), cultivar ‘Paulsen 1103’, das quais foram coletados os ramos do experimento anterior (sub item 3.1.2.2, a), foi avaliado o desenvolvimento de diferentes copas de videiras em condições de infestação

e não infestação por pérola-da-terra. Destas plantas, após a poda (setembro de 2011), foram conduzidas quatro brotações por planta para a realização de enxertia verde, realizada em 21/12/2011 (Figura 16). Os materiais enxertados foram: híbrido ‘548-15’ (*V. rotundifolia* x *V. labrusca*), considerado tolerante ao ataque de pérola; ‘Isabel’ (*V. labrusca*) e ‘Cabernet Sauvignon’ (*V. vinifera*), ambas consideradas suscetíveis; e a própria cultivar de porta-enxerto ‘Paulsen 1103’ (*V. rupestris* x *V. berlandieri*). A enxertia verde foi realizada utilizando-se fenda simples, com garfos de uma gema, com o enxerto amarrado e protegido por papel film (Magipac®), deixando duas folhas do porta-enxerto no ramo enxertado (Figura 17).



FIGURA 16. Videira ‘Paulsen 1103’ em canteiro com quatro diferentes copas enxertadas (círculos vermelhos). Bento Gonçalves, dez/2011. (Foto: Zart).



FIGURA 17. Enxerto verde realizado em 21/12/2011 sobre ‘Paulsen 1103’, cultivado em canteiro. Bento Gonçalves, dez/2011. (Foto: Zart).

Cada enxerto foi conduzido por um ramo, eliminando-se os demais, juntamente com as feminelas. O desponte foi realizado quando o ramo ultrapassasse a altura máxima de 1,2 m (altura do arame).

No dia 20 de março de 2012 foram separadas oito plantas, quatro em cada canteiro (com e sem pérola), para avaliação do potencial fotossintético, com cada folha avaliada submetida a um gradiente de radiação nos níveis 0, 150, 400, 800, 1500, e 2500 $\mu\text{mol de fons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, conforme sub item 3.1.1. Também, em cada folha utilizada para avaliação fotossintética, foi medido o índice de clorofila falker (ICF) com o medidor portátil de clorofila (marca Falker, modelo Clorofilog - 1030) o qual pode-se estimar a concentração de clorofilas de uma amostra por modelos matemáticos (FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA LTDA, 2008). Em cada planta foram separadas quatro folhas, uma de cada cultivar, totalizando 32 folhas no dois canteiros

(16 com pérola e 16 sem pérola). A análise foi realizada entre os horários das 9:30 e 15:30 horas, de um dia ensolarado. Em seguida, a parte aérea (ramos e folhas) das plantas avaliadas foi coletada, separadas por enxerto, e avaliadas quanto ao crescimento e morfologia, tomando-se as medidas do comprimento, diâmetro e massas (fresca e seca) dos ramos e a área foliar e massas (fresca e seca) das folhas. A avaliação da área foliar foi realizada com medidor de área foliar (marca Licor; modelo Li - 3000), calculando-se a média por folha. As demais avaliações foram realizadas conforme citado no sub item 3.1.1. Os resultados foram transformados em médias de entrenó e folha, devido diferenças no número destes parâmetros nos materiais coletados.

As estacas e folhas secas foram processadas e submetidas à análise de amido, conforme citado anteriormente (subitem 3.1.2.2, a).

A avaliação do grau de infestação das plantas foi realizado em 22/03/2012, procedendo a remoção inteira das plantas marcadas dos canteiros. Para isso, o solo foi removido das raízes, com auxílio de pá de corte, num raio de 20 cm da planta, coletando-se as raízes e contado o número de pérolas das plantas do canteiro infestado. As plantas foram levadas para o Laboratório de Fisiologia, da Embrapa Uva e Vinho, para avaliação do diâmetro do colo (com paquímetro), massas fresca e seca das partes aéreas (ramos e caule) e do sistema radicial.

Para cada planta foi separada uma porção de raízes (aproximadamente 5g) padronizadas com 0,5 cm de diâmetro, congelada com nitrogênio líquido (-190° C) em tubos falcon (50mL). Com estas amostras foi realizada análise da atividade das enzimas peroxidases (GPx) e polifenoloxidasas (PPO). Cada porção de raiz foi macerada a frio (com nitrogênio líquido em almofariz e pistilo) até formar uma massa coloidal, a qual foi amostrada para extração, na proporção de 1:5 m/v de proteínas solúveis em tampão PBS (100mM, 2%PVP, PMSF 1mM, pH 8,0). Após filtração em pano de trama fina, a solução foi centrifugada a 13000 x g por 15 min e o sobrenadante recuperado. Todos os passos foram executados a 0-4°C. A proteína solúvel contida nos sobrenadantes foi aferida conforme Bradford (1976), usando um padrão de albumina sérica bovina (BSA). A atividade de peroxidases (GPX) foi determinada pela adição de 25µl do extrato enzimático ajustado para 2 mL de uma solução contendo acetato de sódio 50 mM pH 5,2, guaiacol 20mM e peróxido de hidrogênio 20 mM. Após incubação em 30°C por 10 min, a absorbância foi medida a 480 nm (Urbanek *et al.*, 1991). Uma unidade de GPX foi expressa como variação de uma unidade de absorbância (480nm) por miligrama de proteína solúvel por minuto (D480nm mgP⁻¹ min⁻¹). A atividade de polifenoloxidasas

(PPO) foi determinada pela adição de 50µl do extrato enzimático ajustado para 3 mL de uma solução contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,5 e pirocatecol a 25 mM. Após 10 min a 30°C, foi medido o acréscimo da absorbância a 410 nm (Gauillard *et al.*, 1993). Uma atividade de PPO foi expressa pela variação de uma unidade de absorbância (410nm) por miligrama de proteína solúvel por minuto ($D_{410nm} \text{ mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$). As análises de enzimas foram realizadas nos Laboratórios de Fisiologia Vegetal e de Biotecnologia da Embrapa Uva e Vinho.

3.1.3 Ensaios em casa de vegetação com monitoramento de infestação

Os ensaios com infestação controlada e monitorada foram realizados em casa-de-vegetação, localizada na Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, com plantas de videira e goiabeira-serrana cultivadas em gaiolas de Gallotti (Gallotti, 1976). A casa de vegetação utilizada se caracteriza por uma estrutura com aproximadamente 50 m² de área útil, coberta com telhas transparentes, pé direito de 2,5 m, piso e bancadas de concreto (0,8 m largura, 3,0 m comprimento, 1,2 m de altura) e paredes laterais fechadas com tela antiáfídica (malha de 0,2 mm) (Figura 18).



FIGURA 18. Casa de vegetação utilizada nos experimentos em ambiente controlado. Bento Gonçalves, mar/2012 (Foto: D. Sousa).

As plantas utilizadas nesta condição tiveram um rigoroso controle de sanidade durante a sua multiplicação (efetuada *in vitro*, no laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Uva e Vinho, conforme sub item 3.1.2.1. Além disso, nestes ensaios foram controlados a nutrição e sanidade dos substratos utilizados, controle de pragas da parte aérea e controle na irrigação das plantas. Com isto, objetivou-se avaliar os sintomas

relacionados com as injúrias ocasionadas pela pérola-da-terra em plantas sadias de videiras (diferentes materiais genéticos) e goiabeira-serrana livre de outras interferências do ambiente de cultivo.

Para possibilitar o monitoramento das raízes e, conseqüentemente, da infestação de pérola-da-terra, as plantas foram cultivadas em gaiolas de Gallotti. Estas gaiolas correspondem a uma estrutura desenvolvida para a realização de estudos que necessitam de ampla visualização do sistema radicial e/ou suas relações com o meio subterrâneo (Gallotti, 1976). É basicamente uma estrutura de madeira (0,45m altura x 0,40m largura x 0,04m espessura, Figura 19) com a extremidade inferior fechada e a superior aberta, por onde foram introduzidos o substrato, a planta, a infestação com insetos e realizada a irrigação. As paredes internas são fechadas com vidro, fixado com suportes de madeira parafusados, permitindo a visualização e manipulação do ambiente das raízes quando necessário (Figura 20). Sobre o vidro foi colocado um revestimento de chapa de fibra de madeira (Eucatex®), para impedir a entrada de luz nas raízes. Para a desinfecção das gaiolas, depois de desmontada, todas as partes passaram por uma lavagem com água e detergente neutro. Após estarem secas, nas partes da estrutura ainda desmontadas foi pulverizado uma solução de hipoclorito a 2%, com a intenção de eliminar possíveis inóculos contaminantes para as plantas (principalmente fungos e bactérias).



FIGURA 19. Gaiola de Gallotti com detalhes das suas medidas. Bento Gonçalves, mar/2011 (Foto: Zart).



FIGURA 20. Gaiola de Gallotti aberta (sem eucatex), mostrando o vidro com vista do solo e raízes. Bento Gonçalves, mar/2011 (Foto: Zart).

O substrato utilizado para o plantio das mudas foi composto de 2 partes de plantmax® e 3 partes de solo. Antes da mistura, cada parte do substrato foi esterilizada em autoclave (30 minutos a 120°C, 1,5 atm, repetido por três vezes), misturando-os em seguida. Após o substrato ser homogeneizado, coletou-se uma amostra para análise de nutrientes no Laboratório de Análise de Solos e Tecidos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Tabela 2).

TABELA 2. Análise do substrato utilizado para cultivo de videiras em gaiola de Gallotti, quanto ao pH (em H₂O); argila (%) e matéria orgânica (MO, em %); fósforo (P), potássio (K), enxofre (S), zinco (Zn), cobre (Cu), boro (B) e manganês (Mn) em mg/dm³; cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em cmolc/dm³. Bento Gonçalves, dez/2010.

Parâmetro/	pH	Argila	MO	P	K	S	Zn	Cu	B	Mn	Ca	Mg
Unidade	H ₂ O	%		(mg/dm ³)								(cmolc/dm ³)
Valor	6,5	20	10,2	>100	284	13	17	20	1,8	3,6	12,7	5,7

A temperatura e a umidade no interior da casa de vegetação foram monitoradas através de um termohigrógrafo de penas gráficas (marca LAMBRECHT, modelo 252). As plantas foram irrigadas três vezes por semana, no período de outubro de 2009 e dezembro de 2011, utilizando aproximadamente 300 mL por gaiola. Esta frequência foi alterada a partir de janeiro de 2012, quando as plantas estavam maiores e as temperaturas superiores (período de primavera-verão), sendo ajustado para 300 mL por dia e, em dias que apresentaram a umidade do ar muito baixa (menor 50%), repetiu-se esse volume duas vezes ao dia (manhã e tarde). Para o ajuste da umidade no substrato, utilizou-se um sensor em barra, com monitoramento da água por campos eletromagnéticos (modelo PR2, da marca Delta-T Devices Ltda). Além disso, foi efetuado monitoramento do potencial hídrico das folhas com a utilização de uma câmara de pressão (Scholander *et al.*, 1965). Esse monitoramento foi efetuado ao longo de dois ciclos diários, em intervalos de duas horas, após a adição de diferentes volumes de água, ajustando-se o volume que mantivesse a condição hídrica mais estável no vaso (gaiola), sem restrição hídrica para a videira (Ojeda *et al.*, 2004).

3.1.3.1 Avaliação sintomática, bioquímica e morfo-fisiológica de plantas de videira 'Paulsen 1103' com diferentes interações entre pérola-da-terra e formigas

Foram utilizadas plantas de videiras livre de vírus, da cultivar 'Paulsen 1103', multiplicadas por estaquia a partir de plantas matrizes de viveiro em agosto de 2009. Após enraizar em areia esterilizada, as estacas com raízes foram transferidas para copos plásticos (350 mL), contendo substrato esterilizado, até a formação de muda. As mudas foram transplantadas para as gaiolas de Gallotti em outubro de 2009.

Entre os meses de janeiro e fevereiro de 2010 foram coletadas colônias de formigas, utilizando-se uma colônia com sete rainhas para cada gaiola (conforme citado no sub item 3.1.2.1). As colônias foram alimentadas com larvas de *Tenebrio molitor* (Linné, 1785) (Coleoptera: Tenebrionidae) e açúcar invertido (25%), ofertados três vezes por semana durante todo o experimento.

Entre os meses de fevereiro e março de 2010 foram coletados cistos de pérola-da-terra em vinhedo comercial (conforme citado no sub-item 3.1.2.1) os quais foram levados para o Laboratório de Entomologia (Embrapa Uva e Vinho), acondicionados em câmara de germinação (tipo B.O.D.), sob condições controladas (23 ± 2 °C, 70 ± 10 % UR e fotoperíodo 0h). Após eclosão das ninfas (aproximadamente um mês) estas foram separadas em recipiente plástico (0,03 m diâmetro por 0,01 m de altura), utilizando-se um pincel fino. Paralelamente, foram separados em recipientes similares aos utilizados com as ninfas, cistos brancos contendo ovos de pérola. Os recipientes contendo as ninfas e os cistos foram utilizados para infestar as gaiolas, utilizando-se um recipiente de cada (com 300 ninfas e cinco cistos) por gaiola. Os cistos foram distribuídos na parte interna da gaiola, após aberto o vidro da lateral da gaiola, próximos as raízes das plantas. As ninfas foram colocadas na parte superior das gaiolas (no perfil do solo), para que a infestação ocorresse pelo transporte das mesmas pelas formigas até as raízes das plantas.

Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, com 20 repetições por tratamento, considerando três tratamentos: **1)** plantas com infestação de pérola; **2)** plantas com infestação de formigas; e **3)** plantas com infestação de pérola e formiga. Nas gaiolas que continham formigas, foi necessária a inserção da gaiola dentro de uma bandeja de plástico (0,9 m comprimento, 0,5 m largura, 0,2 m altura) contendo teflon nas bordas para não permitir a fuga das formigas e evitar o carregamento das ninfas de pérola entre os tratamentos (Figura 21). Para condução da planta na gaiola foi utilizada uma haste metálica com 1,2 m, inserida no substrato para servir de apoio de sustentação aos ramos, com as gaiolas distribuídas sobre bancadas (1,2m altura) no interior da casa de vegetação (Figura 22).



FIGURA 21. Gaiolas de Gallotti nas bancadas, com bandeja (presença de formigas) e sem bandeja (ausência de formigas). Bento Gonçalves, mar/2011 (Foto: Zart).



FIGURA 22. Disposição geral das gaiolas na casa-de-vegetação, sobre as bancadas. Bento Gonçalves, mar/2011 (Foto: Zart).

No dia 23 de setembro de 2010 foram realizadas as avaliações e as coletas de material para análise. Para caracterizar os contrastes de vigor de crescimento, em cada planta foi avaliado o número de brotações por planta e o número de gemas e feminelas por ramo. Além disso, coletou-se um ramo por planta, contendo quatro nós e três entrenós, coletado a partir da segunda gema, totalizando quatro folhas por ramo avaliado. Foram avaliados o crescimento e morfologia dos ramos (comprimento, diâmetro e massas, conforme sub item 3.1.1) e das folhas (área foliar e massas), conforme citado no sub ítem 3.1.2.3.

Paralelamente foram coletadas quatro folhas (sem pecíolo) por planta para análises bioquímicas de aminoácidos e proteínas totais. Estas, logo após o arranquio, foram acondicionadas em recipientes falcon (50ml) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido (-190°C) para serem conservados em ultra freezer (-80 °C) até o momento das análises. No mesmo dia, foram coletadas 12 folhas por planta para análise de amido e nutrientes.

As análises de nutrientes dos tecidos foram realizadas conforme metodologia descrita por Tedesco *et al.*, (1995). As folhas coletadas foram postas para secar em

estufa de circulação forçada de ar (65°C), até atingir peso constante. Após a secagem, o material vegetal foi triturado em moinho tipo Willey para passar em peneira de 40 mesh, obtendo-se um material homogêneo. Do material sólido foram retiradas amostras triplicadas de 0,2 g e submetidas às determinações de N (método Kjeldahl), P, B (método colorimétrico), K (fotometria de chama), Ca, Mg, Zn, Cu, Mn (espectrofotometria de absorção atômica), realizada no Laboratório de Análise de Solos e Tecidos da Embrapa Uva e Vinho. A análise de amido foi realizada conforme citado no sub ítem 3.1.2.2.

A análise de proteínas totais foi realizada conforme método proposto por Bradford (1976), adaptado por Passos (1996). Partindo-se do material ainda congelado (folhas), cada amostra foi macerada em almofariz com nitrogênio líquido, separando-se em tubos falcon de 15ml, alíquotas de 100mg de cada parcela. Em cada tubo foram adicionados 5 ml de etanol 80%, agitados em vortex e incubados em banho-maria a 100°C por 10 minutos. Em seguida foi realizada a centrifugação à 4300 g por 6 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o pelete macerado novamente em almofariz com etanol 80%. Após centrifugação foi descartado o sobrenadante e ao pelete adicionados 2 ml de clorofórmio/metanol (2:1), seguido de agitação e incubação em banho-maria de 50°C por 15 minutos. Foi realizada centrifugação à 4300 g por 6 minutos para descarte do sobrenadante, sendo esta etapa repetida por três vezes. Em seguida foi adicionado 1 ml de NaOH 0,1N ao precipitado e realizada agitação, incubando os tubos em banho-maria à 40°C por 40 minutos (agitação a cada 20 minutos), centrifugando-os à 4300 g por 6 minutos e o sobrenadante (1 ml) coletado em microtubo de 2 ml. Repetida esta etapa, totalizou-se 2 ml do sobrenadante em cada microtubo para proceder a análise. Os microtubos foram centrifugados à 13400 g por 5 minutos e, de cada microtubo (amostra) pipetada na forma de triplicata 50 µL em microplaca de titulação (96 poços) de fundo plano. Para cálculo de concentração do percentual de proteínas por tecido vegetal, efetuou-se análise de regressão entre as concentrações conhecidas (0-40 µL,) do padrão BSA (soro albumina bovina) e a absorbância em 630 nm (espectrofotometro da Bio-Tek Instruments, INC Modelo ELx 800). Antes da leitura foram adicionados em cada poço 250 µL do corante “Coomassie brilliant blue” - BG-250, e a placa incubada por 25 minutos a 25°C para ocorrer a reação. Os valores das absorbâncias foram transformados em total de proteínas por tecido vegetal através da fórmula: % Proteínas totais = $\frac{((A_{630}/1000) - b)/a}{(V_e/V_a)} \times 1000$; onde A_{630} é a leitura média das

triplicatas; a e b os valores dos termos retirados da fórmula de regressão da curva padrão; Ve o volume da extração (μL); Va o volume da alíquota (μL).

Para determinação do teor total de aminoácidos foi utilizado o método da ninhidrina (Stein & Moore, 1948) adaptado para essas amostras de tecido, conforme descrição na sequência. Após a maceração em almofariz do tecido vegetal congelado, foram medidas alíquotas de 500 mg de cada amostra e novamente macerado a frio em almofariz com 8 mL de etanol 80% (4°C). Depois de homogeneizada as amostras foram acondicionadas em tubos falcon 15mL e incubadas em banho-maria à 80°C por 15 min. Em seguida, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente, adicionando-se ao tubo 5 mL de clorofórmio puro e agitado, centrifugado à 4300 g por 10 minutos (13°C) e do 1º sobrenadante (álcool + aminoácidos) pipetado 2 mL em microtubo. Os microtubos contendo as amostras foram centrifugados à 13400xg por 5 min. De cada alíquota foram pipetadas 10 μL , em triplicatas, numa microplaca de titulação (96 poços) de fundo plano, acrescidos de 90 μL de etanol 50%. Para cálculo de concentração do percentual de aminoácidos totais por tecido vegetal efetuou-se análise de regressão entre a absorbância e concentrações conhecidas (0-20 μL) do padrão leucina (0,5 mg/ml), adicionado a quantidades decrescentes de etanol 50% (100-80 μL), totalizando para cada poço 100 μL . As amostras e a calibração foram pipetadas em triplicatas na microplaca para realização de leitura da densidade ótica em espectrofotômetro (Bio-Tek Instruments, INC Modelo ELx 800) com absorbância de 630 nm de comprimento de onda. Em cada poço foram acrescidos 100 μL do reagente ninhidrina e a placa contendo as soluções pipetadas incubada em banho maria 70°C por 40 min, com leve agitação antes de se proceder a leitura. Os valores das absorbâncias foram transformados em percentual de aminoácidos total por tecido vegetal através da fórmula: % Aminoácidos total = $\frac{((A_{630}/1000) - b)/a}{(Ve/Va)} \times 1000$; onde A_{630} é a leitura média das triplicatas; a e b os valores dos termos retirados da fórmula de regressão da curva padrão; Ve o volume da extração (μL); Va o volume da alíquota (μL).

No dia 3 de dezembro de 2010, entre as 9:00 e 11:30 horas, foi realizada avaliação do potencial fotossintético das plantas, utilizando-se quatro plantas por tratamento, em uma folha por planta. Cada folha avaliada submetida a um gradiente de radiação entre 0, 150, 400, 800, 1500, e 2500 $\mu\text{mol de fotons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, conforme sub item 3.1.1. Foram escolhidas folhas basais, emergidas da segunda gema, livre de sombreamento e totalmente expandidas (adultas).

A avaliação do grau de infestação das gaiolas foi realizada entre os dias 6 e 10 de dezembro de 2010, com a abertura das gaiolas e contagem do número de pérolas nas raízes das plantas após a retirada do solo. Do total das plantas (60), 24 foram mantidas nas gaiolas com o mesmo solo, sendo 12 infestadas e 12 controle (sem infestação), para procederem-se novas avaliações (descritas na seqüência).

3.1.3.2 Avaliação de sintomas e de desenvolvimento de diferentes enxertos em ‘Paulsen 1103’ cultivado com e sem infestação de pérola-da-terra e formiga

Com a manutenção de 24 plantas do experimento anterior objetivou-se estudar o comportamento sintomático de diferentes copas de videiras (suscetíveis e tolerantes ao ataque da pérola) enxertadas sobre o porta-enxerto ‘Paulsen 1103’, com e sem infestação de pérola e formiga e em condições controladas, com a mesma premissa de que a parte aérea possa estar manifestando antecipadamente os sintomas de ataque (De César, 2008). Como garantia, foi realizada uma nova infestação nessas gaiolas, com adição de mais formigas (colônias com 5 rainhas) e pérola-da-terra (200 ninfas recém eclodidas) em fevereiro de 2011.

As plantas foram podadas em agosto de 2011, deixando-se quatro ramos com duas gemas cada, com a finalidade de manter brotações suficientes em cada planta para a realização de enxertia verde, com quatro diferentes genótipos por planta. As enxertias foram realizadas no dia 11 de outubro de 2011, em ramos verdes, sendo do tipo fenda simples, com o material ainda tenro e em pleno crescimento (Figura 23). Os materiais utilizados para as enxertias foram adquiridos de plantas multiplicadas por cultura de tecido, livre de patógenos. Em cada planta foram enxertadas as cultivares ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Isabel’, híbrido ‘548-15’ e o próprio ‘Paulsen 1103’ (Figura 24).

Após a brotação dos enxertos, que ocorreu a partir de novembro de 2011, efetuou-se periodicamente, em intervalos de sete dias, o monitoramento da parte aérea das plantas com e sem infestação de pérola e formiga, quanto ao surgimento de sintomas foliares. Considerando-se que em ensaios anteriores e em condições de campo e canteiro (De César, 2008) após a poda as plantas manifestaram sintomas. Em 23 de fevereiro de 2012 os enxertos das plantas foram podados, deixando-se apenas duas gemas por genótipo enxertado. Após esta poda, continuou-se com o monitoramento de sintomas foliares.



FIGURA 23. Enxertia verde do tipo fenda simples, mostrando a ligação entre enxerto e porta-enxerto. Bento Gonçalves, out/2011. (Foto: Zart).



FIGURA 24. Videira da cultivar 'Paulsen 1103' enxertada com quatro copas diferentes. Bento Gonçalves, out/2011. (Foto: Zart).

3.1.3.3 Avaliação do desenvolvimento, crescimento, aspectos bioquímicos e morfo-fisiológicos de plantas de 'Paulsen 1103' cultivadas em diferentes interações com pérola - formiga e *Cylindrocarpon destructans*

Com o intuito de se verificar a interação de outros organismos do solo na manifestação dos sintomas foliares de plantas atacadas, mudas enraizadas de videira da cultivar 'Paulsen 1103', multiplicadas por estaquia, foram plantadas em gaiolas de Gallotti em 17 de dezembro de 2010, utilizando solo esterilizado (conforme sub item 3.1.3.1). Em cada gaiola foram plantadas duas mudas, distanciadas 20 cm entre si (aproximadamente 10 cm da lateral), conduzidas por hastes de metal (1,2 m de altura) inseridos nas gaiolas. Foram utilizadas 40 gaiolas, separadas em quatro grupos distintos (tratamentos) conforme a interação proposta: **1**) videira (V); **2**) videira e infestação com pérola e formiga (V+P+F); **3**) videira, infestação com pérola, formiga e fungo *C. destructans* (V+P+F+C); e **4**) videira e infestação isolada com *C. destructans* (V+C).

Entre os dias 10 e 18 de janeiro de 2011 foram coletadas formigas e cistos brancos de pérolas em vinhedo comercial da Serra Gaúcha (conforme sub item 3.1.2.1),

com as colônias de formigas e os cistos separados em laboratório. No dia 19 de janeiro foi realizada a infestação das formigas, utilizando colônias com aproximadamente sete rainhas em cada gaiola. As gaiolas contendo formigas foram colocadas dentro de bandejas, contendo teflon nas bordas, para evitar a saída das formigas (Figura 21).

No dia 22 de janeiro de 2011 foram realizadas as infestações com pérola (cinco cistos por gaiola) e com fungo *C. destructans*, utilizando colônias do fungo multiplicadas em laboratório (isolado CNPUV – 719), coletado em vinhedo comercial da cultivar ‘Bordô’ (*V. labrusca*), localizado em Flores da Cunha, RS. As colônias do fungo foram multiplicadas em placas de Petri, utilizando o meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar) conforme descrito por Garrido *et al.* (2004). O meio de cultura contendo as colônias do fungo nas placas foi dividido em pedaços e usados para infestar as gaiolas, utilizando uma placa e meia por gaiola (Figura 25). A inserção dos pedaços de meio na gaiola se deu em diferentes perfis, distribuídos próximo ao desenvolvimento das raízes, porém sem danificar as raízes (Figura 26).



FIGURA 25. Placa de Petri contendo colônias do fungo *C. destructans* em meio BDA, dividido para inoculação nas gaiolas de Gallotti. Bento Gonçalves, fev/2011 (Foto: Zart).



FIGURA 26. Perfil da gaiola de Gallotti aberta para realização da inoculação do meio de cultura BDA, com o fungo *C. destructans*. Bento Gonçalves, fev/2011 (Foto: Zart).

Para maior garantia da infestação de fungo, no dia 3 de fevereiro de 2011 foi realizada outra infestação, utilizando desta vez uma solução contendo esporos de *C. destructans* (na concentração de 1×10^5 mL⁻¹). Esta solução foi fracionada em 100mL por gaiola, sendo distribuída diretamente sobre as raízes após a remoção temporária do vidro das gaiolas (Figura 27).

Para garantir alta infestação de pérola-da-terra, foi realizada nova infestação com do inseto, entre os dias 1 e 5 de março de 2011, utilizando 200 ninfas separadas em laboratório para cada gaiola. As ninfas foram colocadas sobre o perfil da gaiola, sendo posteriormente carregadas pelas formigas até as raízes.



FIGURA 27. Inoculação de *C. destructans* nas raízes de videira 'Paulsen 1103' com solução contendo esporos na concentração de $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$. Bento Gonçalves, fev/2011 (Foto: Zart).

As plantas foram conduzidas com um ramo de brotação, por desbrote realizado em 17 de janeiro de 2011, com desponte em altura máxima de 0,8 m, em 28 de fevereiro. No dia 17 de março de 2011 foi realizada nova poda, devido à infestação por ácaro branco (*P. latus*), cujas injúrias causaram sintomas de deformidade nas brotações e folhas. Por este fato, entre os meses de março e abril, foi necessária a intervenção com o acaricida Vertimec® 18 EC (abamectina), na dose de 1 mL do produto comercial por litro de água, aplicado com pulverizador costal nas folhas de todas as plantas da casa de vegetação. Este procedimento foi repetido em intervalos de 15 dias, até o momento da queda natural das folhas (maio de 2011).

Em agosto de 2011, duas gaiolas de cada tratamento foram abertas para a coleta de solo para a realização das análises de nutrientes e inoculação em meio de cultura para contagem de colônias do fungo *C. destructans*.

A poda de inverno foi realizada no dia 11 de agosto de 2011, deixando-se dois ramos com duas gemas cada. A partir do início da brotação foi avaliado o período da brotação das plantas, considerando-se como gema brotada aquelas em estágio de ponta

verde. Neste período foram realizadas aplicações com o acaricida Vertimec® 18 EC (abamectina), na dose de 1 mL do produto comercial por litro de água e em intervalos de 15 dias, até março de 2012. No dia 31 de outubro de 2011 as plantas foram avaliadas quanto ao número de brotação e o diâmetro do colo (1 – 2 cm do solo). Em 7 de dezembro, avaliou-se o comprimento médio das brotações, como também, o número médio de gemas e feminelas por brotação.

Em três gaiolas de cada tratamento foi avaliado o tempo de infiltração e quantificado a percolação da água de irrigação no substrato das plantas. Em todas as gaiolas avaliadas foram colocadas bandejas para a coleta da água percolada. Num mesmo dia (26/03/2012) foi realizada irrigação em dois períodos distintos (entre 10:00 - 11:00 e 17:00 e 18:00), marcando o tempo (com cronômetro) de infiltração da água colocada no perfil da gaiola, e no final do dia (18:30), coletada a água percolada em bureta graduada. Em cada período foram adicionados 300 mL de água, com béquer graduado.

Ao longo do dia 06/01/12 foram realizadas medições de fotossíntese ($\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), em três plantas de cada tratamento, previamente marcadas. Para essas avaliações, utilizou-se um analisador de gases por radiação infra-vermelha (LI-6400, LI-COR, Lincoln, USA) equipado com câmara de topo aberto. Essas avaliações foram realizadas durante o dia, a cada duas horas, entre as 5:30 e 18:00. Paralelamente foi determinado o potencial da água na folha (MPa), o qual foi medido em folhas coletadas de cada grupo de interação, com a utilização de uma câmara de pressão (Scholander *et al.*, 1965). Para as medidas do potencial de base da água na folha, as folhas foram coletadas antes do amanhecer (5h30min), com as avaliações em intervalos de duas horas, até às 18h.

No dia 09/01/12 foi realizada análise do potencial fotossintético das plantas, utilizando-se quatro plantas por tratamento, em uma folha por planta. Cada folha avaliada submetida a um gradiente de radiação nos níveis de 0, 100, 200, 400, 800, 1000, 2000, e 2500 $\mu\text{mol de f\u00f3tons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, conforme sub item 3.1.1. Foram escolhidas folhas basais, emergidas da segunda gema, livre de sombreamento e totalmente expandidas (adultas). Após estas avaliações as plantas foram podadas (10/01/2012) e o material de poda submetido para as análises de amido (folhas e ramos) e nutrientes (folhas). Após essa poda, entre os dias 15/01 e 15/03/2012, estas plantas foram avaliadas quanto a taxa de brotação (número de gemas brotadas) e o desenvolvimento

das brotações (número de folhas por brotação). As plantas foram novamente desbrotadas, conduzindo um broto por planta.

No dia 27/03/2012, entre as 15:30 e 16:15 horas, foram coletadas três folhas de cada planta em falcon de 50mL, congeladas em nitrogênio líquido (-190 °C) e armazenadas em ultra freezer (-80°C) para análises de expressão de genes específicos de defesa da videira contra patógenos. Após as avaliações as plantas foram podadas novamente, separando-se folhas e ramos em laboratório, para análises morfológicas de crescimento (conforme sub-item 3.1.2.3).

As folhas congeladas foram processadas para as análises de indução dos genes Estilbeno Sintase (envolvida na produção de fitoalexinas que auxiliam a defesa contra fungos), Chalcona Sintase (envolvida na função de biossíntese de antocioninas) e a proteína PR-2 (Pathogenesis Related, com atividade antimicrobiana). A eficiência dos primers foi calculada com o LinRegPCR, conforme Ramakers *et al.*, (2002) e a expressão gênica relativa foi calculada segundo Pfaffl (2001) usando o tratamento sem pérola (V) como calibrador. Foram utilizadas duas plantas para cada análise, contrastando plantas: V (controle, 0 cistos); V+P+F (com média de 4,5 cistos); V+P+F (com média de 30 cistos) e V+P+F+C (com média de 16 cistos). Foi utilizado como gene normalizador actina e os valores comparados pela expressão das plantas controles (interação V).

Entre os dias 4 e 20 de abril de 2012 as gaiolas foram abertas para observação do número de cistos de pérolas nas raízes das plantas.

3.1.3.4 Relação da infestação de pérola-da-terra com o grau de metil esterificação em diferentes espécies de videira

As videiras utilizadas foram: ‘Paulsen 1103’ (*V. rupestris* x *V. berlandieri*); ‘Magnólia’ (*V. rotundifolia*); ‘Isabel’ (*V. labrusca*) e o híbrido de ‘Magnólia’ e ‘Isabel’ ‘548-15’ (*V. rotundifolia* x *V. labrusca*).

Foram utilizadas oito gaiolas para cada material vegetal, com o plantio de duas plantas por gaiola. Em metade das gaiolas (quatro de cada material) foi realizada infestação com formigas e pérola, nos dias 20/02/2012 e 10/03/2012, respectivamente.

Em setembro de 2011 as plantas foram podadas e conduzidas com duas brotações cada planta. Devido infestações com ácaro branco e doenças nas folhas (míldio e oídio) principalmente em ‘Isabel’, as plantas foram novamente podadas em fevereiro de 2012. Entre os dias 28/02 e 30/03/2012 foi avaliada a brotação das plantas

como também o desenvolvimento dos ramos, contando-se o número de folhas emergidas ao longo do tempo. Também foram avaliadas quanto a manifestação de sintomas foliares.

Paralelamente a esse ensaio da análise do ataque do inseto nestes diferentes hospedeiros, entre os meses de abril e maio de 2012, mudas das mesmas cultivares utilizadas nas infestações foram levadas para o Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVeg), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para análise do grau da metil esterificação de pectinas. Foram utilizadas porções das raízes das plantas, em estágio de crescimento secundário, removidas e seccionadas transversalmente, em micrótomo de Ranvier (espessura aproximada de 10 μm), sendo os cortes mergulhados em água destilada para evitar a desidratação dos tecidos. Em seguida os cortes foram colocados em microtubos (0,5 ml) com solução PBS (formaldeído 4% em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,2) por 2 h. Decorrido esse período os cortes foram submetidos por uma hora em solução centrifugada a 3% de proteína de leite desnatado em PBS, lavados por um minuto com PBS e incubados por 12 h (*overnight*) com o anticorpo primário JIM7, diluído 10 vezes em PBS, o qual detecta um epitopo de hamogalacturonanos (HG) com metil-esterificação acima de 80% (Knox *et al.*, 1990). Após esse período os cortes foram lavados novamente em PBS (quatro vezes de 1 min cada) e incubados em anticorpo secundário Goat anti-rat FITC (Sigma), diluído 100 vezes em PBS, mantido no escuro, por 1h30min. Após esse procedimento os cortes foram novamente lavados em PBS (seis vezes por 1 min cada) para montagem em lâmina e lamínula, utilizando-se um meio de parafenilediamina em glicerol tamponado (*antifade*).

As lâminas foram analisadas em epifluorescência no microscópio Leica DMR HC com filtro de excitação de 450-490 nm. As imagens foram capturadas em câmara digital Leica DC500 e analisadas por comparação quanto à reação de fluorescência observada nas paredes das células das diferentes cultivares. Em todas as cultivares foi realizado um ensaio controle (somente anticorpo secundário), para evitar erro de observação nos ensaios testes (anticorpos primário e secundário), devido à existência de auto fluorescência em alguns tecidos vegetais.

Em 11/06/2012 foi realizada a avaliação do grau de infestação de cistos de pérola-da-terra nas raízes das plantas, abrindo as gaiolas para observação. Nesse processo o solo foi retirado das raízes para visualização das pérolas-da-terra, como também, da sanidade das raízes (observando-se sintomas de doenças e infestação por filoxera).

3.2 Análise estatística

Para a análise estatística de todas as variáveis utilizou-se o programa STATISTICA 6.0. Os dados foram submetidos às análises de variância (ANOVA), com as médias das plantas infestadas comparadas com as médias das plantas não infestadas pelo teste t ($p = 0,05$). As médias percentuais foram transformadas em arco seno de raiz de $x \cdot 100^{-1}$. Nos experimentos com diferentes interações a comparação foi realizada entre as médias pelo teste de Tukey ($p = 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação realizada em vinhedo comercial

Durante a seleção das plantas infestadas e não infestadas por pérola, para se realizar o acompanhamento do desenvolvimento de sintomas e danos, foi possível observar um grande número de plantas com vigor reduzido, muitas das quais nem brotaram nos meses da primavera (setembro – outubro/2010). Entretanto, ao se remover o solo das raízes, poucas ou mesmo nenhuma pérola foi encontrada atacando as raízes das plantas, fato que se repetiu nas duas áreas avaliadas ('C. Franc' e 'C. Sauvignon'). Mesmo assim, foram encontradas plantas com e sem infestação por pérola e, como esta seleção foi realizada durante o inverno, época em que as plantas se encontravam dormentes, somente o julgamento de existir ou não pérolas infestantes nas raízes das plantas foi usado como critério de seleção.

Nas primeiras análises realizadas com o material oriundo da poda não foram observadas diferenças significativas entre comprimento, diâmetro e massas (fresca e seca) dos ramos oriundos de plantas com e sem a infestação por pérola-da-terra (Tabela 3). Além disso, nas avaliações realizadas para acompanhar a viabilidade da brotação das gemas de varas e esporões foi evidenciado que na área de 'Cabernet Sauvignon' as plantas marcadas como infestadas apresentaram uma brotação de 67,06% e 77,16% das gemas de varas e esporões, respectivamente, o que totalizou 72,44% de índice médio de brotação. Nas plantas marcadas sem infestação a brotação de gemas de varas e esporões foi 67,53% e 70,94%, respectivamente, totalizando brotação em 69,32% das gemas observadas. Estas diferenças não foram significativas pelo teste t ($p < 0,05$).

TABELA 3. Valores médios (\pm erro padrão) do comprimento de entrenó (CME), diâmetro de entrenó (DME), massas fresca (MF) e seca (MS) de entrenó de ramos de plantas de ‘Cabernet Franc’ (C.F.) e ‘Cabernet Sauvignon’ (C.S.) (*Vitis vinifera*), observadas a campo com (CP) e sem (SP) a infestação de pérola-da-terra nas raízes. Pinto Bandeira, set/2010.

Cultivar / Infestação		CME (cm) ^{NS}	DME (mm) ^{NS}	MF (g) ^{NS}	MS (g) ^{NS}
C. F.	CP	8,59 \pm 0,51	7,04 \pm 0,15	4,17 \pm 0,55	2,21 \pm 0,29
	SP	8,77 \pm 0,85	7,12 \pm 0,19	4,26 \pm 0,80	2,30 \pm 0,45
C. S.	CP	9,29 \pm 0,31	8,22 \pm 0,08	5,95 \pm 0,46	3,25 \pm 0,24
	SP	9,78 \pm 0,49	8,29 \pm 0,14	6,23 \pm 0,71	3,34 \pm 0,38

^{NS}Diferenças não significativas pelo teste t entre contrastes CP e SP em ambas cultivares.

O percentual de brotação observado, em ambas as áreas, é considerado normal para a região, visto que a viabilidade das gemas tende a ser alterada pelas mudanças anuais do clima, podendo diminuir nos anos em que o acúmulo de frio foi inferior ao necessário para a espécie (Marodin *et al.*, 2006). De acordo com os dados meteorológicos monitorados no período hibernar de 2010 (abril a setembro) para a região (Embrapa, 2012), houve um acúmulo de 388 horas de frio ($<7,2^{\circ}\text{C}$) e 859 horas ($<10,0^{\circ}\text{C}$), o que atende às exigências de frio das cultivares ‘C. Sauvignon’ e ‘C. Franc’ (Dokoozlian, 1999; Santos *et al.*, 2011).

Na avaliação da taxa de fotossíntese das folhas de plantas de ‘Cabernet Franc’, devido à grande variabilidade de resposta foi observada uma tendência de maior taxa de assimilação de gás carbônico nas plantas marcadas como sem pérola, quando comparadas com as plantas marcadas como infestadas, com e sem sintomas (Figura 28).

Esta pequena variação entre as plantas sintomáticas e não sintomáticas explica, em parte, as semelhanças encontradas nos parâmetros de crescimento destas mesmas plantas (Tabela 3). Portanto, pode-se concluir que no momento desta análise fotossintética (novembro/2010) e com os grupos de folhas considerados, a sintomatologia foliar ainda não foi suficiente para caracterizar grandes diferenças nos parâmetros fotossintéticos. Contudo, salienta-se que nas plantas sintomáticas haviam folhas com sintomas mais desenvolvidos e, portanto, com maior restrição no metabolismo fotossintético. Além disso, entre os meses de janeiro e fevereiro, durante as visitas semanais as áreas, foi observado um aumento no número de plantas sintomáticas e com maior proporção de folhas com sintomas, o que caracteriza um avanço desse processo ao longo do ciclo anual.

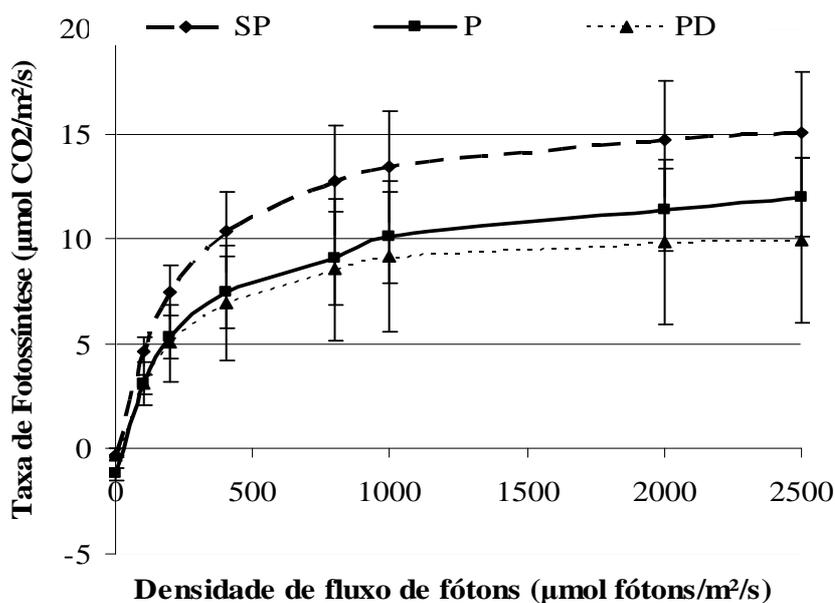


FIGURA 28. Curvas do potencial de fotossíntese de videiras ‘Cabernet Franc’ cultivadas em vinhedo comercial pré-amostradas como: **1)** plantas controle e sem sintomas de pérola-da-terra (SP); **2)** plantas infestadas, mas sem sintomas foliares de pérola-da-terra (P); e **3)** plantas infestadas e com sintomas foliares (PD). Pinto Bandeira, dez/2010.

Na avaliação destas plantas sintomáticas e não sintomáticas, quanto à presença ou ausência da pérola-da-terra, pode-se afirmar que a ocorrência dos sintomas foliares foi independente da presença do inseto. Ou seja, haviam plantas sem sintomas que tinham sido identificadas com ataque de pérola-da-terra e haviam plantas sintomáticas que haviam sido marcadas sem o ataque de pérola-da-terra. Portanto, esse resultado levantou a hipótese de que outros organismos estavam causando tais sintomas, caracterizados como típicos de pérola-da-terra, conforme informações de produtores e técnicos da região.

Com esses resultados, plantas inteiras (com raízes e brotações) foram levadas para os Laboratórios de Virologia e Fitopatologia da Embrapa Uva e Vinho, nas quais foram identificadas doenças causadas por vírus e/ou fungos nas videiras das amostras, sendo muitas plantas com sintomas de ambos patógenos. Pela análise dos sintomas de algumas folhas, foi identificado a presença do vírus do enrolamento da folha da videira (*Grapevine leafroll-associated vírus - GLRaV*), o qual já foram identificados no Brasil oito diferentes tipos virais para videira (Basso *et al.*, 2010b). O sintoma característico em videiras tintas, como ‘C. Sauvignon’ e ‘C. Franc’, é uma clorose seguida de

avermelhamento das folhas das plantas atacadas, com um progressivo enrolamento dos bordos das folhas (Figura 29). Nos ramos, caules e raízes coletados também foi identificada a doença conhecida por declínio ou morte descendente da videira, nome genérico de doença causada por um grupo de diferentes fungos (Garrido & Sonogo, 1999). Em laboratório foi identificado e isolado o gênero de fungo *Botryosphaeria* sp., diagnosticado como o causador dos sintomas observados na área avaliada e, erroneamente atribuído ao ataque da pérola-da-terra nas videiras (Figura 30).



FIGURA 29. Sintoma em ‘Cabernet Franc’ causado pelo vírus do enrolamento da folha (GLRaV). Pinto Bandeira, dez/2010 (Foto: Zart).



FIGURA 30. Sintoma em ‘Cabernet Franc’ de podridão descendente da videira causado pelo fungo *Botryosphaeria* sp. Pinto Bandeira, dez/2010 (Foto: Zart).

O conjunto dos resultados deste ensaio de campo serviu para caracterizar a falta de precisão no diagnóstico de plantas atacadas por pérola-da-terra. Esse equívoco pode estar atrelado ao fato da pérola-da-terra ser facilmente visível nas raízes das plantas, em função de suas características físicas, como a coloração amarelada e tamanho médio de 0,5 – 1,0 cm (Figura 1), que contrasta com as raízes e o solo (Figura 2). Diante deste fato, quando o produtor ou técnico se depara com alguma planta sintomática e na exploração das raízes encontra a pérola-da-terra, corriqueiramente os sintomas são atribuídos à presença/ataque deste inseto. Em contrapartida, os fungos e vírus, que não são visíveis e que podem induzir sintomas foliares e morte de plantas, podem passar despercebidos na maioria dos casos, se não foram submetidos a análises específicas (Basso *et al.*, 2010b). Por haver esse confundimento de diferentes efeitos biológicos sobre as videiras analisadas, as demais avaliações para caracterizar os efeitos da pérola-da-terra que haviam sido programadas para esse ensaio foram encerradas.

4.2 Ensaios ambientados em canteiros

4.2.1 Experimento 1. Avaliação do comportamento de mudas de videiras em canteiros com e sem infestação controlada de pérola-da-terra

Durante o primeiro ano das plantas cultivadas nos canteiros (2010/2011), priorizou-se o manejo para controle de plantas concorrentes (controle manual), pragas (ácaro branco e filoxera nas folhas) e doenças (ferrugem e mildio), visto que a maioria das mudas estava ainda em fase de formação. Após a poda de formação no primeiro ano (setembro/2010), foi observado crescimento normal das plantas entre canteiros, sem a ocorrência de sintomas. Além disso, nesta fase inicial foram efetuadas as enxertias para a formação de plantas com os mesmos porta-enxertos, mas com variações de copas. Após a enxertia de inverno (setembro de 2010) realizada sobre ‘Paulsen 1103’ com os materiais ‘C. Sauvignon’ e ‘Isabel’, foi observado a morte de 12 enxertos de ‘C. Sauvignon’ (7 nos canteiros sem pérola e 5 nos canteiros com pérola) e 9 enxertos de ‘Isabel’ (5 canteiro com pérola e 4 canteiro sem pérola). Os cavalos mortos foram desenterrados e não foram encontradas pérolas nas raízes e nem sintomas das outras pragas ou doenças conhecidas, dentro dos protocolos de análise dos laboratórios da Embrapa Uva e Vinho. Contudo, não se pode descartar problemas de enxertia ou mesmo a interferência de algum organismo do solo, considerando que não houve esterilização do mesmo.

Depois de realizada a poda de verão (desponte), em fevereiro de 2011, plantas de ‘Isabel’, que estavam mais desenvolvidas e não haviam sofrido danos por mildio, ácaro branco e nem filoxera, foram avaliadas quanto às taxas de fotossíntese, considerando o contraste de canteiros com a presença e ausência de pérola-da-terra. Nestas avaliações não houve diferenças entre plantas dos canteiros com e sem pérola para diferentes gradientes de radiação (Figura 31). Com as mesmas plantas marcadas anteriormente foi avaliada novamente a taxa de fotossíntese, porém agora com uma taxa saturante de fótons.

Esses resultados de fotossíntese corroboram as observações dos sintomas foliares ao longo do ciclo, pois desde o início das brotações (agosto – setembro/2010), até a senescência das folhas (março – maio/2011) nenhum material observado manifestou sintomas característicos ao ataque da pérola-da-terra. Além disso, as observações realizadas pelas medidas do colo das plantas, nestas mesmas plantas, não houve constatação de diferenças significativas entre as plantas cultivadas nos canteiros com e sem pérola.

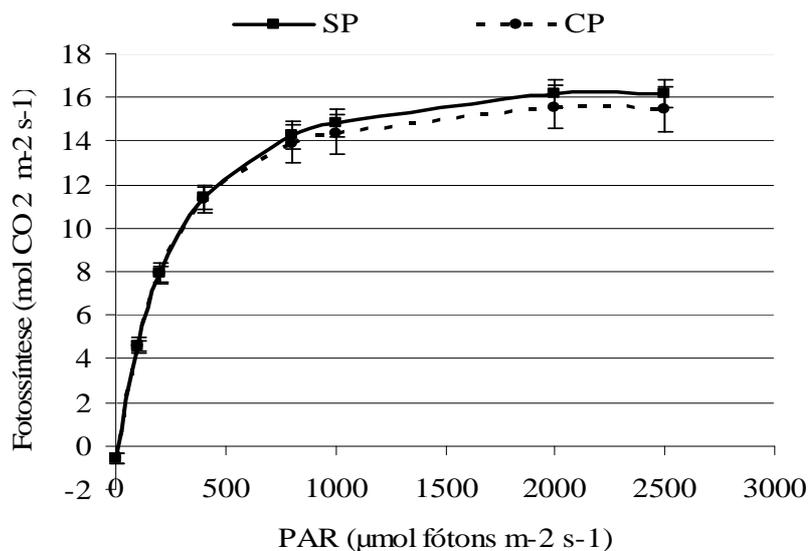


FIGURA 31. Curva de fotossíntese com gradiente de radiação entre 0, 100, 200, 400, 800, 1000, 2000 e 2500 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em plantas de 'Isabel' cultivadas em canteiros com (CP) e sem (SP) pérola-da-terra. As barras de erro padrão correspondem à observação de 9 plantas. Bento Gonçalves, jan/2011.

A avaliação do material de poda, realizada em laboratório, também não apresentou diferenças significativas nos parâmetro de diâmetro, comprimento e massas fresca e seca dos ramos (Tabela 4). Esta ausência de sintomatologia pode estar de acordo com o tempo de infestação das mudas. De acordo com De Césaró (2008), a ocorrência de sintomas em plantas infestadas somente se manifesta após o segundo ciclo de crescimento.

Para constatar o grau de infestação das plantas dos canteiros com pérola-da-terra, em dezembro de 2011 foram arrancadas inicialmente 12 plantas da cultivar 'Paulsen 1103', preferencialmente, devido a sua reconhecida suscetibilidade ao ataque da pérola (Botton & Colleta, 2010). Nesta análise, foi constatado que as plantas não apresentaram infestação da praga. Para evitar a dúvida de que somente esta cultivar não apresentou infestação, plantas de outras cultivares foram também arrancadas e analisadas quanto à presença de pérola-da-terra e repetiram o mesmo resultado de ausência de infestação. Isto se apresentou como um grande impecilho no andamento das análises previstas no projeto, pois não se obteve êxito de infestação, apesar de terem sido realizadas três infestações com cistos-ovos e ninfas de primeiro instar, durante os períodos de janeiro a março de 2010 e 2011.

TABELA 4. Valor médio (\pm erro padrão) do diâmetro (Θ) do colo (mm), diâmetro do ramo (mm), comprimento (cm) e massas fresca e seca do ramo basal (formado por gemas) de plantas das cultivares ‘548-15’, ‘1113-10’, ‘Isabel’, Paulsen 1103’, Cabernet Sauvignon’ e enxertos de ‘Cabernet Sauvignon’ (P1103 + CS) e ‘Isabel’ (P1103 + Isabel) enxertados sobre ‘Paulsen 1103’, cultivadas em canteiros com (CP) e sem (SP) a infestação de pérola-da-terra. Bento Gonçalves, set/2011.

Cultivar	Canteiro	Θ colo (mm) ^{NS}	Θ ramo (mm) ^{NS}	Comprimento (cm) ^{NS}	Massa fresca(g) ^{NS}	Massa seca (g) ^{NS}
548-15	SP	5,86 \pm 0,30	4,34 \pm 0,20	18,92 \pm 1,49	3,16 \pm 0,30	1,70 \pm 0,17
1113-10		3,25 \pm 0,16	2,37 \pm 0,13	9,10 \pm 0,79	0,49 \pm 0,06	0,31 \pm 0,04
Isabel		7,46 \pm 0,42	4,26 \pm 0,14	16,67 \pm 1,42	2,48 \pm 0,31	1,32 \pm 0,16
Paulsen		8,53 \pm 0,25	4,56 \pm 0,18	13,79 \pm 0,93	2,57 \pm 0,39	0,25 \pm 0,10
Cabernet		4,67 \pm 0,19	3,10 \pm 0,10	12,73 \pm 0,78	1,16 \pm 0,13	0,60 \pm 0,05
Paulsen + CS		8,32 \pm 0,53	3,96 \pm 0,28	11,79 \pm 1,26	1,97 \pm 0,28	0,98 \pm 0,13
P1103 + Isabel		8,97 \pm 0,29	4,31 \pm 0,14	13,24 \pm 0,80	2,45 \pm 0,18	1,26 \pm 0,09
548-15		CP	6,04 \pm 0,24	4,36 \pm 0,18	18,66 \pm 1,30	3,08 \pm 0,31
1113-10	3,12 \pm 0,11		2,27 \pm 0,09	9,21 \pm 0,85	0,45 \pm 0,04	0,29 \pm 0,03
Isabel	6,91 \pm 0,37		3,86 \pm 0,10	15,89 \pm 0,85	2,05 \pm 0,12	1,09 \pm 0,06
Paulsen	7,73 \pm 0,35		4,52 \pm 0,14	16,38 \pm 1,01	2,72 \pm 0,26	1,53 \pm 0,15
Cabernet	4,87 \pm 0,29		3,02 \pm 0,15	12,60 \pm 0,50	1,58 \pm 0,07	0,58 \pm 0,04
Paulsen + CS	7,67 \pm 0,35		4,17 \pm 0,16	14,13 \pm 0,69	2,40 \pm 0,26	1,20 \pm 0,12
P1103 + Isabel	8,60 \pm 0,44		4,19 \pm 0,20	13,58 \pm 1,26	2,27 \pm 0,33	1,18 \pm 0,16

^{NS}Diferenças não significativas ($p>0,05$) pelo teste t, entre contrastes de canteiros com pérola e sem pérola.

A ausência do inseto nos canteiros pode estar atrelada a algum efeito antagônico da combinação de exudatos de raízes, considerando que os mesmos foram compostos de uma grande mistura de genótipos, inclusive de espécies nativas, e plantados muito próximos (0,23m x 0,18m). De acordo com Willadino *et al.* (2005), a rizosfera é um ambiente muito complexo e os exudatos radiculares exercem grandes influências físicas (agregação de partículas, variação da porosidade, do potencial de água, etc), químicas (precipitação e acúmulo de sais, modificação de pH, liberação de compostos que atuam como quelantes, indutores de transcrição gênica e fatores de crescimento) e biológicas (estímulo ou inibição de distintos organismos, conforme a espécie de planta) neste microambiente. Portanto, estes fatores, podem estar se manifestando com esse conjunto de plantas e proporcionando a ausência de infestação. Entretanto, no âmbito deste trabalho não foi possível testar tal hipótese. Diante destes fatos, as avaliações programadas para as plantas cultivadas em ambos os canteiros novos com e sem a infestação de pérola não foram efetuadas conforme o planejamento inicial, devido à ausência do contraste requerido de ataque de pérola.

4.2.2 Experimento 2

a) Avaliação de mudas formadas de estacas coletadas de plantas de ‘Paulsen 1103’ cultivadas em canteiros com e sem a infestação por pérola-da-terra

Nos canteiros 7 e 8 (Figura 10), que já haviam sido infestados previamente entre os anos 2004 e 2005, as mudas de ‘Paulsen 1103’ foram implantadas em abril de 2009, com comprovação da existência de pérolas pelo revolvimento de algumas plantas hospedeiras, como a língua-de-vaca (*Rumex* sp.). Desta maneira, as plantas deste ensaio (canteiros 7 e 8) ficaram um tempo de exposição maior para a infestação de pérola, quando comparado com as plantas dos canteiros do ensaio anterior (canteiros 1 ao 6). Nas avaliações prévias de plantas de videira e de língua de vaca (realizadas em março de 2011) houve confirmação de infestação.

As estacas coletadas nos canteiros com a infestação de pérola-da-terra apresentaram, em média, menores massas fresca e seca, menor comprimento e menor diâmetro, diferenças estas significativas ($p < 0,05$), quando comparadas com as estacas coletadas das plantas do canteiro sem a infestação por pérola-da-terra (Figura 32). Esse resultado enfatiza que plantas com maior tempo de infestação nos canteiros manifestam impactos sobre o vigor das brotações anuais, o que reflete, em parte, a sintomatologia observada a campo (De César, 2008).

No Brasil, apesar de ainda não haver regulamentação para a qualidade morfológica na produção de estacas, há uma recomendação de utilização de estacas com comprimento entre 28 e 30 cm e diâmetro variando de 7 a 12 mm (Kuhn *et al.*, 2007), ficando os resultados obtidos abaixo destes parâmetros e principalmente nas plantas atacadas por pérola (Figura 32). Comparando-se os resultados observados com os padrões exigidos para produção de mudas por estaca na França, o diâmetro mínimo exigido (0,35 cm) foi alcançado (Regina, 2002). Entretanto, o comprimento não atingiu o mínimo exigido (55 cm), em ambos os tratamentos.

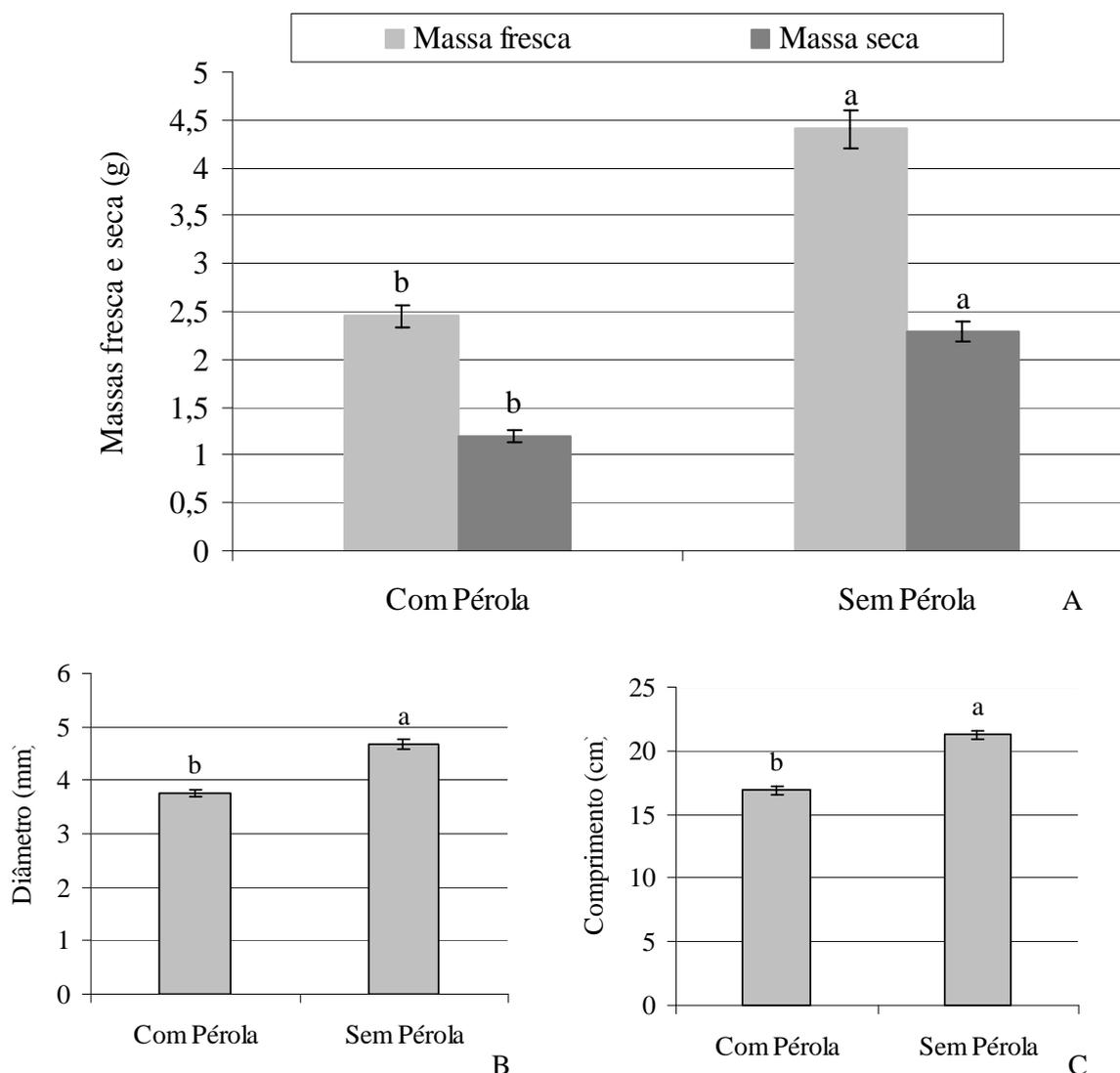


FIGURA 32. Médias observadas das massas (g) frescas (cinza claro) e secas (cinza escuro) (A); diâmetros (mm) (B) e comprimentos (cm) (C) de estacas (com quatro gemas) de videiras ('Paulsen 1103') cultivadas em canteiros com e sem a infestação de pérola-da-terra. Bento Gonçalves, set/2011.

Apesar das variações de vigor nas plantas atacadas, salienta-se que as estacas coletadas não manifestaram diferenças significativas no acúmulo de reservas de amido. (Figura 33).

Na avaliação do contraste de efetividade de brotações e de enraizamento entre as estacas, obtidas de plantas com pérola e sem pérola e cultivadas em substrato, foi observado que em todas as estacas ocorreu pelo menos uma brotação de gemas e não foram observadas diferenças significativas (Tabela 5). Portanto, esse resultado não reflete os contrastes de vigor de crescimento, mas está correlacionado positivamente com as semelhanças de reservas em ambos grupos de estacas. De acordo com Zapata *et al.* (2004), o acúmulo de amido na estaca responde à efetivação da brotação do ciclo

seguinte, o qual se faz necessário para as atividades da planta na saída de sua fase dormente. O comportamento das brotações e o crescimento das mudas, avaliado nas medidas de brotação e raiz, condizem com a similaridade dos resultados encontrados no percentual de amido nas estacas, que praticamente não foram alterados, pelo fato das plantas estarem em canteiros distintos e com a presença e ausência de pérola-da-terra.

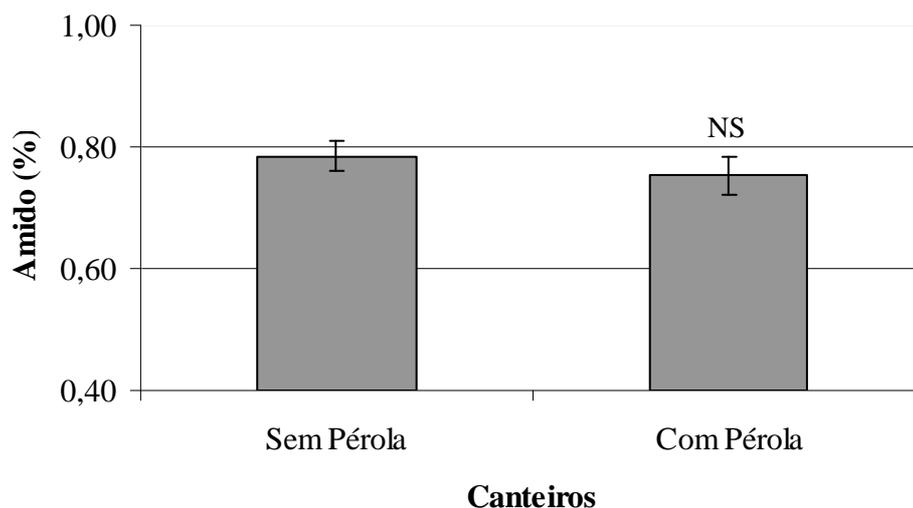


FIGURA 33. Percentual de amido em estacas de videiras da cultivar 'Paulsen 1103' coletadas de plantas em canteiros sem pérola e com pérola. Bento Gonçalves, 2012.

Um dos fatores que poderia determinar o menor crescimento observado nas estacas das plantas infestadas, num primeiro momento, seria a quantidade de amido de reserva presente nas estacas, conforme importância destacada por Leakey & Coutts (1989). Porém, o tamanho da estaca, nesse caso, não demonstrou ser um fator decisivo para a produção de mudas de porta-enxerto 'Paulsen 1103', visto que houve brotações e, nos parâmetros avaliados (Tabela 5), não apresentou diferenças significativas.

TABELA 5. Valor médio (\pm erro padrão) do número de brotações, número de gemas, comprimento total das brotações, número de raízes primárias, comprimento (cm) de duas raízes e a massa fresca (g) das raízes das estacas de plantas cultivadas em canteiros com pérola (CP) e sem pérola (SP). Bento Gonçalves, dez/2011.

Estacas	Nº brotações ^{NS}	Nº gemas ^{NS}	Compr. total (cm) ^{NS}	Nº raiz 1º ^{NS}	Compr. duas raízes ^{NS}	Massa fresca(g) ^{NS}
CP ^{NS}	1,61 \pm 0,97	13,67 \pm 0,91	24,04 \pm 1,41	18,48 \pm 1,33	27,94 \pm 0,99	2,40 \pm 0,96
SP	1,63 \pm 0,07	14,32 \pm 0,48	24,47 \pm 1,13	19,82 \pm 1,07	27,24 \pm 0,81	2,01 \pm 0,10

^{NS}Diferenças não significativas ($p > 0,05$) pelo teste t, entre contrastes com e sem pérola.

Insetos, numa forma geral, apresentam suas atividades biológicas relacionadas aos aspectos ambientais, mais diretamente a temperatura (Silveira Neto *et al.*, 1976). Como a espécie de pérola estudada apresenta um ciclo aproximadamente anual (Soria & Gallotti, 1986; Botton *et al.*, 2004) e as atividades da videira (maior circulação de nutrientes) ocorre no período quente do ano (outubro – abril, para o hemisfério sul), o menor crescimento observado nos ramos pode ser devido ao desvio de nutrientes relacionados à alimentação da pérola no período de maior atividade de ambos (inseto e planta). Insetos sugadores, como a pérola, alimentam-se diretamente nos feixes vasculares das plantas, como se fossem drenos de seiva, e desviam quantidades substanciais de nutrientes no período de crescimento da planta (início da brotação), que pode ser alterado (Zapata *et al.*, 2004).

b) Avaliação de diferentes copas enxertadas sobre ‘Paulsen 1103’ em canteiros com e sem a infestação por pérola-da-terra

Após a enxertia verde de diferentes copas, realizada em dezembro de 2011 com ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Isabel’, ‘548-15’ e ‘Paulsen 1103’, nas plantas de ‘Paulsen 1103’ cultivadas em 2009 nos canteiros 7 e 8, os enxertos se desenvolveram por 90 dias nestas condições. Foi observado um rápido crescimento de brotação, em ambos os canteiros (com e sem pérola). Com exceção do material ‘548-15’, que apresentou um crescimento mais lento, os demais materiais cresceram até a altura máxima do canteiro, necessitando desponte/poda verde (20/fevereiro) na altura do arame.

Na avaliação dos parâmetros morfológicos das plantas não foram observadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre porta-enxertos dos canteiros com e sem pérola, para diâmetro de colo e massas fresca e seca de parte aérea e raiz (Tabela 6). Com exceção dos valores médios das massas de raiz, em todos os outros parâmetros os porta-enxertos cultivados em canteiros com pérola mostraram valores inferiores numericamente, quando comparados as plantas do canteiro sem infestação por pérola.

TABELA 6. Valor médio (\pm erro padrão) do número de cistos, diâmetro do colo (Θ , mm), massa fresca (MF, g) e massa seca (MS, g) da parte aérea e raiz de plantas porta-enxertos (‘Paulsen 1103’) cultivadas em canteiros com pérola (CP) e sem pérola (SP). Bento Gonçalves, mar/2011.

Canteiro	Nº médio cistos	Θ colo (mm) ^{NS.}	Parte Aérea		Raiz	
			MF (g) ^{NS.}	MS (g) ^{NS.}	MF (g) ^{NS.}	MS (g) ^{NS.}
CP	4,25 \pm 1,11	17,25 \pm 1,55	98,40 \pm 6,02	54,17 \pm 3,35	113,86 \pm 21,53	54,09 \pm 9,81
SP	-	19,59 \pm 1,12	123,76 \pm 18,90	67,86 \pm 12,00	105,68 \pm 7,47	52,10 \pm 5,21

^{NS.}Diferenças não significativas pelo teste t ($p > 0,05$), entre contrastes de canteiros com e sem pérola.

Quando avaliado o grau de infestação nas plantas do canteiro com pérola foi observada infestação da praga em todas as plantas removidas do solo do canteiro. O número médio de cistos amarelos (3º instar) encontrados por planta foi de $4,25 \pm 1,11$. Como a avaliação ocorreu no fim do verão (22/03/12), fase em que os cistos ainda estão se reproduzindo (cistos brancos), foram encontradas muitas ninfas de 1º instar no solo e nas raízes, quando da retirada das plantas do canteiro, possivelmente de cistos brancos rompidos. Também foi confirmada a ausência de pérolas nas plantas cultivadas no canteiro sem infestação.

Na avaliação morfológica dos ramos e folhas dos diferentes materiais enxertados sobre ‘Paulsen 1103’, não foram observadas diferenças significativas entre cultivares copas dos canteiros com e sem pérola em massas (fresca e seca) para entrenó e folha (Tabela 7). No comprimento médio de entrenó houve contraste significativo ($p \leq 0,05$) na cultivar ‘Cabernet Sauvignon’, que apresentou valor médio de $3,09 \pm 0,29$ cm em plantas infestadas e $4,50 \pm 0,44$ cm em plantas não infestadas. Na análise da área foliar plantas de ‘Paulsen 1103’ apresentaram diferenças significativa ($p \leq 0,05$), com médias de $46,67 \pm 8,33$ cm² e $61,38 \pm 3,67$ cm² para plantas infestadas e não infestadas por pérola, respectivamente.

TABELA 7. Valor médio (\pm erro padrão) do comprimento de entrenó (C, cm), massa fresca (MF, g) e massa seca (MS, g) de entrenó e folha e área foliar (cm²) de plantas das cultivares de videira ‘548-15’, ‘Paulsen 1103’, ‘Isabel’ e ‘Cabernet Sauvignon’, enxertadas sobre ‘Paulsen 1103’ cultivadas em canteiros com pérola (CP) e sem pérola (SP). Bento Gonçalves, mar/2012.

Cultivar/ canteiro	Entrenó			Folha		
	C (cm)	MF(g) ^{NS}	MS(g) ^{NS}	Área(cm ²)	MF(g) ^{NS}	MS(g) ^{NS}
‘548-15’	4,38±0,50	0,48±0,08	0,19±0,03	70,74±13,31	1,18±0,07	0,41±0,02
‘P1103’	4,27±0,68	0,98±0,29	0,37±0,11	46,67±8,33*	0,93±0,19	0,27±0,05
‘Isabel’	6,40±0,14	1,76±0,34	0,65±0,15	155,76±18,95	2,80±0,45	0,99±0,17
‘C.S.’	3,09±0,29*	0,74±0,27	0,26±0,10	53,39±12,04	0,94±0,26	0,32±0,09
‘548-15’	3,53±0,72	0,44±0,19	0,17±0,07	60,21±14,13	0,94±0,26	0,33±0,10
‘P1103’	4,72±0,40	1,12±0,16	0,38±0,05	61,38±3,67	1,11±0,09	0,36±0,02
‘Isabel’	6,14±0,54	1,59±0,43	0,56±0,16	134,74±28,38	2,28±0,56	0,79±0,22
‘C.S.’	4,50±0,44	1,18±0,28	0,41±0,10	85,53±17,38	1,40±0,31	0,51±0,13

^{NS}Diferenças não significativas pelo teste t ($p > 0,05$), entre contrastes de canteiros com e sem pérola.

*Significativo pelo teste de t ($p < 0,05$)

O material híbrido ‘548-15’ e a cultivar ‘Isabel’ apresentaram valores médios superiores numericamente nas plantas infestadas, quando comparadas com as plantas não infestadas (Tabela 7). Mesmo que não significativo, esta observação relaciona os dois materiais mais próximos, visto que o híbrido ‘548-15’, considerado tolerante ao

ataque de pérola-da-terra (Camargo, informação verbal), é resultado do cruzamento de ‘Magnólia’ (*V. rotundifolia*) com ‘Isabel’ (*V. labrusca*). ‘Isabel’ é considerada uma cultivar suscetível ao ataque de pérola, porém, relatos de campo condizem que plantas de *V. labrusca* (incluindo ‘Isabel’) suportam por mais tempo, de maneira produtiva, infestações por pérola-da-terra (Botton *et al.*, 2009).

É importante destacar que as plantas avaliadas também não manifestaram nenhuma alteração foliar visível (Figura 34), como as observadas no campo em plantas viróticas ou com influências de fungos de solo, o que confirma a sanidade do material empregado neste estudo.

Quanto às avaliações de clorofila, estas foram realizadas em 20/03/2012 e em decorrência das particularidades metabólicas de cada genótipo, houve grandes variações nos índices de clorofila foliar entre as cultivares, o que explica os contrastes visuais de folhas (Figura 34). Entretanto, no contraste de canteiros (com e sem pérola) dentro de cada genótipo, as médias não apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$), tanto para os índices de clorofila α , β ou total, em todos os materiais avaliados (Tabela 8). Esse resultado contrasta com os dados de pigmentação de plantas atacadas por pérola-da-terra que foram observados por De Césaró (2008), sendo que plantas de ‘Isabel’ infestadas a campo por pérola apresentaram sintomas foliares (clorose e necrose) com diferenças significativas nos teores de clorofila (α , β e Total). Contudo, o mesmo autor salienta que houve grupos de folhas assintomáticas em plantas infestadas, as quais não diferiram significativamente em clorofilas das plantas controle (De Césaró, 2008). Ou seja, apesar desta ausência de variação nos pigmentos, não se pode descartar a ocorrência de outros sintomas provocados pelo ataque da pérola-da-terra ou a ocorrência de degradação de clorofila com tempos maiores de ataque do inseto. Cabe salientar que doenças viróticas também promovem degradação das clorofilas em videiras (Basso *et al.*, 2010a), tornando-se encarquilhadas e avermelhadas em cultivares viníferas tintas e amareladas em brancas (Fajardo *et al.*, 2003).

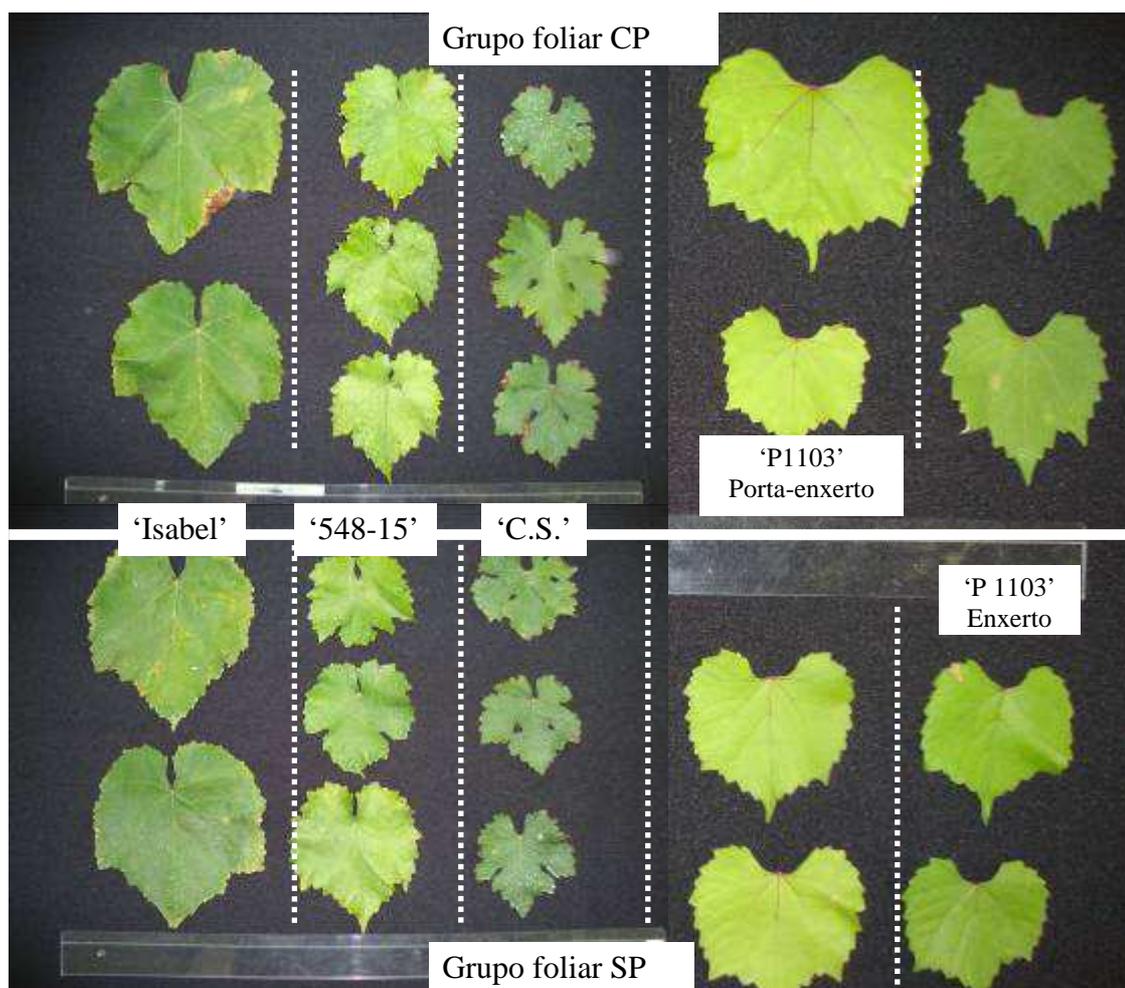


FIGURA 34. Folhas de videiras das cultivares 'Isabel', '548-15', 'Cabernet Sauvignon' (C.S.), e 'Paulsen 1103' (enxerto) enxertadas sobre plantas de 'Paulsen 1103' (porta-enxerto) infestadas (CP) e não infestadas (SP) por pérola-da-terra, durante três anos com média 4,25 cistos por planta. Bento Gonçalves, mar/2012. (Foto: Zart).

TABELA 8. Valor médio (\pm erro padrão) da estimativa de clorofila α , β e total, pelo índice de clorofila Falker (ICF), obtido através de leituras com clorofilômetro portátil (clorofiLOG 1030) em folhas de videiras das cultivares '548-15', 'Paulsen 1103', 'Isabel' e 'Cabernet Sauvignon' (CS), enxertadas sobre 'Paulsen 1103' e cultivadas em canteiros com pérola (CP) e sem pérola (SP). Bento Gonçalves, mar/2012.

Cultivar/canteiro	Teor de clorofila ¹		
	α^{NS}	β^{NS}	Total ^{NS}
'548-15'	40,95 \pm 1,59	11,73 \pm 0,82	52,68 \pm 2,31
'P1103'	30,03 \pm 1,30	7,88 \pm 0,75	37,90 \pm 1,67
'Isabel'	41,33 \pm 1,63	13,93 \pm 0,94	55,25 \pm 2,44
'C.S.'	38,65 \pm 0,86	13,68 \pm 0,80	51,93 \pm 1,12
'548-15'	41,63 \pm 1,35	11,68 \pm 1,00	53,30 \pm 2,26
'P1103'	31,45 \pm 2,01	8,25 \pm 0,77	39,70 \pm 2,76
'Isabel'	43,53 \pm 1,41	13,85 \pm 1,12	57,90 \pm 2,49
'C.S.'	39,38 \pm 1,11	11,85 \pm 0,73	51,23 \pm 1,30

¹Teor de clorofila baseado no índice de clorofila Falker (ICF); ^{NS} Diferenças não significativas ($p > 0,05$) pelo teste 't' nas plantas das mesmas cultivares entre canteiros com (CP) e sem (SP) pérola.

Apesar das plantas atacadas apresentarem uma média de 4,25 cistos por planta, as diferentes copas não apresentaram manifestação de sintomas, conforme observado em condições de campo. Em condições de canteiro com três anos de infestação para porta-enxerto, e 100 dias de enxerto, comprova-se que a copa não exerce contrastes de susceptibilidade ao ataque, conforme mencionado no trabalho de De Césaró (2008). Contudo, para se ter certeza nestas informações é necessário o acompanhamento destas plantas por períodos maiores de ataque com a pérola-da-terra, como três ciclos vegetativos, considerando as informações de literatura sobre o tempo de desenvolvimento sintomatológico em áreas comerciais infestadas (Botton *et al.*, 2004).

Considerando a semelhança das avaliações de pigmentos, destaca-se que as curvas de fotossíntese de cada cultivar em presença e ausência de pérola-da-terra também não manifestaram diferenças significativas ao longo de um gradiente de radiação (Figura 35). Considerando que essas curvas de fotossíntese potencial em relação à disponibilidade de radiação englobam todos os aspectos do metabolismo de fotossíntese foliar, tais como as etapas fotoquímicas e bioquímicas (Larcher, 2004), pode-se afirmar que, nestas condições experimentais, não houve influências do ataque de pérola-da-terra. Tratando-se dos diferentes materiais utilizados, mesmo os materiais considerados mais suscetíveis ('Isabel' e 'C. Sauvignon') tiveram um comportamento similar aos materiais considerados mais tolerantes ('548-15' e 'Paulsen 1103'), que mantiveram altos rendimentos de assimilação de CO₂.

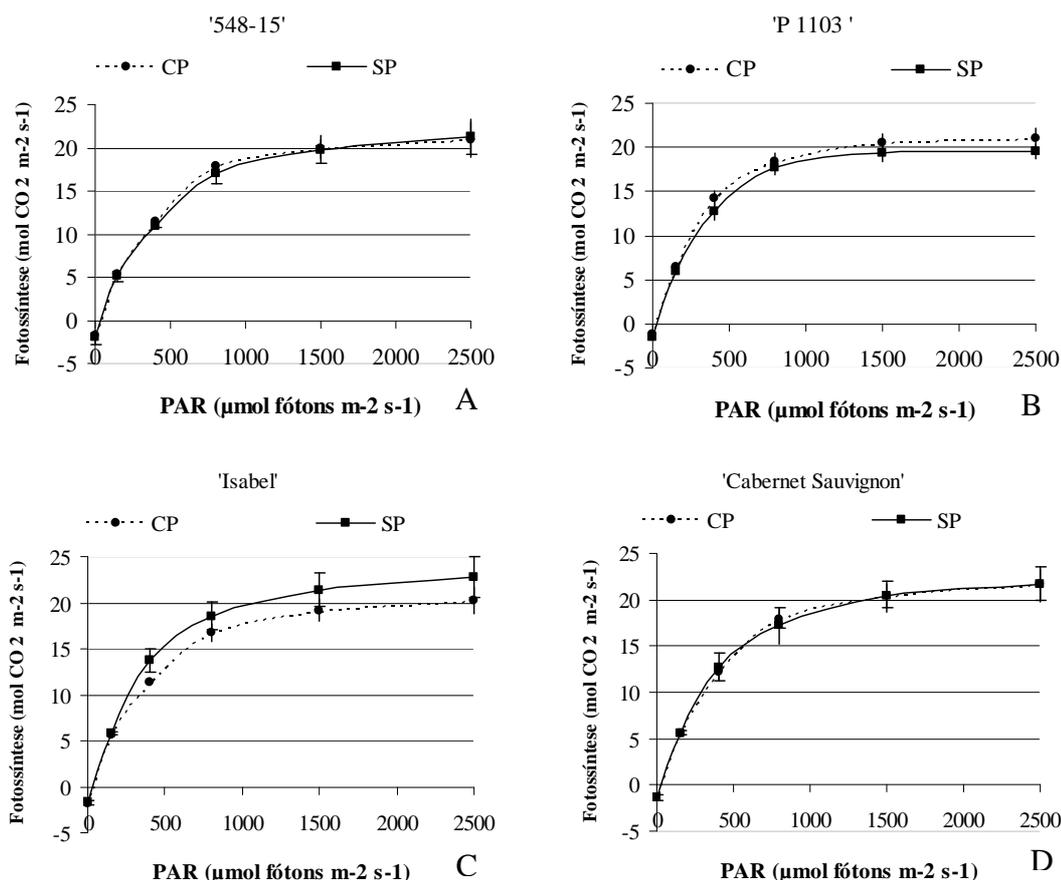


FIGURA 35. Curvas de fotossíntese ($\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) com gradiente de radiação (PAR) entre 0, 100, 400, 800, 2000 e 2500 μmol de fótons $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ em plantas de '548-15' (A), 'Paulsen 1103' (B), 'Isabel' (C) e 'Cabernet Sauvignon' (D), cultivadas em canteiros com (CP, linha pontilhada) e sem (SP, linha sólida) pérola-da-terra. As barras de erro padrão correspondem a 4 plantas. Bento Gonçalves, mar/2012.

Na análise de reservas de amido em ramos, salienta-se que a cultivar 'Cabernet Sauvignon' apresentou uma redução significativa nas plantas com pérola, em comparação às plantas controle (sem pérola) (Tabela 9). Nas demais cultivares, os valores percentuais de amido nos ramos foram similares ($p \leq 0,05$) no contraste de canteiros (com e sem pérola). Além disso, em todas as cultivares não foram observadas diferenças significativas desta reserva de amido nas folhas no contraste de ataque e ausência de pérola-da-terra. Com base nos valores numéricos, foram observadas até reduções na ordem de 30% na cultivar 'Paulsen 1103', 21% em 'Cabernet Sauvignon', 13% em 'Isabel' e 9% em '548-15'. Esta similaridade e tendência à redução observada em folhas de plantas atacadas por pérola, em comparação com plantas não infestadas, é totalmente distinta dos resultados observados por De Césaró (2008), que observou relação inversa na redução de amido em folhas, com maior concentração em folhas de

plantas atacadas. Entretanto, no experimento em que houve constatação de acúmulo de amido em folhas de videira, De Césaró (2008) avaliou plantas no campo, possivelmente com infestações superiores de pérola ao observado neste experimento, que foi de $4,25 \pm 1,11$ cistos por planta. Além disso, conforme observado no experimento de campo, salienta-se que outros organismos de solo podem estar contribuindo para a sintomatologia foliar e, portanto, estar gerando informações contrárias entre os trabalhos, nos valores de acúmulo de amido no contraste de plantas com a presença e ausência de pérola-da-terra. Além disso, destaca-se que videiras infectadas por viroses tendem a acumular amido em folhas com sintomas de enrolamento de folha (GLRaV) (Basso *et al.*, 2010a), o que corrobora com a hipótese de que a sintomatologia de acúmulo de amido não pode ser relacionada ao ataque de pérola-da-terra, mas a outros fatores fitossanitários.

TABELA 9. Valores médios (\pm erro padrão) do percentual de amido em folhas e ramos de plantas das cultivares de videira ‘548-15’, ‘Paulsen 1103’, ‘Isabel’ e ‘Cabernet Sauvignon’, enxertadas sobre ‘Paulsen 1103’ cultivadas em canteiros com pérola (CP) e sem pérola (SP). Bento Gonçalves, 2012.

Cultivar/canteiro	Amido	
	Folha (%) ^{NS}	Ramo (%)
‘548-15’	0,287 \pm 0,040	0,281 \pm 0,008 ^{NS}
‘P1103’	0,156 \pm 0,035	0,357 \pm 0,024 ^{NS}
‘Isabel’	0,181 \pm 0,037	0,334 \pm 0,019 ^{NS}
‘C.S.’	0,218 \pm 0,029	0,318 \pm 0,005*
‘548-15’	0,316 \pm 0,017	0,278 \pm 0,011
‘P1103’	0,223 \pm 0,043	0,379 \pm 0,013
‘Isabel’	0,209 \pm 0,025	0,344 \pm 0,005
‘C.S.’	0,275 \pm 0,019	0,337 \pm 0,002

^{NS} Diferenças não significativas ($p > 0,05$) pelo teste ‘t’ nas plantas das mesmas cultivares entre canteiros com (CP) e sem (SP) pérola.; * Significativo pelo teste t ($p < 0,05$)

Nos contrastes avaliados, entre plantas de canteiros infestados e não infestados por pérola, nas avaliações referentes ao crescimento (morfologia), capacidade física (clorofilas) e fisiológica (assimilação de CO₂) da fotossíntese, não foram observadas diferenças que possam explicar a queda de produção e morte de plantas de videiras no campo. Contudo, avaliações sobre possíveis alterações na atividade de enzimas oxidativas na região *in loco* do ataque da pérola da terra (raiz), pode servir de base para estudos sobre comportamento e atividade de defesa da planta, frente às injúrias das pragas (Conrath *et al.*, 2002). Dois grupos de enzimas que estão envolvidas na atividade oxidativa em plantas, as peroxidases e as polifenoloxidasas, possuem descrição de

atividades importantes no mecanismo de defesa em plantas por estresses bióticos e abióticos (Van Huystee, 1987, Cavalcanti *et al.*, 2005).

Nas análises em laboratório das raízes coletadas das plantas comprovadamente infestadas por pérola nos canteiros foi identificada mais do que o dobro da atividade de peroxidases (GPx), em comparação com plantas não infestadas (Figura 36, A). As atividades observadas de polifenoloxidasas (PPO) em plantas infestadas e não infestadas não demonstraram diferenças entre tratamentos (Figura 36,B), porém apresentaram valores superiores em unidade de atividade (UA), quando comparadas com os valores observados pelas atividades de peroxidases (Figura 36, A). A atividade de peroxidase tem sido associada a uma variedade de processos relacionados à defesa em plantas, até mesmo reações de hipersensibilidade, lignificação e suberização (Silva *et al.*, 2007). Sendo assim, apesar de não ter sido evidenciado nenhum efeito foliar, essas informações salientam que as plantas atacadas por pérola em canteiros estão manifestando respostas bioquímicas de defesa e que podem explicar a redução de vigor anteriormente citada (Figura 32, Tabela 7). Das observações realizadas com as raízes acondicionadas em câmara úmida, para promover esporulação de fungos infestantes, não foram identificados fungos causadores de doenças de raiz e/ou colo.

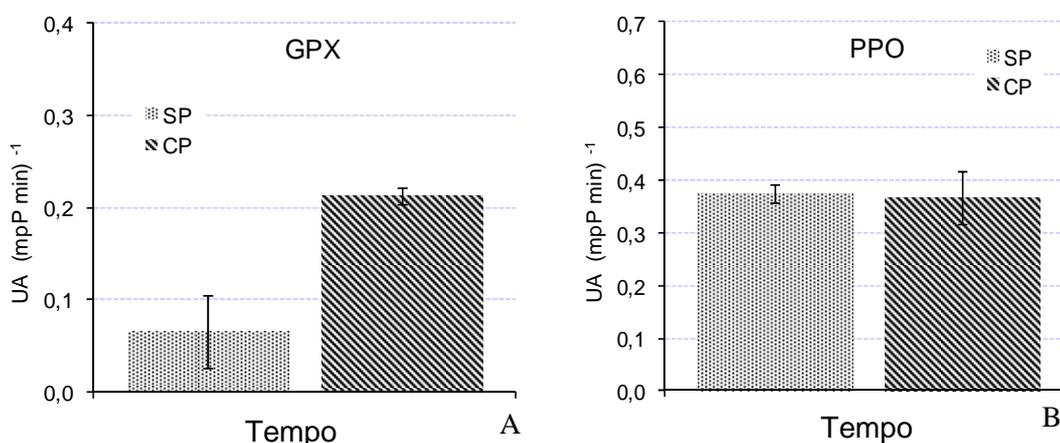


FIGURA 36. Atividades de peroxidases (GPx, EC 1.11.1.9) (A) e polifenoloxidasas (PPO, EC. 1.14.18.1) (B) em raízes de videira 'Paulsen 1103' infestadas (CP) e não infestadas (SP) com pérola-da-terra, durante três anos (Tempo). Uma unidade de atividade foi definida como a variação de uma unidade de absorbância (GPX = 480nm e PPO = 410nm) por miligrama de proteína por minuto (UA mgP⁻¹ min⁻¹). Barras de erros indicam desvio-padrão da média com quatro plantas. Bento Gonçalves, mar/2012.

4.3 Avaliação sintomática, bioquímica e morfo-fisiológica de plantas de videira 'Paulsen 1103' com diferentes interações entre pérola-da-terra e formiga

Neste primeiro experimento em condições controladas (em Gallotti, solo esterilizado e casa de vegetação), testou-se a presença isolada ou em interação de formigas (*Linepithema micans*) e pérola-da-terra com plantas de videira, buscando intensificar a infestação (pérola) e avaliar os possíveis efeitos de cada inseto isolado ou em combinação sobre a videira. Para isso, foram desenhados quatro tratamentos: 1) videira (V); 2) videira e formiga (V+F); 3) videira, pérola e formiga (V+P+F); 4) videira e pérola (V+P).

Na avaliação do grau de infestação, realizada entre novembro e dezembro de 2010 (300 dias após a instalação do experimento), as gaiolas foram abertas e a contagem direta das pérolas nas raízes confirmou que a infestação isolada de pérola (tratamento V+P) foi muito inferior que no tratamento que apresentou a combinação V+P+F. Em aproximadamente 50% das plantas (11 plantas) do tratamento V+P não manifestaram infestação por pérola, sendo que o restante das plantas deste tratamento (9 plantas) apresentaram uma média de $2,00 \pm 0,67$ cistos por planta (intervalo de variação de 1 – 7 cistos). Em contrapartida, no grau de infestação do tratamento V+P+F foi observada uma média de $35,21 \pm 6,33$ cistos por planta (com intervalo de 1 – 90 cistos).

Nos parâmetros de crescimento, destaca-se que por um período de 10 meses nestas condições experimentais não se observaram diferenças significativas em número de brotos/planta, número de gemas/broto (ou desenvolvimento dos brotos), número de feminelas/ramo, área foliar e massa fresca e seca de ramos e folhas (Tabelas 10 e 11). Contudo, foram observadas diferenças no comprimento de entrenós (Tabela 10) e no percentual de água em folhas e ramos (Tabela 11), sendo a interação formiga+pérola (V+F+P) o tratamento mais prejudicial.

Diante desses resultados, pode-se supor que na combinação pérola+formiga (*L. micans*), a formiga pode estar exercendo um efeito mais expressivo sobre a videira, neste tempo de avaliação do experimento. Mesmo o fator de tunelamento das formigas ser um aspecto pouco estudado (Hölldobler & Wilson, 1990), de acordo com Sudd & Franks, (1987) as formigas tendem a modificar o ambiente em prol de sua sobrevivência, alterando umidade e aeração, principalmente por meio de galerias e túneis escavados. Formigas do gênero *Linepithema* podem estar atuando ativamente no estabelecimento de tunelagem para circulação e transporte das ninfas de pérola no solo,

visto que mesmo em pouco tempo e em ambientes modificados elas podem promover tais mudanças (Gerbier *et al.*, 2008). Em avaliação do tempo de penetração da água (volume irrigado de 300 mL) e a quantidade percolada (volume de água coletada das gaiolas) foi observado que nas gaiolas com interação de formigas a água penetra no perfil do solo 15 vezes mais rápido que nas gaiolas sem formiga (dados não mostrados). Porém, o volume percolado (escorrimento de água coletado no fundo na bandeja) das gaiolas com formigas foi de uma a duas vezes maior do que as gaiolas sem a interação com formiga. Neste processo, a formiga aumenta a taxa de drenagem do solo pela formação de tunelamento no perfil do solo e, portanto, reduz a superfície de contato das raízes com a solução do solo (Figura 37 e 38). Outro fator importante é que em presença da pérola-da-terra, as formigas tornam-se mais ativas do que quando isoladas (Nondillo *et al.*, 2012a) e isso pode explicar as variações de crescimento de entrenós e do conteúdo de água que as plantas do tratamento F+P+V apresentaram.

TABELA 10. Número de brotações por planta, gemas e feminelas por ramo, comprimento de entrenós e área foliar observada em plantas de 'Paulsen 1103', cultivadas por 10 meses em gaiolas de Galotti com solo esterilizado e com as interações Videira (V), Videira e Formiga (V+F), Videira, Pérola e Formiga (V+P+F) e Videira e Pérola (V+P). Bento Gonçalves, out/2010.

Tratamentos	Nº Brotos / planta	Nº Gemas / broto	Nº Feminelas / ramo	Entrenó (cm)	Área foliar (cm ²)
Videira (V)	7,81	12,91	4,72	30,00 a	285,24
Formiga + V	9,90	12,60	4,90	28,79 ab	248,31
Pérola + Formiga + V	9,97	11,10	2,60	23,16 b	248,06
Pérola +V	8,00	12,38	3,88	31,85 a	272,21
Sig. (0,05)	ns	ns	ns	*	ns

* Valores com letras diferentes na coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

^{NS} Diferença não significativo pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

TABELA 11. Massa média fresca (MF) e seca (MS) de entrenós e foliar e conteúdo de água nos entrenós e folhas, observado de plantas de 'Paulsen 1103' cultivadas por 10 meses em gaiolas de Galotti com solo esterilizado e com as interações Videira (V), Videira e Formiga (V+F), Videira, Pérola e Formiga (V+P+F) e Videira e Pérola (V+P). Bento Gonçalves, out/2010.

Tratamentos	Massa média de entrenós		Massa média foliar		% H ₂ O	% H ₂ O
	MF (g)	MS (g)	MF (g)	MS (g)	Entrenós	Folhas
Videira (V)	1,41	0,25	2,89	0,47	82,71 ab	83,89 a
Formiga + V	1,47	0,23	2,53	0,40	84,33 a	83,97 a
Pérola + Formiga + V	1,05	0,19	2,67	0,50	82,28 b	81,10 b
Pérola +V	1,60	0,26	2,75	0,44	83,95 ab	84,09 a
Sig. (0,05)	ns	ns	ns	ns	*	*

* Valores com letras diferentes na coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^{NS} Diferença não significativo pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).



FIGURA 37. Gaiola de Gallotti aberta (sem o vidro) com tunelamento de formigas pela interação, juntamente, com pérola e videira. Bento Gonçalves, mar/2012. (Foto: Zart).



FIGURA 38. Detalhe do tunelamento de formigas próximo ao cisto de pérola, fixada em raiz de videira, cultivada em gaiola de Gallotti. Bento Gonçalves, mar/2012. (Foto: Zart).

No aspecto visual, apesar da expressiva infestação de pérola no tratamento F+P+V ($35,21 \pm 6,33$ cistos por planta) e durante 300 dias de ataque (dezembro/2010), não foram observadas nenhuma variação de forma ou pigmentação nas folhas destas plantas, em comparação com as folhas de videiras controle (Figura 39). Portanto, durante esse prazo e em condições controladas de infestação não foi possível mimetizar os sintomas identificados ao ataque da pérola no campo (Figura 3).

Essa semelhança visual das folhas é também comprovada na avaliação de nutrientes destes tecidos, na qual não foram observadas diferenças significativas em nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio entre os valores médios dos grupos de plantas atacadas e não atacadas por pérola-da-terra (Figura 40). Apesar desta semelhança, destaca-se que as plantas do tratamento V+P+F apresentaram pequenas reduções nos níveis de P, K, Ca e Mg, quando comparado com as demais interações (Figura 40). Contudo, dos elementos avaliados, somente o cálcio se manteve abaixo do nível recomendado para videira (CQFS-RS/SC, 2004).

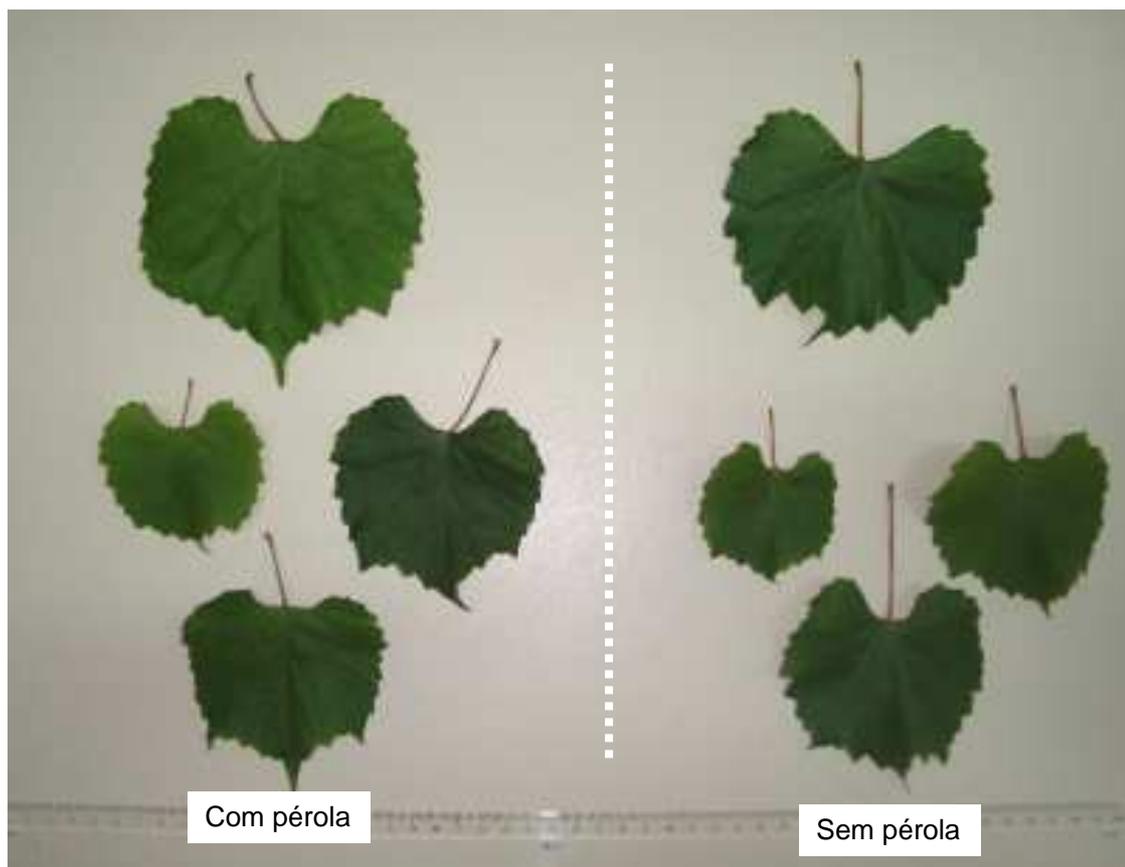


FIGURA 39. Comparação de folhas de 'Paulsen 1103' cultivadas em condições controladas (solo esterilizado), com ($35,21 \pm 6,33$ cistos por planta) e sem pérola-da-terra, durante 10 meses. Bento Gonçalves, nov/2010. (Foto: Zart).

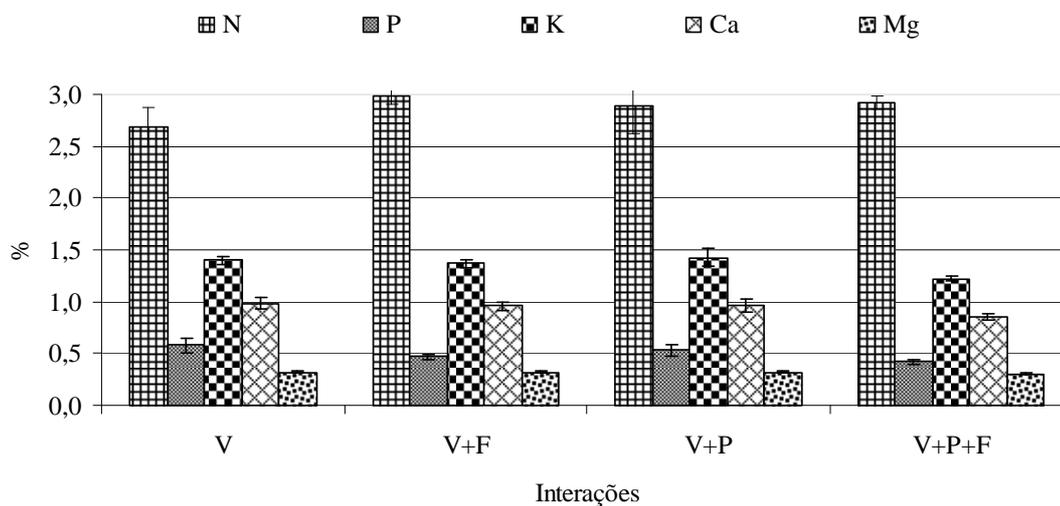


FIGURA 40. Percentual (%) de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em folhas coletadas de 'Paulsen 1103' cultivadas em gaiolas de Gallotti, com quatro interações diferentes e em condições controladas com infestação por 10 meses. As barras de erro referem-se à 11, 20, 9 e 19 repetições, respectivamente aos tratamentos de Videira (V); Videira e Formiga (V+F); Videira e Pérola (V+P); Videira, Pérola e Formiga (V+P+F). Bento Gonçalves, out/ 2010.

Para detalhar mais a interferência do ataque de pérola sobre o aspecto nutricional, comparou-se os dados individuais de cada nutriente em plantas com contrastes de infestação (nº de cistos) de pérola-da-terra. Nesta análise foram observadas correlações negativas, para nitrogênio ($r = -0,17$), potássio ($r = -0,23$) e magnésio ($r = -0,27$) (Figura 41, A, C, E). Contudo, para fósforo e cálcio, observaram-se correlações negativas com $r = -0,66$ e $-0,45$, respectivamente, indicando uma restrição destes nutrientes foliares com o aumento de infestação radicular de pérola-da-terra (Figura 41, B e D). Apesar desta tendência, mesmo em condições de alta infestação (plantas com mais de 50 pérolas) as plantas mantiveram-se nos níveis de nutrientes foliares suficientes para o metabolismo (CQFS-RS/SC, 2004), o que corrobora com a ausência de qualquer sintoma de deficiência (Figura 34 e 39), quando comparado com sintomas atribuídos ao ataque do inseto no campo (Figura 3).

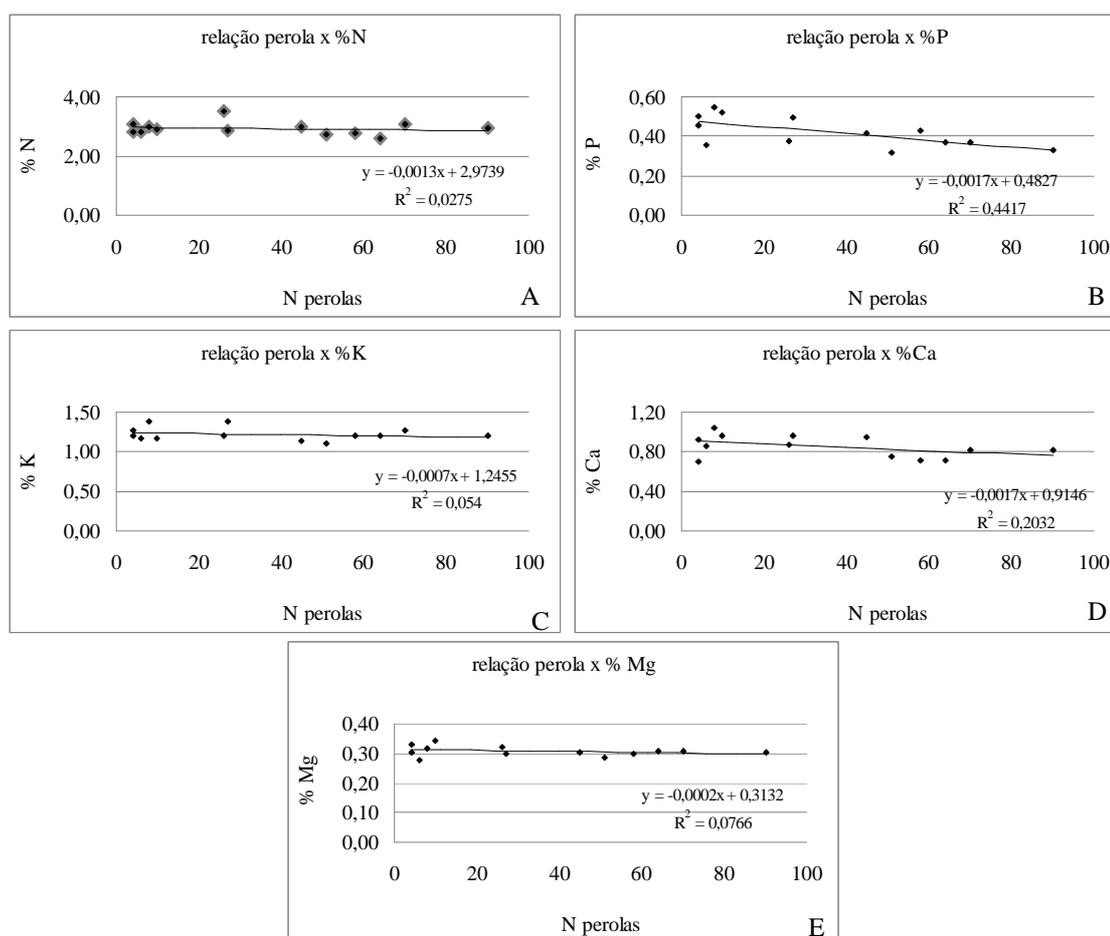


FIGURA 41. Relações entre os percentuais de nitrogênio (A), fósforo (B), potássio (C), cálcio (D) e magnésio (E) em folhas de 'Paulsen 1103' e o número de cistos de pérola observado em plantas cultivadas em gaiolas de Gallotti com condições controladas, após 10 meses de infestação. Bento Gonçalves, nov/2010.

Esses resultados nutricionais diferem dos dados observados por De César (2008), analisando folhas de videiras (cv. 'Isabel') infestadas e não infestadas por pérola em condições de campo, cujo os níveis de potássio em folhas sem sintomas de plantas infestadas foram significativamente menores (0,55%) do que os níveis de plantas controle não infestadas (0,76%). Mesmo que a cultivar avaliada ('Paulsen 1103') seja um porta-enxerto, que não dispõe de registro de interpretações nutricionais foliares, o fato de não haver contrastes entre plantas com e sem a infestação por pérola já possibilita a interpretação de que o inseto em condições controladas não altera os níveis nutricionais nas folhas de plantas atacadas, mesmo em altos índices de infestação.

Nas avaliações de aminoácidos e proteínas totais não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as interações avaliadas (Figuras 42 e 43).

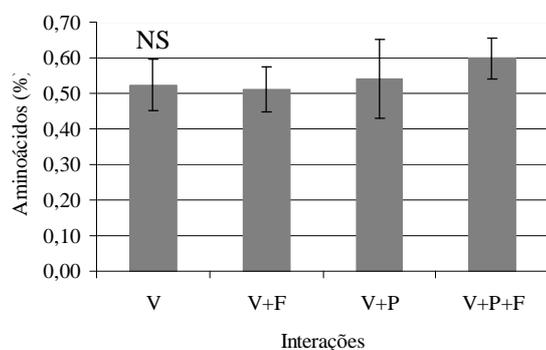


FIGURA 42. Percentual de aminoácidos totais em folhas de videiras da cultivar 'Paulsen 1103' nas interações: videira (V); videira x formiga (V+F); videira x pérola (V+P) e videira x pérola x formiga (V+P+F), cultivadas em gaiolas de Gallotti e casa de vegetação, após 300 dias de infestação de pérola. NS: não significativo pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Bento Gonçalves, nov/2010.

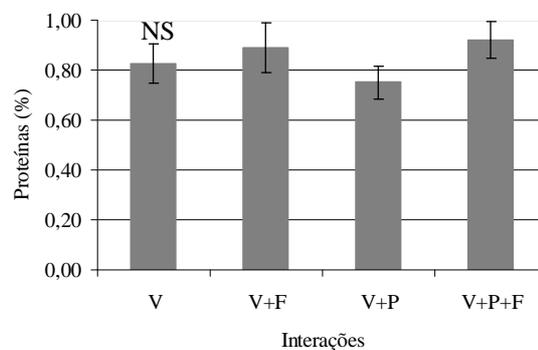


FIGURA 43. Percentual de proteínas totais em folhas de videiras da cultivar 'Paulsen 1103' nas interações: videira (V); videira x formiga (V+F); videira x pérola (V+P) e videira x pérola x formiga (V+P+F), cultivadas em gaiolas de Gallotti e casa de vegetação, após 300 dias de infestação de pérola. NS: não significativo pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Bento Gonçalves, nov/2010.

Na análise de reservas de amido em folhas, observou-se que a presença de pérola-da-terra proporcionou uma redução significativa ($p < 0,05$), principalmente nas plantas da interação V+F+P (Figura 44). Na interação V+P também houve queda no amido em folha, mostrando que a pérola, mesmo em baixos níveis de infestação (média de 2 cistos por planta), pode reduzir o percentual de reservas nas folhas.

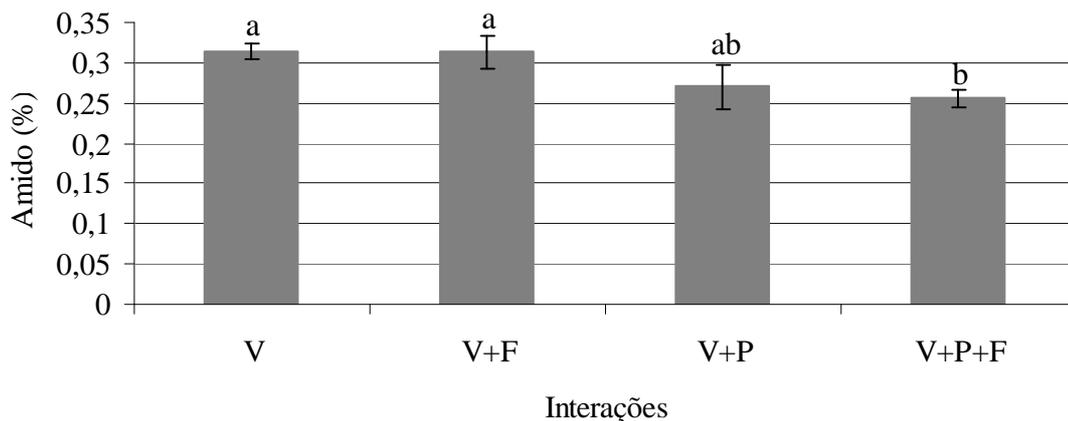


FIGURA 44. Percentual de amido em folhas de videiras da cultivar 'Paulsen 1103' nas interações: videira (V); videira e formiga (V+F); videira e pérola (V+P) e videira, pérola e formiga (V+P+F), cultivadas em gaiolas de Gallotti após 300 dias de infestação de pérola com médias de 2 e 35,2 cistos/planta para V+P e V+P+F, respectivamente. Letras diferentes representam significância pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Bento Gonçalves, nov/2010.

O efeito da presença da pérola-da-terra sobre o percentual de amido fica mais evidente quando se correlaciona esta variável com o número de cistos presentes nas raízes, atingindo correlação negativa ($r = -0,65$) entre percentual de amido e número de cistos na planta (Figura 45).

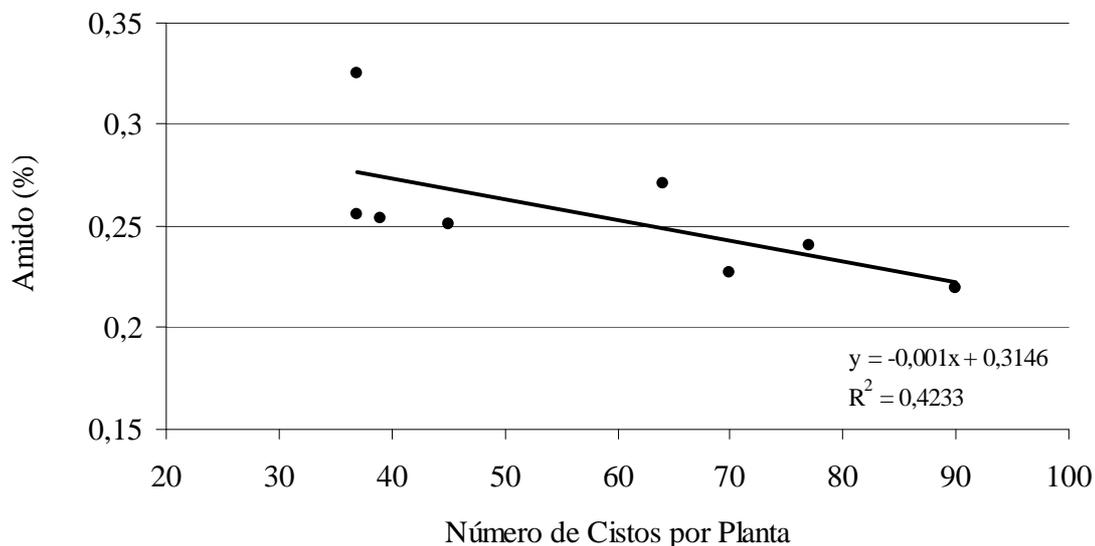


FIGURA 45. Relação entre o percentual de amido em folha e o número de cistos de pérola-da-terra observado nas raízes de videiras 'Paulsen 1103' cultivadas em gaiola de Gallotti com 10 meses de infestação. Bento Gonçalves, nov/2010.

Diantes destes resultados salienta-se que a supressão de amido nas folhas está mais relacionada com o aumento do dreno de carbono, proporcionado pela sucção de pérolas-da-terra ou pela maior respiração de manutenção dos tecidos radiculares atacados pelo inseto. Em plantas de alfafa (*Medicago sativa* L.) Pirrone *et al.*, (2005) observaram redução de amido nas folhas de plantas infestadas, quando comparadas com plantas não infestadas pela cigarrinha *Empoasca fabae* (Harris), porém com os insetos atacando diretamente as folhas do hospedeiro. A importância do dreno também é corroborada pela análise fotossintética, pois não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, apesar das plantas com maior infestação (V+P+F) terem apresentado uma leve redução (Figura 46).

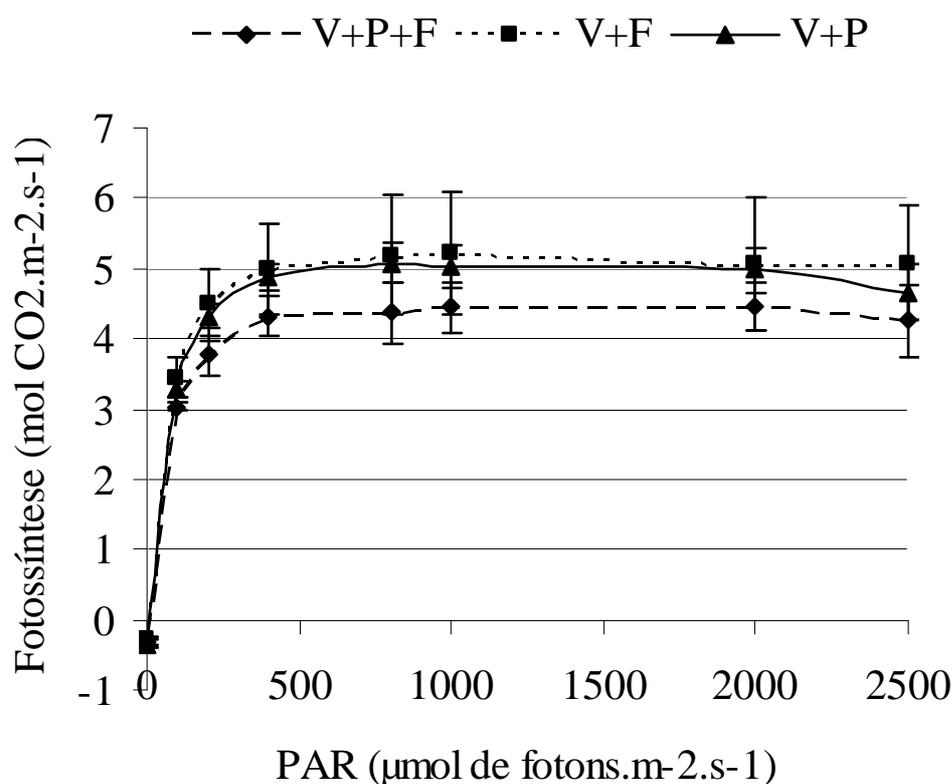


FIGURA 46. Curvas de fotossíntese ($\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) com gradiente de radiação (PAR) entre 0, 100, 200, 400, 800, 1000, 2000 e 2500 $\mu\text{mol de ftons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ em plantas de 'Paulsen 1103' cultivadas em gaiolas de Gallotti nas interações videira e formiga (V+F); videira e pérola (V+P) e videira, pérola e formiga (V+P+F), em casa de vegetação, após 10 meses de infestação. As barras de erro padrão correspondem a 4 plantas. Diferenças não significativas pelo teste de Tukey ($p>0,05$). Bento Gonçalves, nov/2010.

O amido transitório nas folhas representa o equilíbrio de carbono entre a síntese (fotossíntese) e a translocação para os órgãos drenos (ex.: tecidos em crescimento,

frutos, raízes) (Lambers *et al.*, 2008). Portanto, se a atividade fotossintética for similar e há reduções de amido, certamente a força de dreno é que está sendo determinante para esse resultado. Pirrone *et al.*, (2005) citam que o percentual de amido em folhas de alfafa atacadas por cigarrinhas tende a ser menores nos períodos de escuridão (quando não há fotossíntese). Considerando que os horários de coleta das folhas para as análises de amido foram no período entre 10:00 e 11:30 horas do dia, quando ocorre a máxima atividade fotossintética (Larcher, 2004), não se pode descartar a hipótese de que podem haver mais reduções desse carboidrato nas folhas em outros horários do dia.

Esses resultados de amido e fotossíntese são distintos dos dados apresentados por De Césaró (2008), o que comprova a hipótese de que nas condições de campo podem estar ocorrendo interferências de outros organismos do solo sobre o metabolismo foliar, as quais são eliminadas com a esterilização do solo e isolamento dos efeitos da pérola-da-terra.

Nas plantas deste experimento (mantidas infestadas desde janeiro de 2010) não foi observado qualquer sintoma característico de deficiência ou daqueles atribuídos ao ataque da pérola-da-terra na videira, mesmo nas enxertias realizadas em outubro de 2011 com copas de videiras consideradas suscetíveis ('Cabernet Sauvignon' e 'Isabel').

4.4 Avaliação do desenvolvimento, crescimento, aspectos bioquímicos e morfo-fisiológicos de plantas de 'Paulsen 1103' cultivadas em diferentes interações com pérola-da-terra, formiga e o fungo *Cylindrocarpon destructans*.

Na avaliação das brotações foi observado que após a poda (10/08/11) todas as plantas tiveram brotações de gemas, não ocorrendo morte de plantas entre as datas de infestações de fungos e pérolas (janeiro/2011) até o momento das brotações (agosto-setembro/2011). Porém, no percentual de brotação acumulada ao longo do tempo pode-se observar um maior atraso na evolução da brotação entre as plantas com interação pérola + formiga (V+P+F e V+P+F+C), em comparação das plantas sem a presença destes organismos (V e V+C) (Figura 47).

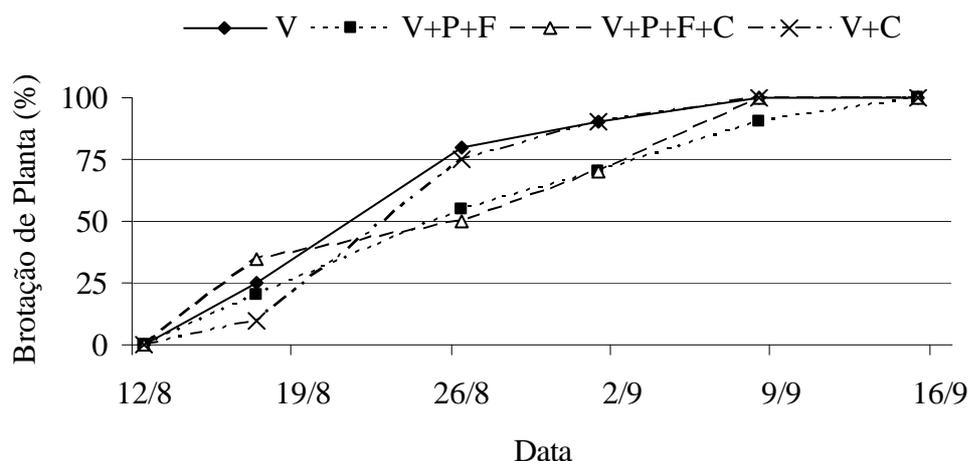


FIGURA 47. Percentual de brotações em plantas de videira 'Paulsen 1103' nas interações: Videira (V); Videira, Pérola e Formiga (V+P+F); Videira, Pérola, Formiga e *Cylindrocarpon* (V+P+F+C) e Videira e *Cylindrocarpon* (V+C), cultivadas em gaiolas de Gallotti, em casa de vegetação, após 150 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. Bento Gonçalves, ago/2011.

Apesar deste contraste na evolução da brotação, os parâmetros de crescimento avaliados nas plantas entre outubro e novembro/2011 não demonstraram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 12), considerando-se dez meses das infestações (pérola, formigas e fungos).

TABELA 12. Número médio (\pm erro padrão) do diâmetro do colo (mm), número de brotos por planta, número de gemas por broto, comprimento de entrenó (cm) e número de feminelas por planta de videira 'Paulsen1103' nos tratamentos Videira (V), V + pérola + formiga (V+P+F), V+P+F+ fungo *Cylindrocarpon destructans* (C) e V+C, cultivadas em gaiolas de Gallotti, em casa de vegetação, após 330 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. Bento Gonçalves dez/2012.

Tratamentos	Diâmetro Colo (mm) ^{NS}	Nº Brotos /planta ^{NS}	Nº Gemas /broto ^{NS}	Comprimento entrenó (cm) ^{NS}	Nº Feminela /planta ^{1NS}
V	5,20 \pm 0,13	3,75 \pm 0,40	7,36 \pm 0,70	4,49 \pm 0,48	0,73 \pm 0,32
V+P+F	5,20 \pm 0,12	4,10 \pm 0,40	7,23 \pm 0,65	3,93 \pm 0,42	0,57 \pm 0,27
V+P+F+C	5,26 \pm 0,13	3,20 \pm 0,31	8,33 \pm 0,64	4,69 \pm 0,46	0,95 \pm 0,41
V+C	5,01 \pm 0,08	4,00 \pm 0,37	6,91 \pm 0,60	4,68 \pm 0,54	0,59 \pm 0,28

¹Dados transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$ para análise de variância. ^{NS} Diferença não significativo pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

O gênero *Cylindrocarpon* tem como características a sobrevivência em solos com pouco oxigênio, colonizador pioneiro de raízes jovens e rápido crescimento micelial em seus hospedeiros, além de conseguir se aproveitar de nitrogênio de origem orgânica e inorgânica (Brayford, 1993). Como foi comprovada a existência de estruturas

de sobrevivência de *Cylindrocarpon destructans* no substrato coletado em agosto/2011 (Figura 48 e 49), nos tratamentos com inoculação (V+P+F+C e V+C), pode-se confirmar que o solo está com o inóculo, e a razão para a não infestação pode decorrer do alto teor de matéria orgânica encontrada no solo (nitrogênio para o patógeno), como também, altos níveis de nutrientes para as plantas nas diferentes interações (Tabela 13). Plantas em equilíbrio nutricional possuem maior tolerância à infestação por patógenos, ou mesmo, reduzindo a virulência do ataque/colonização (Van Der Plank, 1963).

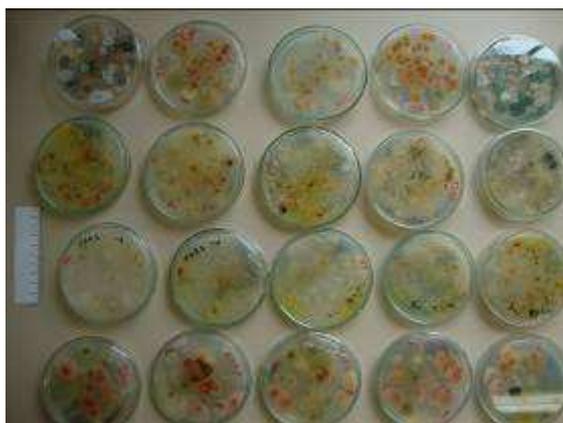


FIGURA 48. Vista geral das placas contendo meio de cultura (BDA) com o crescimento das colônias de diferentes espécies de fungos contidos no substrato. Bento Gonçalves, ago/2011 (Foto: Zart).



FIGURA 49. Placa com crescimento de colônia de *Cylindrocarpon* (circulada em vermelho), identificada visualmente e posteriormente comprovada por isolamento. Bento Gonçalves, ago/2011 (Foto: Zart).

TABELA 13. Análise do substrato utilizado para cultivo de videiras em gaiola de Gallotti, quanto ao pH (em H₂O); argila (%) e matéria orgânica (MO, em %); fósforo (P), potássio (K), enxofre (S), zinco (Zn), cobre (Cu), boro (B) e manganês (Mn) em mg/dm³; cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em cmolc/dm³. Bento Gonçalves, ago/2011.

Interação	Argila	pH	MO	P	K	Ca	Mg	S	Zn	Cu	B	Mn
	(%)	(%)	(%)	(mg/dm ³)	(mg/dm ³)	(cmolc/dm ³)	(cmolc/dm ³)	(mg/dm ³)				
V	18,33	6,53	>10	>100	273,67	16,53	7,33	14,67	16,00	19,33	1,77	3,33
V+P+F	22,67	6,50	9,93	>100	273,33	16,57	7,53	12,67	19,00	21,33	1,80	4,33
V+P+F+C	20,67	6,63	>10	>100	267,33	16,47	7,47	8,73	18,33	20,33	1,80	3,67
V+C	21,33	6,57	>10	>100	265,33	16,23	7,33	16,50	15,67	19,67	1,83	3,00

Na avaliação do potencial de água nas folhas das plantas ao longo do dia 05/01/2012 se evidenciou algumas diferenças pontuais entre os tratamentos, em alguns horários, porém não houve grandes contrastes na evolução diária do conteúdo de água foliar (Figura 50). Além disso, no potencial de base (5:30h), quando as plantas atingem o equilíbrio hídrico em relação à disponibilidade de água no solo (Van Zyl, 1987),

percebe-se que folhas de todos os tratamentos estavam nas mesmas condições hídricas (em média -0,2 MPa). Nesse limite de potencial de base, próximo a -0,2 MPa, a videira não se encontra em condições de déficit hídrico, conforme Ojeda *et al.*, (2004), comprovando que a frequência (1 vez ao dia) e volume (300 mL) de rega adotado não proporcionaram limitações hídricas para as videiras neste experimento. As plantas foram irrigadas no dia anterior, às 20:00, conforme descrito nos materiais e métodos (sub item 3.1.3.3) e o conteúdo de água no solo se manteve estável ao longo do dia em que foi realizado a análise de potencial foliar (Tabela 14).

TABELA 14. Períodos de observação da umidade (m^3/m^3) do substrato das gaiolas de Gallotti (com sensor de barra, PR2, Delta-T Devices Ltda) em diferentes profundidades, umidade relativa do ar (%) e temperatura ($^{\circ}C$) com termohigrógrafo de penas gráficas (marca LAMBRECHT, modelo 252). Bento Gonçalves, jan/2012.

Hora Avaliada	UR (%) do ar	Temperatura do ar ($^{\circ}C$)	m^3/m^3 H ₂ O nas profundidades		
			5(cm)	15(cm)	25(cm)
07:50	75	15	0,090	0,061	0,064
11:45	45	26	0,090	0,058	0,063
17:30	42	29	0,073	0,060	0,071

As maiores tensões foliares, ou potencial mínimo foliar, foram observadas às 16:00 do dia, quando a temperatura estava próxima a $30^{\circ}C$ e com baixa UR (40%). Neste momento a interação V+C alcançou -1,26MPa, seguido por V+P+F+C (-1,13 MPa), V+P+F (-1,10 MPa) e V (-1,09 MPa). Após este período ocorreu a inflexão da curva, diminuindo a tensão observada nas folhas (Figura 50). Esses valores foram muito próximos entre os tratamentos e estão acima do ponto de murcha permanente da videira (-1,5 MPa, Ojeda *et al.*, 2004), o que corrobora com a informação de que essas plantas não se apresentam em condições de estresse hídrico.

Historicamente é atribuído que em anos secos existe uma alta relação de morte de plantas com déficit hídrico em áreas infestadas por pérola-da-terra, visto que insetos como a pérola possuem preferência de habitar solos bem drenados e arenosos (Foldi, 2005). Contudo, os resultados salientam que mesmo em situação de maior demanda hídrica nos horários mais quentes do dia, pode-se perceber que as plantas infestadas por pérola demonstraram potencial de água muito próximo aos observados em plantas sem pérola.

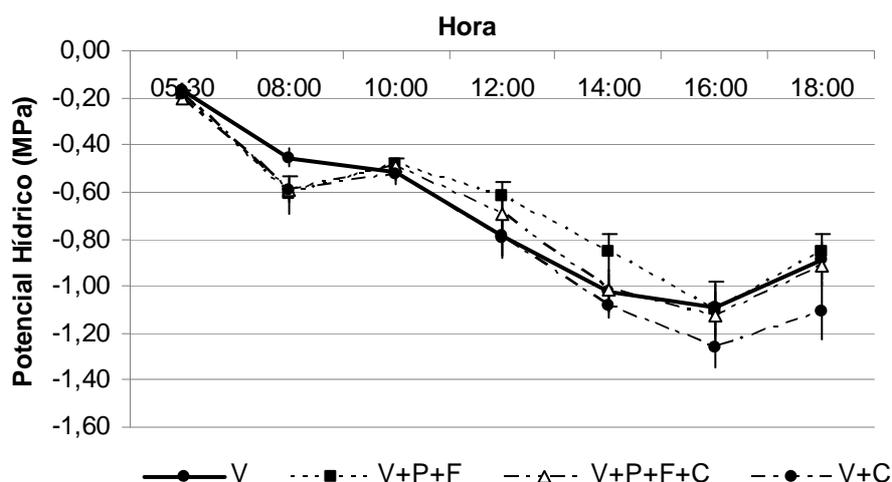


FIGURA 50. Potencial de água na folha ao longo de um dia (05/01/2012), avaliado em plantas de 'Paulsen 1103' nas interações videira (V), videira, pérola e formiga (P+F), videira, pérola, formiga e *Cylindrocarpon* (C) e videira e *Cylindrocarpon*, cultivadas em gaiolas de Gallotti, em casa de vegetação, após 360 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. Bento Gonçalves jan/2012.

No acompanhamento da evolução diária de fotossíntese, avaliando-se com as condições reais de luz do ambiente (câmara de topo aberto do IRGA), pode-se perceber que os tratamentos não se diferenciam estatisticamente, seguindo o mesmo perfil do metabolismo foliar ao longo do dia. Salienta-se apenas uma pequena restrição de atividade às 10:45h nos diferentes tratamentos em relação ao controle (somente videira) (Figura 51). Contudo, essa restrição foi leve, sem se manifestar nos demais horários mais quentes do dia e pode estar associada à menor abertura estomática nestes tratamentos, a qual se justifica em horários em que as plantas enfrentam maiores déficits de pressão de vapor do ar (Lambers *et al.*, 2008). As oscilações fotossintéticas ocorridas nos demais horários do dia estão relacionadas à presença de nuvens, principalmente após 13:30.

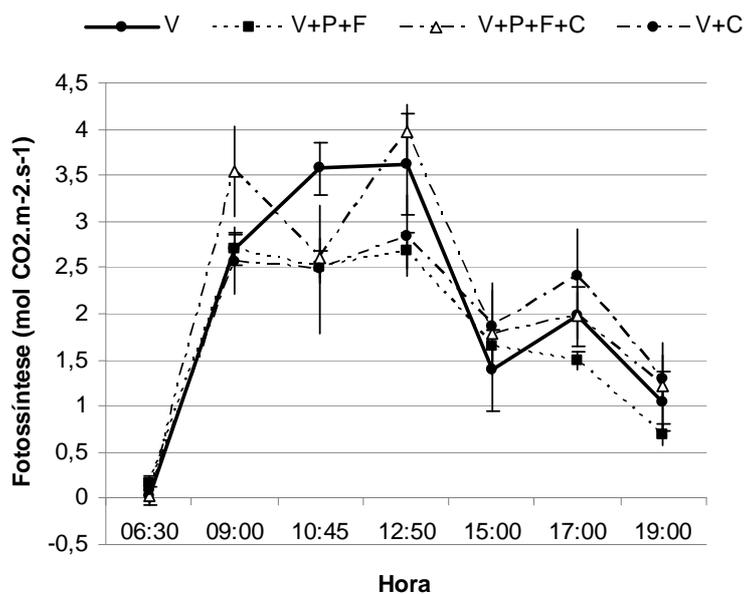


FIGURA 51. Médias de fotossíntese ($\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) avaliadas ao longo de um dia (05/01/12) em plantas de 'Paulsen 1103' cultivadas em gaiolas de Gallotti em condições controladas nas interações videira (V), videira, pérola e formiga (P+F), videira, pérola, formiga e *Cylindrocarpon* (C) e videira e *Cylindrocarpon*, cultivadas em gaiolas de Gallotti e em casa de vegetação, após 360 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. Bento Gonçalves, jan/ 2012.

Apesar da similaridade no comportamento fotossintético diário, com a radiação do ambiente, percebe-se que na análise potencial de fotossíntese, com curvas de radiação artificial, destas mesmas folhas existem contrastes significativos entre os tratamentos (Figura 52). Observa-se uma ampla superioridade nas plantas da interação V+P+F+C sobre as demais, a partir da taxa de $400 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, demonstrando saturação de luz entre 2000 e $2500 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 52). Portanto, a presença do fungo *Cylindrocarpon* favoreceu o potencial fotossintético em altas radiações, ou seja, favoreceu o aparato fotossintético para assimilar a energia luminosa em maiores intensidades. Esse efeito foi também comprovado pelos dados de clorofila, salientando que nas diferentes interações de videira, pérola, formiga e fungo mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) para os teores de clorofila β em favor das plantas que estavam em presença do fungo *Cylindrocarpon* (V+P+F+C e V+C) (Tabela 15).

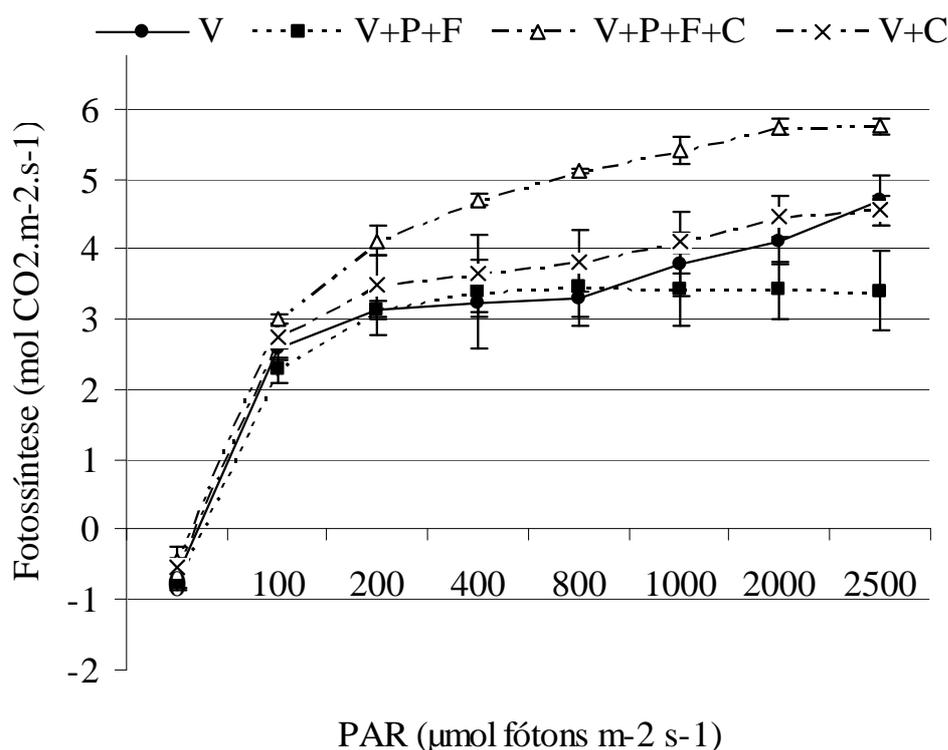


FIGURA 52. Curvas de fotossíntese ($\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) com gradiente de radiação (PAR) entre 0, 100, 200, 400, 800, 1000, 2000 e 2500 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em plantas de 'Paulsen 1103' nas interações videira (V), videira, pérola e formiga (P+F), videira, pérola, formiga e *Cylindrocarpon* (C) e videira e *Cylindrocarpon*, cultivadas em gaiolas de Gallotti e em casa de vegetação, após 360 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. As barras de erro padrão correspondem a 3 plantas. *Diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Bento Gonçalves, jan/2012.

A clorofila β participa do complexo de antena nos tilacóides dos cloroplastos, atuando na captação de energia luminosa e sendo diretamente responsiva às condições ambientais de luminosidade e assimilação de nitrogênio (Lambers *et al.*, 2008). Portanto, o acúmulo desta clorofila pode estar sendo estimulado pela colonização deste fungo nas raízes, assim como foi observado em *Vigna unguiculata* por fungos micorrízicos (Arumugam *et al.*, 2010).

Este benefício observado sobre o acúmulo de clorofila e fotossíntese potencial, entretanto, não se refletiu nos dados de amido foliar. Na análise dos teores de amido, realizado nas folhas e ramos coletados dia 06/01/12 das plantas nas diferentes interações, foram observados menores percentuais em ramos e folhas das interações com infestação de *Cylindrocarpon* (V+P+F+C e V+C), com diferenças significativas

($p < 0,05$) (Figura 53). Essa diferença se relaciona de modo inverso com os dados de clorofila e fotossíntese potencial, o que salienta que esta redução de amido temporário se deve ao aumento de drenos de carboidratos nestas plantas. Normalmente, tecidos que apresentam maior atividade de crescimento ou de manutenção (ex.: reparo por danos bióticos) tendem a demandar maior aporte de carboidratos (Taiz & Zeiger, 2004).

TABELA 15. Valor médio (\pm erro padrão) da estimativa de clorofila α , β e total, pelo índice de clorofila Falker (ICF), obtido através de leituras com clorofilômetro portátil (clorofiLOG 1030) em folhas de 'Paulsen 1103' cultivadas em gaiolas de Gallotti em condições controladas nas interações Videira (V), V - pérola - formiga (P+F), V - P - F - *Cylindrocarpon* (C) e V - C, cultivadas em casa de vegetação, após 360 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. Bento Gonçalves, jan/2012.

Interações	ICF		
	α^{NS}	B*	Total ^{NS}
V	14,14 \pm 0,41	3,25 \pm 0,10 b	17,39 \pm 0,51
V+P+F	14,73 \pm 0,35	3,43 \pm 0,08 b	18,15 \pm 0,41
V+P+F+C	15,35 \pm 0,39	5,54 \pm 0,11 a	18,89 \pm 0,50
V+C	15,16 \pm 0,50	5,54 \pm 0,14 a	18,70 \pm 0,63

* Diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) por letra diferentes na linha. ^{NS} Não significativo pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os resultados nesta avaliação de amido em folha foram superiores aos dados observados em 2010 (sub item 4.4, Figura 48), principalmente no comparativo dos tratamentos de pérola e formiga. Além disso, as diferenças no percentual de amido podem estar vinculadas ao manejo hídrico (com maior controle neste experimento), devido à diferença no número de plantas cultivadas por gaiola (aumentou para duas) como também, a troca do telhado (que ocorreu em novembro/2011), aumentando a entrada de luz para o interior da casa-de-vegetação e o suplemento realizado com solução nutritiva, realizada nos meses de setembro e outubro de 2011.

Na avaliação dos teores nutricionais observados das folhas coletadas (06/01/2012) foram observadas diferenças significativas nos teores de ferro, que apresentou acúmulo deste metal, com maiores teores nas interações com *Cylindrocarpon* (Tabela 16). No nutriente boro, plantas do tratamento controle (V) apresentaram os menores teores ($p < 0,05$) em folhas, quando comparados com as demais interações. Entretanto, os valores observados de boro se enquadram nos limites normais para videira, porém para ferro, o valor é considerado excessivo nas quatro interações (CQFS-RS/SC, 2004).

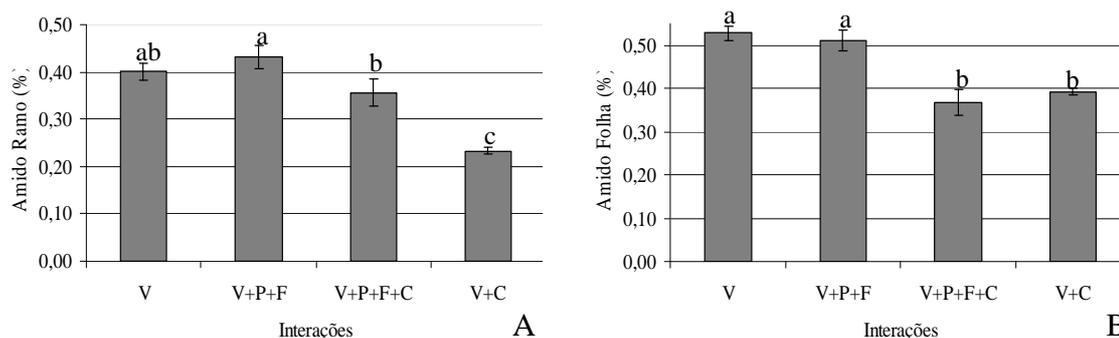


FIGURA 53. Percentual de amido em ramos (A) e folhas (B) de videiras da cultivar 'Paulsen 1103' nas interações: videira (V); videira, pérola e formiga (V+P+F); videira, pérola, formiga e *Cylindrocarpon* (V+P+F+C) e videira e *Cylindrocarpon* (V+C), cultivadas em gaiolas de Gallotti após 360 dias da infestação de pérola e inoculação do fungo. Letras diferentes representam significância pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Bento Gonçalves, jan/2012.

TABELA 16. Percentual (%) de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, e mg.Kg^{-1} de zinco, manganês, boro, ferro e cobre em folhas coletadas de videiras 'Paulsen 1103' cultivadas em gaiolas de Gallotti e casa de vegetação, nas interações Videira (V); V – Pérola (P) – Formiga (F) (V+P+F); V – P – F – *Cylindrocarpon* (C) e V – C. Análise após 180 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. Bento Gonçalves, jan/2012.

Nutriente	Interações			
	V	V+P+F	V+P+F+C	V+C
Nitrogênio (%) ^{NS}	1,60 ± 0,07	1,45 ± 0,03	1,56 ± 0,06	1,70 ± 0,10
Fósforo (%) ^{NS}	0,61 ± 0,03	0,50 ± 0,06	0,55 ± 0,05	0,56 ± 0,01
Potássio (%) ^{NS}	1,15 ± 0,05	1,14 ± 0,13	1,23 ± 0,04	1,10 ± 0,10
Cálcio (%) ^{NS}	1,85 ± 0,05	1,95 ± 0,13	1,98 ± 0,06	1,85 ± 0,05
Magnésio (%) ^{NS}	0,39 ± 0,01	0,39 ± 0,03	0,39 ± 0,01	0,37 ± 0,03
Enxofre (%) ^{NS}	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,19 ± 0,04
Zinco (mg.Kg^{-1}) ^{NS}	24,50 ± 0,50	26,75 ± 1,70	25,17 ± 0,98	27,00 ± 1,00
Manganês (mg.Kg^{-1}) ^{NS}	150,50 ± 8,50	145,50 ± 15,88	145,33 ± 7,39	152,50 ± 6,20
Boro (mg.Kg^{-1}) [*]	28,50 ± 0,92 b	37,00 ± 1,90 a	38,80 ± 1,62 a	41,89 ± 0,93 a
Ferro (mg.Kg^{-1}) [*]	257,5 ± 11,5 b	233,7 ± 38,4 b	364,8 ± 55,1 a	351,0 ± 68,0 a
Cobre (mg.Kg^{-1}) ^{NS}	11,50 ± 0,50	9,50 ± 0,65	10,00 ± 0,68	9,50 ± 0,50

* Diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) por letra diferentes na linha. ^{NS} Não significativo pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Na avaliação das brotações após a segunda poda (10/01/12) praticamente todas as plantas apresentaram brotações de gemas, com exceção de uma planta de cada das interações V e V+P+F+C (Figura 54).

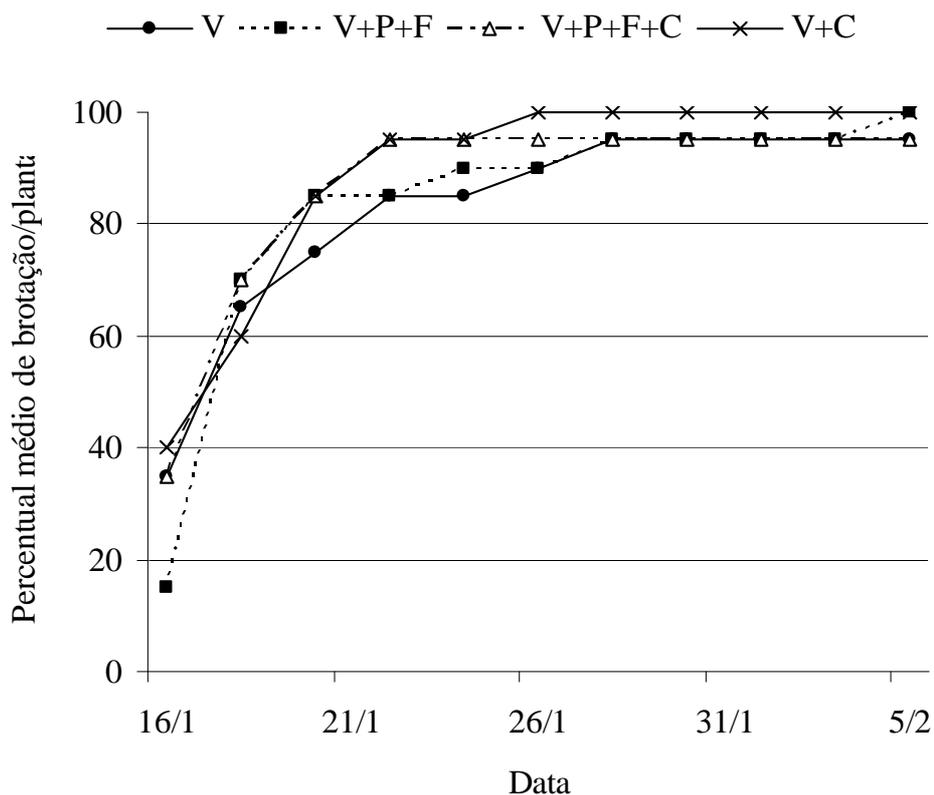


FIGURA 54. Percentual de brotações em plantas de videira 'Paulsen 1103' nas interações: videira (V); videira, pérola e formiga (V+P+F); videira, pérola, formiga e *Cylindrocarpon* (V+P+F+C) e videira e *Cylindrocarpon* (V+C), cultivadas em gaiolas de Gallotti, após 360 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. Bento Gonçalves, jan/2012.

O comportamento foi similar entre os tratamentos, porém, para número total de brotações foi observado maior número de brotações na interação V+P+F em comparação com as interações V e V+P+F+C, estando a interação V+C numa posição intermediária (Figura 55).

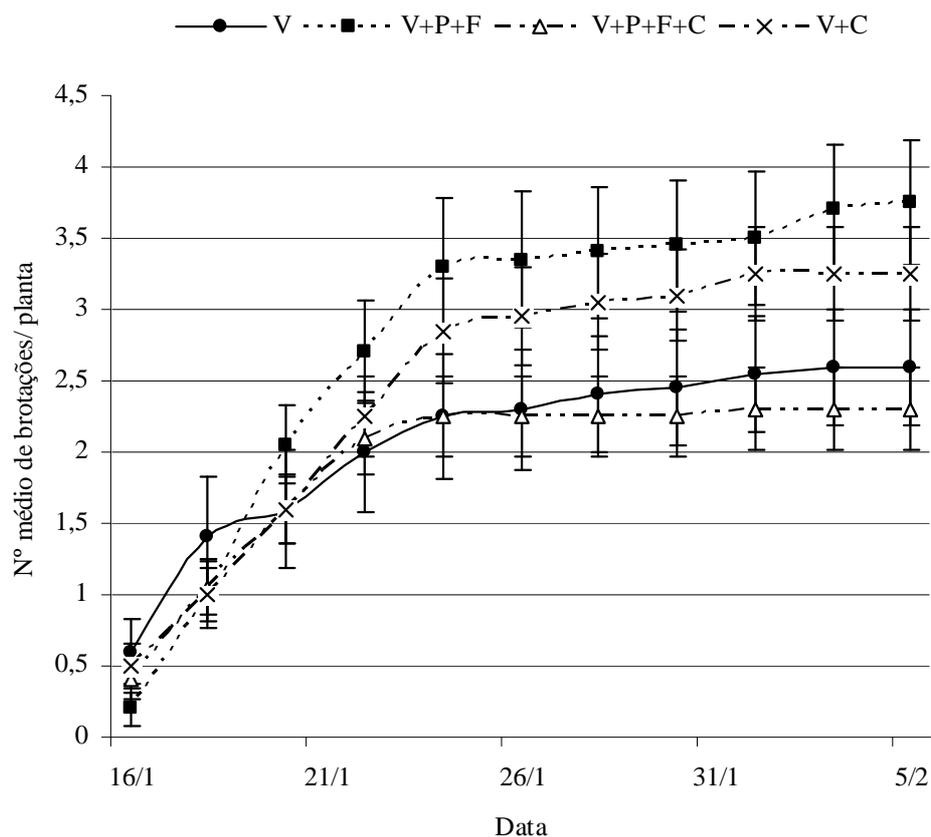


FIGURA 55. Número total de brotações em plantas de videira ‘Paulsen 1103’ nas interações: videira (V); videira, pérola e formiga (V+P+F); videira, pérola, formiga e *Cylindrocarpon* (V+P+F+C) e videira e *Cylindrocarpon* (V+C), cultivadas em gaiolas de Gallotti, após 360 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. Bento Gonçalves, jan/2012.

Quando observado o crescimento de folhas (emissão) com relação ao tempo avaliado foi observado similaridade entre os tratamentos, com exceção do tratamento V que apresentou significativamente um número menor, o que representa consequentemente, um menor número de gemas nos ramos das plantas avaliadas (Figura 56).

A diferença observada no vigor das brotações e crescimento de ramos (número de folhas/gemas) foi observada nos parâmetros de crescimento, avaliados em 28/03/12 nas plantas das diferentes interações. Plantas com interações com pérola e formiga (V+P+F e V+P+F+C) apresentaram maior crescimento em diâmetro e comprimento de entrenós, massas (fresca e seca) de entrenós e folhas e maior área foliar (Tabela 17), quando comparadas com as interações sem pérola e formiga (V e V+C).

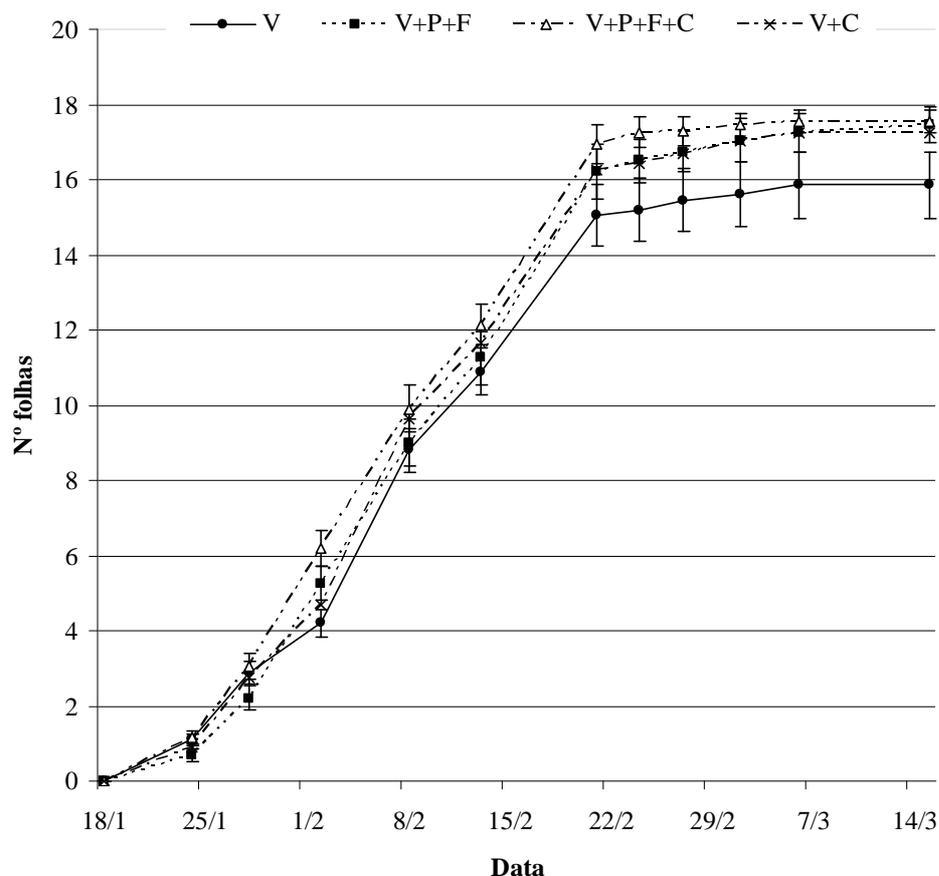


FIGURA 56. Relação do desenvolvimento de folhas ao longo do período avaliado (18/01 – 15/03/2012), em plantas de videira ‘Paulsen 1103’ nas interações: videira (V); videira, pérola e formiga (V+P+F); videira, pérola, formiga e *Cylindrocarpon* (V+P+F+C) e videira e *Cylindrocarpon* (V+C), cultivadas em gaiolas de Gallotti após 380 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. As barras de erro padrão correspondem a 20 plantas. *Diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Bento Gonçalves, mar/2012.

TABELA 17. Médias do diâmetro (mm) e comprimento (cm) de entrenós, massas (g) fresca (MF) e seca (MS) de entrenós e folhas, percentual de água de folhas e área foliar (cm^2) observado em plantas de ‘Paulsen 1103’, cultivadas por 380 dias em gaiolas de Galotti com solo esterilizado nas interações Videira (V); Videira, Pérola e Formiga (V+P+F); Videira, Pérola, Formiga e *Cylindrocarpon* (V+P+F+C) e Videira e *Cylindrocarpon* (V+C). Bento Gonçalves, mar/2012.

Interações	Média/entrenó				Média/folha			
	Diâmetro	Compr.	MF	MS	Área	MF	MS	%H ₂ O
V	2,71 b*	5,46 c	0,28 c	0,15 b	39,50c	0,59c	0,18b	68,82a
V+P+F	2,98 a	6,22 ab	0,42 a	0,23 a	49,27b	0,67ab	0,25a	63,05b
V+P+F+C	3,22 a	6,41 a	0,49 a	0,25 a	59,49a	0,74 a	0,26a	64,56b
V+C	2,95 a	5,77 bc	0,35 b	0,19 b	43,23c	0,64bc	0,21b	67,31a

*Diferentes letras nas colunas representam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Insetos sugadores apresentam comportamento de colonização do hospedeiro, estando sua interação muito mais relacionada às características de patógenos (bactérias e fungos) do que propriamente a insetos mastigadores (Taiz & Ziegler, 2004). Na análise da expressão gênica realizada com plantas contrastadas pelo número de pérolas observadas nas raízes, a hipótese esperada seria de que houvesse maior amplificação dos genes analisados das plantas, relacionando-os com o número crescente de cistos de pérolas nas raízes, principalmente devido ao contraste ser plantas da interação sem pérola (V) e os genes avaliados serem amplamente estudados para *Vitis* (Jeandet *et al.*, 2002). Entretanto, plantas com as menores expressões amplificadas, para Estilbeno Sintase e PR-2, foram as do grupo com maior número de pérola nas raízes (Figura 57, A e C). Para Chalcona Sintase, os valores amplificados da expressão gênica dos grupos de plantas avaliados (V e V+P+F) foram muito próximos, com excessão do grupo V+P+F+C que amplificou menos da metade dos demais grupos (Figura 57, B). Os resultados observados aqui mostram que plantas de videiras atacadas por pérola (em diferentes graus de infestação) não apresentam expressão destes genes pelo ataque da pérola-da-terra.

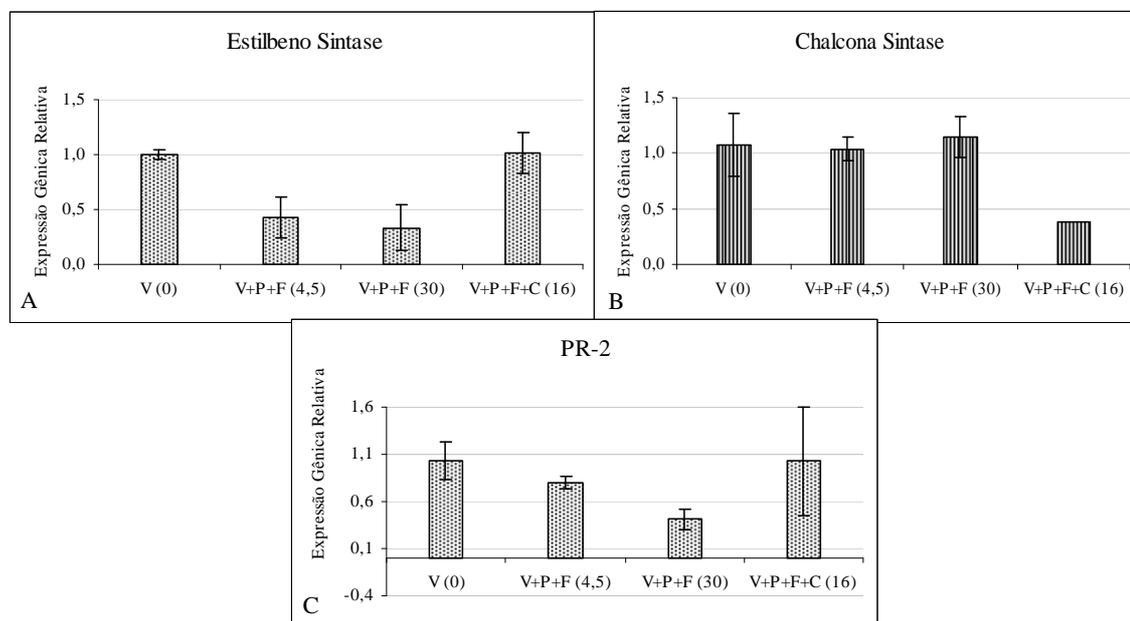


FIGURA 57. Amplificação dos genes das enzimas Estilbeno Sintase (A) e Chalcona Sintase (B) e da proteína PR-2 (C) em folhas de videira 'Paulsen 1103', cultivadas em gaiolas de Gallotti nas interações videira (V), videira, pérola e formiga (V+P+F) e videira, pérola, formiga e *Cylindrocarpon* (V+P+F+C), cultivadas casa de vegetação, após 380 dias de infestação de pérola e inoculação do fungo. Valores entre parêntese significam média de pérolas nas raízes das plantas. Bento Gonçalves, mar/ 2012.

4.5 Relação da infestação de pérola-da-terra com o grau de metil esterificação em diferentes espécies de videira

Na análise comparada entre os cortes do ensaio controle com o ensaio teste, em todas as cultivares, foi possível observar a eficiência de marcação nas paredes celulares dos tecidos de raiz. A evidência da presença de epitopos pécticos no parênquima cortical das seções marcadas pelo JIM7 e FITC (de excitação verde) não foi observada nas seções-controle, ou seja, quando omitido o anticorpo primário JIM7 (Figura 58).

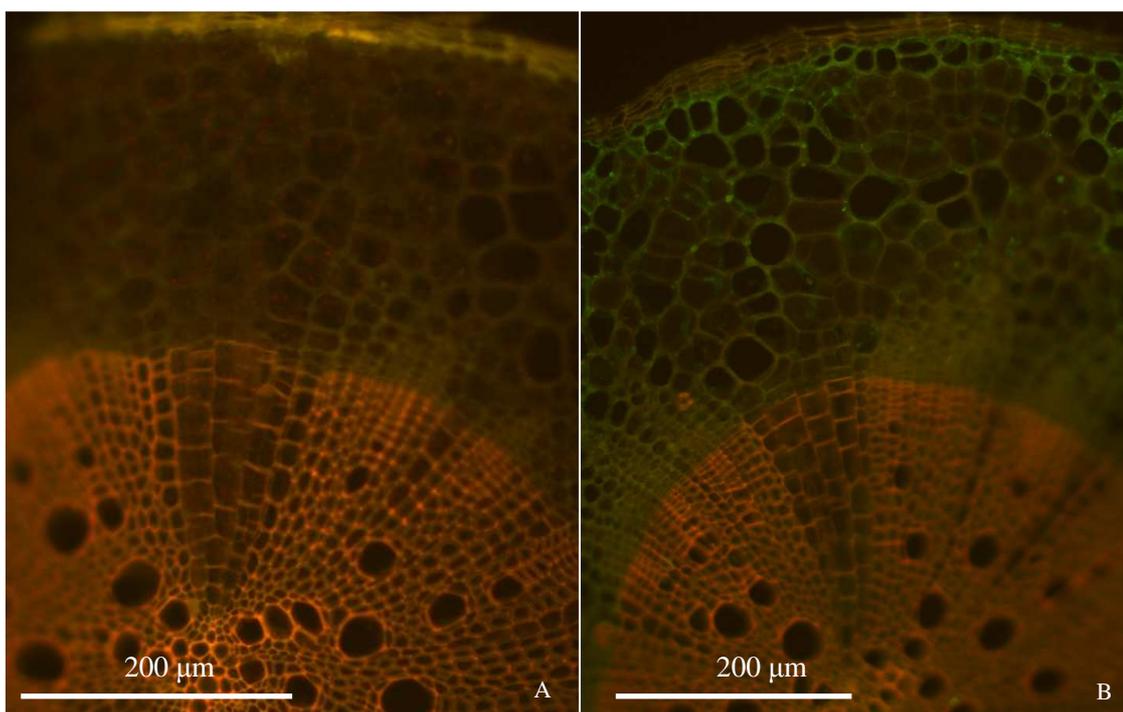


FIGURA 58. Cortes transversais de raízes de videira ‘Paulsen 1103’ (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*). Microscopia óptica de fluorescência sem a presença de anticorpo primário JIM7 (A). Microscopia óptica de fluorescência apresentando emissão de verde pelo fluorocromo (FITC) ligado ao anticorpo JIM7 (B). Porto Alegre, 2012.

A comparação entre as imagens obtidas pelo processo de marcação por imunofluorescência nas paredes das células mostrou distinção entre as diferentes cultivares. Uma maior marcação foi observada nos cortes da cultivar ‘Paulsen 1103’ (Figura 59, A), quando comparado com as cultivares ‘548-15’ (Figura 59, B) e ‘Isabel’ (Figura 59, C), as quais apresentaram uma marcação intermediária, e ‘Magnólia’ (Figura 59, D) que apresentou uma marcação tênue. Portanto, com essa análise foi possível obter uma distinção clara entre os genótipos, principalmente entre as cultivares ‘Paulsen 1103’, suscetível à pérola-da-terra, e ‘Magnólia’, tolerante à pérola-da-terra (Botton & Colleta, 2010).

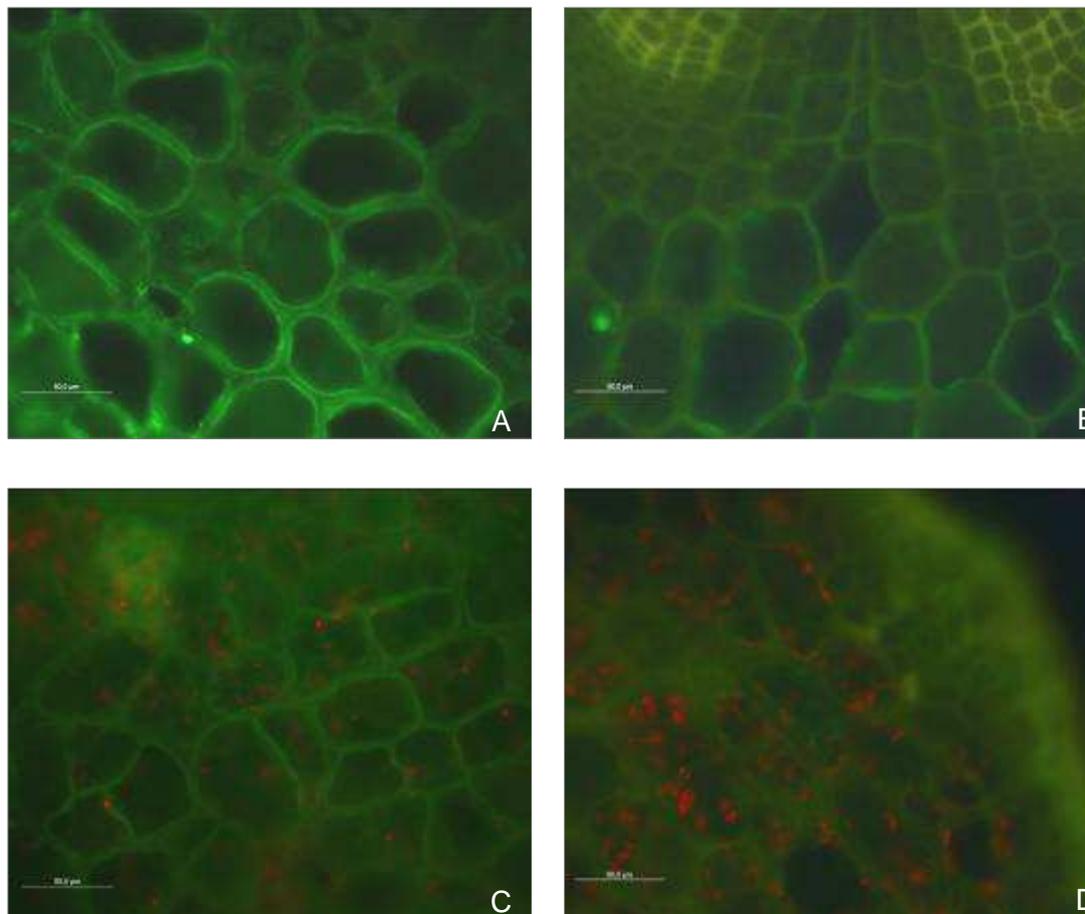


FIGURA 59. Cortes transversais de raízes de videiras das cultivares ‘Paulsen 1103’ (A); ‘548-15’ (B); ‘Isabel’ (C) e ‘Magnólia’ (D). Microscopia de fluorescência apresentando emissão de verde pelo fluorocromo ligado ao anticorpo JIM7. Escala em barras de 50,0 µm. A coloração vermelha é referente à autofluorescência de amido. Porto Alegre, maio/2012.

A marcação é observada principalmente nas paredes das células do parênquima cortical, embora na cultivar ‘Paulsen 1103’ as camadas mais internas da parede primária estão fortemente marcadas (Figura 59, A). Nas cultivares ‘548-15’ e ‘Isabel’ (Figura 59, B e C) a marcação é mais homogênea, embora as paredes pareçam mais delgadas do que na cultivar ‘Paulsen 1103’. Em ‘Magnolia’ (Figura 1, D) a marcação é menos intensa e ausente na região de adesão do que nas demais cultivares. A baixa reação observada nas paredes das células em raízes de ‘Magnólia’, espécie *V. rotundifolia*, é provavelmente explicada pela baixa concentração de pectinas metil-esterificadas nas paredes celulares deste tecido, comparando-se às demais cultivares que mostraram maior marcação com o anticorpo específico para grau de metil-esterificação superior a 80%. De acordo com Raiola *et al.*, (2011), quanto menor o grau de metilesterificação maior é o grau de suscetibilidade ao ataque de endopoligactonases. Contudo, esta

mesma restrição de metilesterificação aumenta o grau de resistência física das paredes celulares, devido a maior interação iônica com cálcio (Willats *et al.*, 2001). Com isso, pode-se supor que a tolerância da ‘Magnolia’ à pérola está mais relacionada com a resistência física à penetração dos estiletos bucais do que à restrição bioquímica da degradação enzimática das pectinas na parede. Além disso, se o maior grau de metilesterificação observado no ‘Paulsen 1103’ não for limitante para o ataque de pérola-da-terra, esta cochonilha pode romper fisicamente a barreira bioquímica (metilação de pectinas) nas raízes que este genótipo apresenta contra o ataque de fungos de solo. Portanto, em presença de pérola-da-terra o ‘Paulsen 1103’ pode se tornar susceptível a outros patógenos do solo.

Na avaliação do número de cistos observados nas raízes destas mesmas cultivares não foi observada diferença entre as cultivares. Os valores médios de cistos observados foram de 1,25 cistos em ‘Isabel’ e ‘Magnólia’; 1,13 cistos para ‘548-15’ e 1,5 cistos para ‘Paulsen 1103’.

Mesmo sem haver diferenças, esta técnica mostrou-se promissora na distinção entre cultivares com diferentes graus de metil-esterificação nas raízes, visto principalmente que pode se apresentar como uma ferramenta no processo de escolha dos cruzamentos mais promissores para execução de testes a campo para a seleção de porta-enxertos resistentes/tolerantes ao ataque de outros patógenos. Isto é importante, apesar dos resultados dos ensaios isolados não demonstrar nenhum efeito negativo deste inseto sobre a videira, pois não pode-se descartar a hipótese de que a pérola-da-terra possa atuar como um coadjuvante no processo de infecção de outros patógenos do solo. Esta afirmativa é corroborada pelo fato da pérola-da-terra não fazer distinção de ataque em tecidos que demonstram variabilidade de mecanismos de resistência de parede celular (metilesterificação), podendo então tornar suscetíveis a fungos de solo porta-enxertos considerados resistentes.

5 CONCLUSÕES

- O ataque de pérola-da-terra em plantas matrizes de 'Paulsen 1103' (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) reduz a massa, o diâmetro e o comprimento das estacas produzidas, quando comparadas com estacas de plantas não infestadas, porém não altera o percentual de amido, de brotação e do enraizamento das estacas na formação de uma nova planta;

- As cultivares 'Cabernet Sauvignon' (*Vitis vinifera*), 'Isabel' (*Vitis labrusca*), o híbrido '548-15' (*Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia*) e 'Paulsen 1103' (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) enxertadas sobre 'Paulsen 1103' cultivados por três anos em canteiros com pérola-da-terra (infestação média de 4,25 cistos por planta) não manifestam sintomas foliares, redução nos teores de clorofilas (α , β e total), diferenças nas taxas de fotossíntese e nem nos teores de amido em ramos e folhas, quando comparados com plantas cultivadas em canteiros sem pérola-da-terra;

- Plantas de videira da cultivar 'Paulsen 1103' (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) cultivadas com substrato esterilizado e em gaiola de Gallotti não apresentam sintomas foliares, deficiência e redução de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio em folha quando infestadas por pérola-da-terra e formiga (*Linepithema micans*), quando comparadas com plantas não infestadas;

- Plantas de videiras na interação de pérola-da-terra x formiga, em condições controladas, apresentaram menor crescimento de ramos (massa, diâmetro e comprimento) e menor teor de amido em folhas, quando comparadas com plantas não atacadas;

- Raízes de videiras 'Paulsen 1103' cultivadas em canteiros infestadas por pérola-da-terra apresentam maior atividade de enzimas peroxidases (GPx), quando comparadas com plantas não infestadas;

- Plantas de videira infestadas com o fungo *Cylindrocarpon destructans* nas interações pérola e formiga apresentaram maior concentração nos teores de clorofila e maior taxa de fotossíntese do que as plantas sem estas interações;

- Plantas de videira ‘Paulsen 1103’ cultivadas em condições controladas de substrato e gaiola de Gallotti, nas interações com pérola, formiga e fungo *Cylindrocarpon destructans* não apresentam diferenças na expressão dos genes Chalcona Sintase, Estilbeno Sintase e da proteína PR-2, quando comparados com plantas sem infestação;

- Não houve diferença no número de cistos de pérola-da-terra observados nas raízes das videiras ‘Magnólia’ (*Vitis rotundifolia*), ‘548-15’ (*Vitis rotundifolia* x *Vitis labrusca*), ‘Isabel’ (*Vitis labrusca*) e ‘Paulsen 1103’ (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*), cultivadas em condição controladas de substrato, infestação de pérola-da-terra e formigas e em gaiolas de Gallotti;

- O teste imunocitoquímico com anticorpo monoclonal JIM7, marcado com fluorocromo FITC, foi eficiente na distinção de diferentes graus de metil esterificação nas paredes celulares entre as cultivares ‘Magnolia’, com a menor marcação, ‘Isabel’ e ‘548-15’ com marcação intermediária, e ‘Paulsen 1103’ com marcação mais acentuada.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Antes de expor o detalhamento dos resultados, salienta-se que os ensaios nos três ambientes foram essenciais e complementares para a caracterização da complexidade da interação entre pérola-da-terra e videira. As avaliações realizadas em vinhedo comercial contribuíram para expor diretrizes distintas do trabalho inicial, pois tanto a colonização da planta pelo inseto como a manifestação dos sintomas foram direcionadas por fatores pouco elucidados até então, portanto, sem o controle necessário para isolar fatores. Neste cenário de área comercial, com diversidade de plantas concorrentes, solos com altos teores de matéria orgânica e com abundante atividade biológica, existem condições para mascarar os efeitos da interação isolada da pérola com a videira. Contudo, mesmo com esta complexidade, foi possível mapear informações que até o momento estavam obscuras e serviram como referências para os ensaios em condições mais controladas, como nos canteiros e nas gaiolas de Galloti.

Com a estratégia de se cultivar plantas em canteiros separados, com e sem a infestação da pérola, possibilitou uma maior objetividade, com o aumento da garantia e possibilidade de avaliação de plantas realmente isentas da infestação da pérola, como também, possibilitar um ambiente propício para a colonização dos insetos em uma vasta gama de cultivares/espécies de videiras. Tecnicamente a possibilidade de se cultivar diferentes materiais e em grandes quantidades em condições de campo tende a ser onerosa e com pouca garantia de controle para a infestação. Contudo, apesar destas vantagens, os canteiros não garantiram o isolamento total da interação pérola-da-terra X videira, podendo ainda expor interações conjuntas com outros organismos do solo (ex.: fungos).

O isolamento completo dos efeitos da pérola-da-terra sobre a videira só foi possível com os ensaios em gaiolas de Gallotti e com solo esterilizado. Cabe salientar que apesar das gaiolas terem sido desenvolvidas na década de 70 (Gallotti, 1976), os ensaios com pérola-da-terra não tinham a garantia de infestação, pois não se conhecia a

interdependência que esse inseto apresenta com as formigas (em especial a espécie *Linepithema micans*) e muitas tentativas de infestação manual e direta de ninfas nas raízes foram frustradas. O conhecimento desta tríplice interação formiga X pérola X videira ocorreu concomitantemente a este trabalho de tese (Nondillo *et al.*, 2012a; Nondillo *et al.*, 2012b) e foi a condição necessária para garantir altas infestações em ambientes controlados. A partir deste trabalho, foram montados os ensaios em gaiolas de Gallotti, considerando em conjunto a presença de formigas *L. micans* e possibilidade da identificação dos reais sintomas que a pérola-da-terra pode ocasionar na videira.

Contudo este trabalho procurou elucidar os sintomas relacionados ao ataque da pérola-da-terra em plantas de videira. Na avaliação de plantas de videiras infestadas por pérola-da-terra em vinhedo comercial foi impossível estudar os efeitos do ataque do inseto de forma isolada, devido à interação observada com outros organismos que estão mascarando o diagnóstico da mortalidade de plantas no campo. Em ambiente com maior controle de infestação de pérola, formiga, sanidade das plantas e substrato, pode-se concluir que a pérola-da-terra não restringe a sobrevivência de videiras pela sucção de seiva, mesmo em altas infestações. Foi observado redução no percentual de amido em folhas, o que remete a um desvio de carboidratos produzidos pela planta durante a fotossíntese. Porém, não houve perdas significativas nos teores de proteína, aminoácidos, pigmentos de clorofila, taxa de fotossíntese ou no aumento das atividades de defesa da planta frente ao ataque do inseto. Todavia, sua capacidade de se alimentar em qualquer espécie de videira, como *V. rotundifolia*, que é considerada imune aos principais patógenos de solo, pode restringir o cultivo de videiras em ambientes com pérola, se provada sua participação na abertura para outros patógenos (fungos de solo).

Estudos sobre a colonização de doenças, principalmente fúngicas, e questões sobre a influência da pérola-da-terra nesta interação deverá contribuir para um maior entendimento dos problemas de mortalidade de plantas observados a campo. Como neste trabalho foi verificada a possibilidade de se estudar a composição de parede das raízes de porta-enxertos de diferentes espécies, o melhoramento destes materiais pode ser facilitado pela análise apresentada, servindo com uma ferramenta que possibilita reduzir o tempo de estudo de novos porta-enxertos.

Grande parte deste trabalho foi possível devido ao entendimento de como ocorre a infestação da pérola na videira, principalmente pela contribuição da formiga que auxilia na sua colonização frente as plantas. Porém, outros aspectos vinculados à bioecologia da pérola-da-terra na videira necessitam serem estudados, como a existência de

sobreposição de ciclos no campo, possibilidade de populações co-existirem numa mesma área, taxa de viabilidade/reprodução da espécie no campo e a interação com outros fatores abióticos e bióticos de maneira antagonista como sinergista para o inseto.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários, 2003-2007**. Brasília. Disponível em: <www.agricultura.gov.br/agrofit>. Acesso em: 15 jun. 2012.

AMARAL, L. I. V. et al. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, p. 425-431, 2007.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/alimentos>>. Acesso em: 15 jul. 2011.

ARUMUGAM, R; RAJASEKARAN, S; NAGARAJAN, S. M. Response of Arbuscular mycorrhizal fungi and Rhizobium inoculation on growth and chlorophyll content of *Vigna unguiculata* (L) Walp Var. Pusa 151. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, Choba, v. 14, n. 4, p. 113–115, 2010.

BASSO, M. F. et al. Fisiologia foliar e qualidade enológica da uva em videiras infectadas por vírus. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, p. 351-359, 2010a.

BASSO, M. F. et al. Detecção e identificação molecular de vírus associados a videiras sintomáticas e assintomáticas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 2249-2255, 2010b.

BERND, R. B. et al. Micropropagação de porta-enxertos híbridos de *Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia* com resistência à pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis* hempel, hemiptera: margarodidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 350-354, 2007.

BOTELHO, R. V. et al. Efeitos de reguladores vegetais na propagação vegetativa do porta-enxerto de videira '43-43' (*Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 6-8, 2005.

BOTTON, M. et al. **Bioecologia e controle da pérola-da-terra *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel, 1922) (Hemiptera: Margarodidae) na cultura da videira**. Bento Gonçalves: Embrapa-CNPUV, 2000. 23 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular técnica, 27).

BOTTON, M.; HICKEL, E. R.; SORIA, S. J. Pragas. p. 82-95. In: FAJARDO, T. V. M. (Ed.). **Uva para processamento: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. (Série frutas do Brasil, 35).

BOTTON, M. et al. Pérola-da-terra. In: SALVADORI, J. R.; ÁVILA, C. J.; SILVA, M. T. B. da (Org.). **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz Alta: Fundacep, 2004. p. 457-476.

BOTTON, M. et al. Cachos arruinados. **Cultivar HF**, Pelotas, n. 34, p. 1-6, 2005.

BOTTON, M. et al. **Manejo de pragas na cultura da videira**. Disponível em: <<http://scarlet.cnpuv.embrapa.br/servicos/viticultura/perola.html>>. Acesso em: 15 jan. 2009.

BOTTON, M. et al. Efeito da cobertura vegetal sobre a pérola-da-terra (Hemiptera: Margarodidae) na cultura da videira. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 681-684, 2010.

BOTTON, M.; COLLETA, V. D. Avaliação da resistência de cultivares de *Vitis rotundifolia* à pérola-da-terra (Hemiptera: Margarodidae) na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 213-216, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p. 248- 254, 1976.

BRAYFORD, D. *Cylindrocarpon*. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research soilborne phytopathogenic fungi**. St Paul: APS Press, 1993. p. 103-106.

BRAZILIAN FRUIT. **Programa de promoção das exportações das frutas brasileiras e derivados**. São Paulo. Disponível em: <<http://www.brazilianfruit.org/Pbr/Inteligencia/Estatisticas/PDF/Comparativo%20das%20Exportações%20Brasileiras%20de%20Frutas%20Frescas%202011-2010.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2012.

BROETTO, D. et al. Desenvolvimento e ocorrência de pérola-da-terra em videiras rústicas e finas enxertadas sobre os porta-enxertos 'VR 043-43' e 'Paulsen 1103'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 404-410, 2011.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 344, n. 14, p. 1879-1900, 2009.

CAMARGO, U. A. **Seminário sobre pérola-da-terra**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2009.

CASTRO, P. C. R. et al. Rooting stimulation in muscadine grape cuttings. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 51, p. 436-440, 1994.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 81-124.

CQFS-RS/SC - COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre: SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400 p.

CONRATH, U.; PIETERSE, C. M. J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, London, v. 7, p. 210-216, 2002.

DAL BÓ, M. A.; PERUZZO, E. L.; SCHUCK, E. Alternativas de manejo para o controle de declínio da videira. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 20, n. 1, p. 58-61, 2007.

DE CÉSARO, A. **Caracterizações histológica e fisiológica do ataque de pérolada-terra (*Eurhizococcus brasiliensis* Wille 1922) (Hemiptera: Margarodidae) em videiras**. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

DOKOOZLIAN, N. K. Chilling temperature and duration interact on the budbreak of 'Perlette' grapevine cuttings. **Hort Science**, Alexandria, v. 34, n. 6, p. 1054-1056, 1999.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa - Uva e Vinho. Bento Gonçalves, 2012. **Dados meteorológicos**. Disponível em: <www.cnpuv.embrapa.br/prodserv/meteorologia/bento-frio.html>. Acesso em: 15 jun. 2012.

FAJARDO, T. V. M. et al. Caracterização parcial de um isolado do *Grapevine fanleaf virus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 505-511, 2000.

FAJARDO, T. V. M., KUHN, G. B.; NICKEL, O. **Doenças virais**. In: FAJARDO, T. V. M. (Ed.). Uva para processamento - fitossanidade. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 45-62. (Série frutas do Brasil, 35).

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA. **Medidor eletrônico do teor de clorofila ClorofiLOG 1030**: manual de instruções. [S.l.], 2008. 33 p.

FIGUEIRA JÚNIOR, E. R. Nova praga da videira em São Paulo – *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel). **O Biológico**, São Paulo, v. 36, n. 9, p. 229-234. 1970.

FOLDI, I. Morphologie des stades larvaires et imaginal du male d' *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel in Wille 1922) (Homoptera: Coccoidea: Margarodidae). **Nouvelle Revue d'Entomologie**, Paris, v. 7, n. 4, p. 405-418. 1990.

FOLDI, I. Ground pearls: a generic revision of the Margarodidae *sensu stricto* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea). **Annales de la Société entomologique de France**, Paris, v. 41, n. 1, p. 81-125, 2005.

GALLOTTI, B. J. **Contribuição para o estudo e para o controle químico do *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel, 1922)**. 1976. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1976.

GARRIDO, L. da R.; SÔNEGO, O. R. **Chave para identificação de agentes causadores de declínio da videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1999. (Circular técnica, 26).

GARRIDO, L. G., SÔNEGO, O. R.; URBEN, A. F. *Cylindrocarpon destructans* causador do “pé-preto” da videira no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 548-550, 2004a.

GARRIDO, L. da R.; SÔNEGO, O. R.; GOMES, V. N. Fungos associados com o declínio e morte de videiras no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 322-324, 2004b.

GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F.; NICOLAS, J. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 215, p. 59-65, 1993.

GERBIER, G. et al. Are ants sensitive to the geometry of tunnel bifurcation? **Animal Cognition**, Berlin, v. 11, p. 637-642, 2008.

GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. Porto Alegre: Renascença, 2008. p. 362.

HAJI, F. N. P.; ALENCAR, J. A. Pragas da videira e alternativas de controle. In: A VITICULTURA no semi-árido brasileiro. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. p. 273-291.

HAJI, F. N. P. et al. **Cochonilha-pérola-da-terra**: praga emergente na cultura da uva, no Submédio do Vale do São Francisco. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2004. p. 8. (Circular técnica, 78).

HICKEL, E. R. Reconhecimento, coleta, transporte e depósito de ninfas da pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis*) pela formiga argentina (*Linepithema humile* (Mayr)). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 285-290, 1994.

HICKEL, E. R.; DUCROQUET, J. P. H. J. Pragas da goiabeira serrana: cochonilhas (Homoptera: coccoidea). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 24, n. 3, p. 665-668, 1995.

HICKEL, E. R. Pragas da videira. In: BRAGA SOBRINHO, R.; CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O. (Ed.). **Pragas de fruteiras tropicais de importância agroindustrial**. Brasília: Embrapa SPI; Fortaleza: Embrapa CNPAT, 1998. p. 191-194.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990. 732 p.

IBGE. **Sistema IBGE de recuperação automática - SIDRA**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=1&z=t&o=11&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1>>. Acesso em: 15 jun. 2012.

JACKSON, R. S. **Wine science: principles and applications**. Oxford UK: Elsevier, 2008. 749 p.

JEANDET, P. et al. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, London, v. 50, p. 2731-2741, 2002.

KNOX, J. P. et al. Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. **Planta**, Berlin, v. 181, p. 512-521, 1990.

KUHN, G. B.; REGLA, R. A.; MAZZAROLLO, A. **Produção de mudas de videira (*Vitis spp.*) por enxertia de mesa**. Bento Gonçalves: EMBRAPA/CNPUV, 2007. 12 p. (Circular técnica, 74). Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/download.php?file=publica/circular/cir074.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2012.

LAMBERS, H.; CHAPIN, F. S.; PONS, T. L. **Plant physiological ecology**. 2nd ed. New York: Springer- Verlag, 2008. 610 p.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2004. 531 p.

LEAKEY, R. R. B.; COUTTS, M. P. The dynamics of rooting in *Triplochiton scleroxylon* K. Schum. cuttings - their relationship to leaf area, node position, dry weight accumulation, leaf water potential and carbohydrate composition. **Tree Physiology**, London, v. 5, p. 135-146, 1989.

LIMA, A. da C. **Insetos do Brasil: 3º tomo: homópteros**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1942. (Escola Nacional de Agronomia. Série didática, 4). 327 p.

LORENZ, D. H. et al. Phenological growth stages of grapevine (*Vitis vinifera* L.) – Codes and descriptions according to the extended BBCH scale. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 1, p. 100-103, 1995.

LOURENÇÃO, A. L.; MARTINS, F. P.; ALARCON, L. C. Ocorrência de *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel) (Homóptera: Margarodidae) em videira no município de Louveira, Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v. 48, n. 2, p. 205-208, 1989.

MA, R. et al. Detection of pectinesterase and polygalacturonase from salivary secretions of living greenbugs, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 507-512, 1990.

MARICONI, F. A. M.; ZAMITH, A. P. L. Contribuição para o conhecimento dos Margarodidae (Homóptera: Margarodidae) que ocorrem no Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 2, n. 1, p. 86-101, 1973.

MARODIN G. A. B. et al. Brotação e produção das videiras ‘Cabernet Sauvignon’ e ‘Pinot Noir’ submetidas a diferentes concentrações de cianamida hidrogenada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 406-409, 2006.

MATOS, C. S.; SCHUCK, E. Controle de pragas da videira. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 1, n. 2, p. 12-14, 1988.

MELLO, L. M. R. de. **Atuação do Brasil no mercado vitivinícola mundial: panorama 2011**. Bento Gonçalves: EMBRAPA/CNPUV, 2012. (Comunicado técnico, 116). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/926520>>. Acesso em: 15 maio 2012a.

MELLO, L. M. R. de. **Viticultura brasileira: panorama 2010**. Bento Gonçalves: EMBRAPA/CNPUV, 2011. (Comunicado técnico, 111). Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot111.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2012b.

MILANEZ, J. M. Diagnóstico de pragas de solo do Estado de Santa Catarina. In: REUNIÃO SUL BRASILEIRA DE PRAGAS DE SOLO, 8., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 26-28.

MILES, P. W. Aphid saliva. **Biological Review**, Oxford, v. 74, p. 41-85, 1999.

MORALES, L. Relatos de ocorrências de pragas de solo no Estado do Paraná – 2001. In: REUNIÃO SUL BRASILEIRA DE PRAGAS DE SOLO, 8., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 28-32.

MULLINS, M. G.; BOPUQUET, A.; WILLIAMS, L. E. **Biology of grapevine**. New York: Cambridge University, 1992. 239 p.

NONDILLO, A. et al. Efeito da presença de *Linepithema micans* (Hymenoptera: Formicidae) na infestação de *Eurhizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae) em plantas em videira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 23., 2010, Natal. **Anais..** Natal: SEB: EMPARN: UFRN: UFRSA: IFRN, 2010.

NONDILLO, A. et al. **Metodologia para infestação da pérola-da-terra em plantas de videira utilizando *Linepithema micans* (Forel) sob condições controladas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2012a. 8 p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado técnico, 117).

NONDILLO, A.; BOTTON, M.; BUENO, O. C. **Coleta e manutenção de colônias de *Linepithema micans* (Forel) (Hymenoptera: Formicidae)**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2012b. 16 p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado técnico, 118).

NOVO, J. P. S. Pérola-da-terra. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 08 mar. 1978. Suplemento Agrícola, p. 5.

OIV - The International Organisation of Vine and Wine. 2007. Disponível em: <http://news.reseauconcept.net/pls/news/p_entree?i_sid=&i_type_edition_id=20508&i_section_id=20518&i_lang=33>. Acesso em: 15 dez. 2007.

OJEDA, H. et al. Determinación y control del estado hídrico de la vid. Efectos morfológicos y fisiológicos de la restricción hídrica en vides. **Viticultura/Enología Profesional**, Barcelona, v. 90, p. 27-43, 2004.

PASSOS, L. P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. 223 p.

PIRONE, C. L.; ALEXANDER, L. C.; LAMP, W. O. Patterns of starch accumulation in alfalfa subsequent to potato leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) injury. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 34, p. 199-204, 2005.

PROTAS, J. F da S.; CAMARGO, U. A.; MELLO, L. M. R. de. **A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas**. Bento Gonçalves: EMBRAPA/CNPUV, 2002. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura/>>. Acesso em: 15 nov. 2007.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 2007-2009, 2001.

RAIOLA, A. et al. Pectin methylesterase is induced in *Arabidopsis* upon infection and is necessary for a successful colonization by necrotrophic pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 24, n. 4, p. 432-440, 2011.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 339, p. 62-66, 2003.

REGINA, M. de A. Produção e certificação de mudas de videira na França. 2. Técnica de produção de mudas pela enxertia de mesa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 590-596, 2002.

SAKAI, T. et al. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 39, p. 213-294, 1993.

SANTOS, H. P. et al. Necessidades de frio hibernal para evolução da dormência de gemas de videira. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 23, p. 255, 2011. Resumo.

SCHOLANDER, P. F. et al. Hydrostatic pressure and osmotic potentials in leaves of mangroves and some other plants. **Proceedings of the National Academy Science**, New York, v. 51, p. 119-125, 1965.

SCHUCK, E. et al. Porta-enxertos para a cultura da videira. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 4., 2001, Fraiburgo. **Anais...** Caçador: Epagri, 2001. p. 122-132.

SILVA, A. G. A. et al. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil: seus parasitos e predadores**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1967. 622 p. v. 4.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 189-196, 2007.

SILVEIRA NETO, S. et al. **Manual de ecologia dos insetos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. 419 p.

SILVESTRI, F. Ridescrizione del genere Termitococcus Silv. con una specie nuova del Brasile e descrizione di un nuovo genere affine. **Bolletino del Laboratorio di Zoologia Generale e Agrária**, Portici, v. 30, p. 32-40, 1936.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. da R. Doenças fúngicas da videira e seu controle. In: CAPACITAÇÃO técnica em viticultura. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007.

SORIA, S. J.; GALLOTTI, B. J. **O margarodes da videira *Eurhizococcus brasiliensis* (Homoptera: Margarodidae)**: biologia, ecologia e controle no Sul do Brasil. Bento Gonçalves: Embrapa CNPUV, 1986. 22 p. (Circular técnica, 13).

SORIA, S. J.; DAL CONTE, A. F. Bioecologia e controle das pragas da videira no Brasil. **Entomologia y Vectores**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 73-102, 2000.

SORIA, S. J.; DAL CONTE, A. F. **Bioecologia e controle das pragas da videira**. Bento Gonçalves: Embrapa CNPUV, 2005. 20 p. (Circular técnica, 63).

SOUSA, J. S. I. de; MARTINS, F. P. **Viticultura brasileira: principais variedades e suas características**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 368 p.

STEIN, W.; MOORE, S. A modified ninhydrin reagent for photometric determination of amino acids and related compounds. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 176, n. 2, p. 367-372, 1948.

SUDD, J. H.; FRANKS, N. R. **The behavioural ecology of ants**. New York: Chapman and Holl, 1987. 206 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 848 p.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995. 174 p. (Boletim técnico, 5).

TORREGROSA, L.; BOUQUET A. In vitro propagation of *Vitis x Muscadinia* hybrids by microcuttings or axillary budding. **Vitis**, Geneva, v. 34, n. 4, p. 237-238, 1995.

URBANEK, H. et al. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologica Plantarum**, Poland, v. 13, p. 43-50, 1991.

VAN DER PLANK, J. E. **Plant disease: epidemics and control**. New York: Academic Press, 1963. 349 p.

VAN HUYSTEE, R. B. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 38, p. 205-219, 1987.

VAN ZYL, J. L. Diurnal variation in grapevine water stress as a function of changing soil water status and meteorological conditions. **South Africa Journal for Enology and Viticulture**, South Africa, v. 8, p. 45-52, 1987.

WILLE, J. *Margarodes brasiliensis*. **Egatea**, Porto Alegre, v. 7, n. 2, p. 83-85, 1922.

WILLADINO, L. et al. Sistema vascular e exsudatos radiculares. In: **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. (Eds.) S. J. MICHEREFF, DOMINGOS E. G. T.; ANDRADE, M. M. Recife : UFRPE, Imprensa Universitária. 2005, p. 10-40.

WILLATS, W. G. T. et al. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, New York, v. 47, p. 9-27, 2001.

ZAPATA, C. et al. Partitioning and mobilization of starch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Journal of Plant Physiology**, Leipzig, v. 161, p. 1.031-1.040, 2004.

ZUCCHI, T. D.; ALMEIDA, L. G.; CÔNSOLI, F. L. Culturable bacterial diversity associated with cysts of *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel) (Hemiptera: Margarodidae). **Journal of Microbiology & Biotechnology**, Seoul, v. 27, n. 4, p. 791-797, 2011.

8 VITA

Marcelo Zart é filho de Arnane Zart e Lurdes Beatriz Kalkmann Zart. Nasceu em Ibirubá, RS, em 24 de fevereiro de 1982.

Estudou até a quarta série do primeiro grau na Escola Estadual de Primeiro Grau - General Osório, com término na Escola Municipal Agrícola de Ibirubá, ambas em Ibirubá, RS. O segundo grau também foi realizado na Escola Municipal Agrícola de Ibirubá, formando-se em Técnico em Agropecuária no ano de 2000, com estágio de conclusão realizado na Cooperativa Agrícola Mista General Osório Ltda (COTRIBÁ).

Em 2001 ingressou no curso Agronomia, pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel), colando grau em setembro de 2005. Durante a graduação realizou estágio no Laboratório de Biologia e Controle Biológico de Insetos (entre agosto 2002 e janeiro 2005), atuando também como monitor da disciplina de Entomologia Agrícola (entre 2003 e 2004), em ambas, sob orientação do Prof. Dr. Mauro Silveira Garcia. Realizou o estágio de conclusão de curso na Embrapa Uva e Vinho – Bento Gonçalves, RS, sob orientação do Pesquisador Dr. Marcos Botton e do Prof. Dr. Mauro Silveira Garcia, defendendo o trabalho intitulado “Manejo Integrado de Pragas de Fruteiras na Serra Gaúcha”.

Em março de 2006 ingressou no curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Entomologia Agrícola (bolsista CNPq) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal – SP, sob orientação do Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes e co-orientação do Pesquisador Dr. Marcos Botton. Em fevereiro de 2008 defendeu a dissertação intitulada “Bioecologia de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Díptera: Tephritidae) em videira”, tornando-se mestre em Agronomia (Entomologia Agrícola).

Em agosto de 2008 ingressou no curso de Pós Graduação em Fitotecnia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Vitor Dutra de Souza e co-orientação do Pesquisador Dr. Henrique Pessoa dos Santos, da Embrapa Uva e Vinho.