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

Variabilidade genética entre raças de *Podosphaera xanthii* isoladas de
cucurbitáceas avaliada por meio de polimorfismos de DNA

Erika Sayuri Naruzawa

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba

2008

Erika Sayuri Naruzawa
Engenheira Agrônoma

Variabilidade genética entre raças de *Podosphaera xanthii* isoladas de cucurbitáceas
avaliada por meio de polimorfismos de DNA

Orientador:
Prof. Dr. LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Naruzawa, Erika Sayuri

Variabilidade genética entre raças de *Podosphaera xanthii* isoladas de cucurbitáceas
avaliada por meio de polimorfismos de DNA / Erika Sayuri Naruzawa. - - Piracicaba, 2008.
66 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Fungo fitopatogênico 2. Marcador molecular 3. Melão 4. Oídio 5. Polimorfismo
6. Sequenciamento genético I. Título

CDD 635.61
N237v

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Ofereço

À todos os estudantes de fitopatologia e áreas correlatas que possam obter informações aqui presentes

Dedico

À minha mãe Tizue Naruzawa, que sempre me apoiou e sei que sempre me apoiará nas minhas “empreitadas”, ao meu irmão Thiago Saburo Naruzawa, que apesar das brigas sei que sempre estará do meu lado e ao meu saudoso pai, Shoshiro Naruzawa (in memoriam), por ter me ensinado, junto com minha mãe, a ser a pessoa que hoje sou e que até mesmo com sua perda me ensinou sobre a vida. Apesar da rigidez nos atos e palavras, em seus ensinamentos me mostrou tudo que sei sobre dedicação, verdade e respeito,

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Tizue Naruzawa por estar em todos os momentos do meu lado, me incentivando com todo amor e carinho;

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo que me orientou no mestrado e me acolheu no seu laboratório;

À ESALQ/USP, que possibilitou a realização deste mestrado;

Ao Programa de Bolsas CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado;

À Sakata Seeds Sudamerica, através da Kátia e da Olga, por colaborar com este trabalho ao enviar isolados e classificá-los em raças;

Aos meus amigos e amigas, principalmente à Helen, Raphaele, Renata, Camila, Victor, Silvio, Luciana, Pliê, Kiki, Rita, Juliana, Débora, João, Paulo Masato, Ezio, 51, pelos momentos alegres e divertidos que passamos juntos;

Aos colegas de laboratório, Alexandre, Aninha, Bruno, Carol, Cynthia, Danilo, Eduardo, Ely, Fabrício, Fátima, Fernanda, Heloísa, Júlia, Juliana, Lara, Leandro, Leonardo, Lidiane, Lilian, Luiza, Marcel, Márcia, Osmar, Rapha, Reinaldo, Taís, Thayne, Vyvian;

Ao meu namorado, Leandro, que compreendeu os meus momentos de estresse e me apoiou nas horas mais difíceis do mestrado;

Aos colegas do departamento de Fitopatologia, Rodolfo, Jeferson, Heloísa, Linda, Fernanda;

Ao Samin Shams e à Marija Rosa Braga pela revisão do Abstract;

À todos que de uma forma ou de outra contribuíram para mais esta etapa da minha vida, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 DESENVOLVIMENTO	14
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1.1 A cultura do meloeiro	14
2.1.2 O oídio.....	15
2.1.3 Marcadores moleculares e variabilidade genética de <i>Podosphaera</i>	19
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	21
2.2.1 Obtenção e manutenção de isolados de <i>Podosphaera xanthii</i>	21
2.2.2 Caracterização molecular de isolados de <i>Podosphaera xanthii</i> com marcadores AFLP	23
2.2.3 Estudo da diversidade de <i>Podosphaera xanthii</i> através de seqüenciamento da região ITS-5.8S do rDNA	26
3 RESULTADOS	28
3.1 Caracterização molecular de isolados de <i>Podosphaera xanthii</i> com marcadores AFLP	28
3.2 Diversidade genética de isolados de <i>Podosphaera xanthii</i> através de seqüenciamento da região ITS-5.8S do rDNA	30
4 DISCUSSÃO	32

4.1 Variabilidade genética entre isolados de <i>Podosphaera xanthii</i> avaliadas por meio de marcadores AFLP	32
4.2 Ausência de diversidade entre seqüências de <i>Podosphaera xanthii</i> avaliadas por meio de seqüenciamento da região ITS-5.8S do rDNA.....	34
5 CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS.....	37
ANEXOS	42

RESUMO

Variabilidade genética entre raças de *Podosphaera xanthii* isoladas de cucurbitáceas avaliada por meio de polimorfismos de DNA

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma frutífera largamente cultivada no Brasil, principalmente no nordeste brasileiro, onde vem alcançando grande importância econômica, visto que grande parte da produção é voltada para a exportação. Plantas da família do meloeiro, como pepino e abóbora, são afetadas pelo oídio (*Podosphaera xanthii*) que causa uma das doenças foliares mais destrutivas destas espécies. Este fungo apresenta diversas raças fisiológicas e a correta identificação destas é de elevada importância para o manejo da doença, pois o melhoramento de meloeiro com o emprego de genes de resistência é o método mais eficiente para o seu controle. A identificação destas raças por meio da prática tradicional de inoculações em uma série diferenciadora de variedades de meloeiro é um método laborioso e passível de erros. Devido a isso, uma alternativa seria o uso de métodos moleculares para determinar a identidade da raça de forma rápida e econômica. O presente trabalho objetivou verificar a variabilidade de isolados de *P. xanthii* através da técnica de AFLP e de seqüenciamento da região ITS 5.8S do rDNA. A partir de AFLP obteve-se um dendrograma no qual não houve separação de raças, origem geográfica e nem hospedeiro. Com esta técnica verificou-se alta variabilidade entre isolados, com similaridade genética máxima de 69% e similaridade mínima de 23%. Ao contrário, os mesmos isolados apresentaram seqüências idênticas através do seqüenciamento da região ITS 5.8S do rDNA. As duas técnicas são distintas e o AFLP proporciona a obtenção de maior quantidade de fragmentos e com isso mais chances de polimorfismos. O AFLP indica que os isolados testados têm composição genética heterogênea embora isto não tenha sido evidenciado com o seqüenciamento da região ITS.

Palavras-chave: AFLP; Seqüenciamento; Oídio; *Cucumis melo*

ABSTRACT

Genetic variability among races of cucurbit *Podosphaera xanthii* isolates evaluated by DNA polymorphisms.

Melon (*Cucumis melo* L.) is a largely cultivated fruit in Brazil, especially in the northeastern region where it is achieving great economic importance since a great part of its production is destined to exportation. Plants of the melon crop family, such as cucumbers and pumpkins, are affected by powdery mildew (*Podosphaera xanthii*) that causes one of the most destructive foliar diseases of this species. This fungus presents various physiological races and their correct identification is of great importance to determine the control of the disease since breeding with the use of resistant genes is the most effective method for its control. Identification of these races by traditional practice of inoculation in a differential series of melon varieties is a laborious method and misleading. Due to this, an alternative would be the use of molecular methods to quickly and economically determine the race identity. The present research has the objective of verifying the variability of isolated *P. xanthii* through the AFLP technique and sequencing of the rDNA's ITS 5.8S region. From the AFLP a dendrogram was obtained where there was no separation of race, geographic region or host. With this technique, a high variability among isolated samples was verified, with 69% maximum genetic similarity and 23% minimum similarity. On the other hand, the same isolated samples presented identical sequence through the sequencing of the rDNA's ITS 5.8S region. The two techniques are distinct and the AFLP helps get highest amount of fragments and with this more incidence of polymorphisms. AFLP indicates that the tested isolated samples have an heterogeneous genetic composition although this was not evidenced with the sequencing of the ITS region.

Keywords: AFLP; Sequencing; Powdery mildew; *Cucumis melo*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Eletroforese dos fragmentos AFLP amplificados com os iniciadores E+AAA e M+CAA de representantes de isolados de *Podosphaera xanthii*. M= marcador molecular de 50pb (Promega).....29
- Figura 2 - Dendrograma dos isolados de *Podosphaera xanthii* analisados através de AFLP. A similaridade genética entre os isolados foi estimada pelo coeficiente de Jaccard e o agrupamento fenético pelo método UPGMA30
- Figura 3 – Árvore filogenética (neighbour-joining) dos isolados de *Podosphaera xanthii* seqüenciados na região 5.8S do rDNA. Os números nos nós indicam valores de bootstrap31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolados de <i>Podosphaera xanthii</i> utilizados no presente trabalho.....	21
Tabela 2 - Relação e reação esperada de cultivares de meloeiro quando inoculadas com diferentes raças de <i>Podosphaera xanthii</i> . (Adaptado de FAZZA, 2006).....	23

1 INTRODUÇÃO

Cucumis melo L., conhecido como meloeiro, é uma olerícola muito apreciada e atualmente popularizada para consumo *in natura* no Brasil. É também altamente consumida na Europa, Estados Unidos e Japão, de acordo com Silva e Costa (2003). O consumo de melão no Brasil foi introduzido pelos espanhóis quando o suprimento desta frutífera dependia de países como Espanha, Argentina e Portugal (ARAÚJO, 1981). A diminuição da importação começou a partir de 1969, graças aos cultivos realizados quase o ano todo em regiões localizadas no interior do oeste paulista, nas regiões de Caravelas do Sul na Bahia, em Petrolina, no Estado do Pernambuco, em Santa Isabel e Castanhal no Estado do Pará e no Rio Grande do Sul (ARAÚJO, 1981).

O melão é fonte de vitaminas A, C e do complexo B, além de sais minerais, como potássio, sódio e fósforo. Apresenta valor energético relativamente baixo (20 a 62 kcal/100 g de polpa) e é consumido *in natura* ou na forma de suco (SILVA; COSTA, 2003). Sementes de melão secas e picadas são consumidas na África, onde este produto é comercializado para outros países. Óleo das sementes pode ser usado para iluminação. Ademais, as folhas podem ser preparadas como salada e a planta inteira pode ser usada para consumo animal (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997).

Várias partes da planta podem ser usadas medicinalmente, como frutos e raízes, que são reputados como diuréticos; raízes e flores como eméticos; folhas e sementes são usadas para o tratamento de hematomas; e caules para o tratamento de desinteria e hipertensão (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997). Plantas de melão contêm vários princípios bioativos, incluindo elaterina, estigmasterol, espinosterol e curcubitacina B, um composto antitumoral (DUKE; AYENSU, 1985 citados por ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997).

Atualmente, o meloeiro (*Cucumis melo* L.) é largamente cultivado no Brasil, principalmente no nordeste brasileiro, onde vem alcançando grande importância econômica, visto que a maior parte da produção é voltada para a exportação. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2007), a produção brasileira de melão no ano de 2005 foi de 293.842 toneladas produzidas em 14.108 hectares, onde mais de 92% da produção foi representada pelos estados do Rio

Grande do Norte, Ceará, Bahia e Pernambuco. Na safra 2005, o primeiro estado apresentou produção de 101.403 toneladas, sendo considerado líder na produção nacional (IBGE, 2007). Em fevereiro de 2007 foram exportados 19.249.686 kg da fruta fresca, o que correspondeu a 10.240.509 US\$FOB sendo a fruta mais exportada do período, ganhando da banana, maçã e limas, de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Frutas – IBRAF (2007).

O oídio é uma das doenças foliares mais destrutivas e freqüentes de cucurbitáceas, afetando a fotossíntese e prejudicando a produção dos frutos. O pepino, melão, melancia, abóbora, cabaça, chuchu e bucha são as espécies cultivadas desta família que são mais afetadas por esta doença (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005). O patógeno infecta toda a parte aérea da planta hospedeira exceto frutos, embora as folhas e caules sejam os mais afetados (STADNIK; RIVERA, 2001). Sinais compreendem crescimento branco pulverulento que corresponde a conídios, conidióforos e micélio do fungo que são produzidos em ambas as faces da folha. No entanto, a superfície adaxial (STADNIK; RIVERA, 2001) geralmente é a mais afetada. Estes crescimentos pulverulentos podem coalescer, tomando toda a superfície da folha em cultivares suscetíveis.

Há no mínimo seis diferentes espécies de oídio que infectam cucurbitáceas. Dentre elas, *Podosphaera* (sect. *Sphaerotheca*) *xanthii* (Castag.) U. Braun & N. Shish. (*Sphaerotheca fuliginea* (Schlechtend.:Fr.) Pollaci) e *Golovinomyces cichoracearum* (*Erysiphe cichoracearum* DC. ex Merat) são as mais freqüentes (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005; STADNIK; RIVERA, 2001) e as de maior importância econômica. Em regiões de climas tropicais e subtropicais, como o Brasil, *P. xanthii* é a mais freqüente, já que está mais adaptada a climas úmidos, enquanto que *G. cichoracearum* ocorre em clima seco e com mais freqüência em regiões de clima temperado (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005; STADNIK, RIVERA, 2001). Conforme Fazza (2006), dos 65 isolados de oídio obtidos de diversas regiões brasileiras, principalmente da região Nordeste, todos foram identificados como *P. xanthii*.

O uso de cultivares resistentes é um dos métodos mais empregados para o controle de oídio de algumas cucurbitáceas, como melão, pepino e algumas abóboras, embora para melancia e outras espécies não o seja (SITTERLY, 1978). No entanto,

este patógeno apresenta várias raças fisiológicas. A correta identificação das raças de *P. xanthi* e informações sobre a ocorrência e distribuição destas são de elevada importância para recomendação de linhagens adequadas em programas de melhoramento e para a implementação de estratégias de controle (THOMAS et al., 1984), já que estas diferem em virulência segundo a variedade de melão (MOHAMED et al., 1995; EPINAT; PITRAT; BERTRAND, 1993). A identificação de raças é muito importante também para a pesquisa aplicada, principalmente para indústria de sementes, que requer acurácia ao declarar o tipo e o nível de resistência de oídio em seus produtos (COHEN; BURGER; KATZIR, 2004).

A identificação destas raças dá-se através do método tradicional de inoculação do fungo em uma série diferenciadora de cultivares de meloeiro. Diversos sistemas de classificação de raças de oídio têm sido reportados em vários países, como nos Estados Unidos da América (THOMAS et al., 1984; MCCREIGHT, 2006), França (BARDIN et al., 1997), China (ZHIHAO et al., 1999), Japão (HOSOYA et al., 1999), Israel (KATZIR et al., 2000), República Tcheca (KŘÍSTKOVÁ; LEBEDA, 2001), Espanha (PINO et al., 2002) e, mais recentemente, Brasil (FAZZA, 2006). Nestes trabalhos, há variações nas cultivares utilizadas e na quantidade destas para composição da série diferenciadora.

Apesar de muito utilizada, a identificação de raças de *P. xanthii* através deste método tradicional pode ser dificultada por vários fatores, como diferenças na resposta da planta à inoculação devido a variações nas condições do ambiente, variabilidade genética dentro da população do patógeno e idade e estado nutricional da planta (COHEN; BURGER; KATZIR, 2004). A fim de obter informações mais rápidas e confiáveis sobre raças, o uso de marcadores moleculares ligados a genes de virulência pode ser adotado para identificar diferentes raças.

O presente trabalho teve por objetivos obter informações que auxiliem no melhoramento genético de meloeiro contra o ataque de *P. xanthii*, através da avaliação da diversidade genética entre isolados por meio de marcadores moleculares AFLP e seqüenciamento da região ITS-5.8S do rDNA.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 A cultura do meloeiro

O gênero *Cucumis* engloba o melão (*C. melo* L.) e o pepino (*C. sativus* L.) que são culturas comerciais, além de *C. anguria* L. e *C. metuliferus* E. Mey. exNaud. que são espécies de menor importância econômica (KIRKBRIDE, 1993). Além disso, o gênero engloba muitas outras espécies não cultivadas como *C. dipsaceus* Ehrenb. Ex Spach e *C. africanus* L. (KIRKBRIDE, 1993). A classificação botânica de *C. melo* é baseada na classificação de Charles Naudin, que leva em consideração os usos e características dos frutos (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997). Estes grupos são: *C. melo* agrestis Naud., *C. melo* cantalupensis Naud., *C. melo* inodorus Naud., *C. melo* flexuosus Naud., *C. melo* conomon Mak., *C. melo* chito, *C. melo* dudaim Naud. e *C. melo* L. momordica (PAIVA; QUEIRÓZ, 2003).

De acordo com Pearl-Treves et al. (1998) *C. melo* compreenderia, na realidade, duas espécies conforme filogenia molecular e características morfológicas e bioquímicas de 54 acessos de *C. melo*. Mas a divisão intra-específica não é bem definida, podendo ser encontrados variantes entre e dentro dos grupos. Ainda de acordo com os autores, existe uma grande variação morfológica, embora a distinção entre grupos possa ser devida a poucos genes, indicando uma classificação imprecisa com base na diversidade do DNA.

As plantas são tipicamente trepadeiras e das axilas do ramo principal saem três ou quatro ramos secundários que podem atingir de 2 a 3 metros (ARAÚJO, 1981). Gavinhas não são ramificadas e apenas uma nasce dos nós. As folhas são subcordatas e menos lobadas que as de pepino. A maioria das cultivares de melão é andromonoécia e tem frutos redondos ou ovais, mas algumas são monoécias e produzem frutos alongados (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997).

A origem do melão é controversa. Registros históricos e remanescentes arqueológicos apontam a origem do melão no Egito e no Irã durante o segundo e

terceiro milênios a.C. respectivamente, de acordo com Robinson e Decker-Walters (1997). Já outros pesquisadores sugerem que a Índia é o centro de domesticação da espécie, pois o melão tem sido cultivado ali por séculos e formas não comestíveis crescem naturalmente. Outros acreditam que a domesticação do melão começou no Irã. Finalmente, especula-se também que o melão foi domesticado na África, assim como outras espécies do subgênero *Melo* (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997). A cultura do melão espalhou-se através do meio oeste e Ásia, tornando-se um importante vegetal na Índia, Egito, Irã e China. O Irã, Índia, China e Afeganistão são considerados centros secundários de diversificação do melão. A diversidade genética na Espanha também é grande (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997).

A cultura do melão foi implantada comercialmente no Brasil na década de 60 do século passado quando quase todo o mercado nacional era abastecido pela importação de frutos do Chile e da Espanha (ARAÚJO; VILELA, 2003). São Paulo e Rio Grande do Sul tornaram-se, nesta época, as principais regiões produtoras do fruto (ARAÚJO; VILELA, 2003). Porém, fatores climáticos, produtividade e qualidade do fruto limitaram o cultivo nestas regiões (DIAS et al., 1998). De acordo com dados do IBGE (2006), de 1987 a 1996 a produção brasileira foi impulsionada pelo cultivo da frutífera no Nordeste, resultando em um incremento de 366% na produção.

Duas regiões do Nordeste concentram a produção de melão no Brasil, respondendo por cerca de 90% da produção nacional. Uma é o pólo RN/CE, do qual fazem parte o Agropólo de Mossoró e Açu, no Rio Grande do Norte, e o Agropólo do Baixo Jaguaribe, no Ceará. Estes são os mais importantes na produção do fruto no Brasil. A outra região é o pólo BA/PE, que fica no Agropólo do Submédio São Francisco, abrangendo Pernambuco e Bahia. No Submédio do Vale do São Francisco, no entanto, o cultivo foi perdendo espaço para outras culturas frutíferas a partir de 1987 (DIAS et al., 1998).

2.1.2 O oídio

De acordo com Robinson e Decker-Walters (1997), o oídio é uma enfermidade de cucurbitáceas e outras culturas em todo o mundo. Esta doença, que no Brasil recebe também a denominação de “cinza”, é rotineira nos campos de produção de melão e é

mais severa sob alta temperatura e umidade relativa do ar em torno de 60% (TAVARES, 2002).

Dentre os vários agentes causais de oídio em Cucurbitáceas, as espécies *G. cichoracearum* e *P. xanthii* são as de maior importância econômica (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005). Conforme Sitterly (1978), condições ambientais secas favorecem a esporulação e o desenvolvimento de *G. cichoracearum*, ao passo que alta umidade e ambiente protegido favorecem *P. xanthii*. A ocorrência de *G. cichoracearum* é restrita a regiões temperadas (BARDIN; CARLIER; NICOT, 1999) e *P. xanthii* predomina em clima tropical e subtropical (SITTERLY, 1978).

Fazza (2006) realizou levantamento de raças de oídio com isolados obtidos de abóbora, abobrinha, melancia, melão e pepino provenientes de diversas localidades brasileiras, com ênfase na região Nordeste. Dentre os 65 isolados estudados, todos foram identificados como *P. xanthii*. Esta espécie é a principal agente causal de oídio no Brasil, em detrimento de *G. cichoracearum*. Além de Fazza (2006), Stadnik e Rivera (2001) e Reifschneider et al. (1985) relataram *P. xanthii* como o agente causal mais comum de oídio de cucurbitáceas no Brasil.

A diferenciação entre *G. cichoracearum* e *P. xanthii* era antes dificultada pela ocorrência rara de cleistotécios em cucurbitáceas, que era a principal estrutura para a identificação destas espécies (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997). Mas Ballantyne (1975) propôs critérios de identificação com base em caracteres da fase imperfeita destes fungos, que é a mais comum. Os conídios destes dois agentes de oídio são do tipo *Oidium*, com conídios catenulados e micélio externo, mas os conídios de *G. cichoracearum* são geralmente cilíndricos com seus lados quase paralelos e cantos arredondados e os de *P. xanthii* são quase regularmente elípticos e mais ovóides. A presença de corpos de fibrosina é comum apenas para *P. xanthii* e não ocorre em *G. cichoracearum*. *P. xanthii* apresenta, às vezes, tubo germinativo bifurcado, enquanto *G. cichoracearum* apresenta tubos germinativos simples com apressórios pouco diferenciados (BALLANTYNE, 1975).

P. xanthii pode atacar toda a parte aérea da planta, mas as folhas são as partes mais afetadas (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005). As primeiras manifestações visuais da infecção compreendem manchas brancas circulares pulverulentas (os

conídios, conidióforos e micélio do patógeno), que aumentam em tamanho e coalescem, até toda a folha ficar coberta com colônias brancas que são observadas tanto na face adaxial como na face abaxial da folha, iniciando-se pela face adaxial (TAVARES, 2002). Ocorre um amarelecimento inicial, tornando-se marrom em consequência da morte celular. Isto causa a redução da qualidade do fruto e da produção, principalmente em meloeiro (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997).

A infecção também ocasiona desfolhamento prematuro e plantas severamente atacadas perdem o vigor. Outra consequência é o amadurecimento prematuro e queima dos frutos, devido a uma maior exposição ao sol, e também a deformação e perda de sabor dos frutos (STADNIK, RIVERA, 2001; TAVARES, 2002). A redução da qualidade do sabor dos frutos, segundo Sitterly (1978), é o principal dano causado pelo fungo em melão. O patógeno pode também causar deformações e manchas nos ramos jovens (TAVARES, 2002).

Diferindo de oídios de outras culturas, *P. xanthii* possui uma ampla gama de hospedeiros, já que ataca diversas espécies da família Cucurbitaceae (BARDIN et al., 1997) as quais podem representar fontes de inóculo para campos de produção de melão. Cleistotécios não são observados nos trópicos, assim, a sobrevivência é garantida por micélio ativo e conídios produzidos em cucurbitáceas voluntárias e cultivadas. O vento é o principal agente disseminador do patógeno e o ciclo completo leva de 5 a 6 dias (SITTERLY, 1978).

Conforme Tavares, Cruz e Menezes (1999), medidas preventivas auxiliam o produtor na redução de riscos associados à doença. Estas incluem: eliminar restos de cultura logo após a colheita e de todas as cucurbitáceas nativas e silvestres, realizar rotação de culturas, usar cultivares resistentes, aplicar fungicida de contato em combinação com sistêmico e fazer controle biológico através de aplicações de biofungicidas e leite (TAVARES; CRUZ; MENEZES 1999). De acordo com Stadnik e Rivera (2001) e Kurozawa; Pavan e Rezende (2005), fungicidas a base de enxofre, ou seja, de contato, podem controlar a doença, mas os fungicidas sistêmicos são os mais eficientes e recomendados. Há relatos de resistência a benomil e triadimefon, que são dois fungicidas sistêmicos (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997).

Embora os produtos químicos ajudem no controle da doença, o seu uso implica em alto custo e consumo de tempo. Além disso, podem causar prejuízo ambiental e também serem prejudiciais para a aparência do fruto. Desta forma, a produção de variedades resistentes apresenta-se como a estratégia mais viável para o controle desta doença (HOSOYA et al., 1999). A resistência a oídio em melão, segundo Robinson e Decker-Walters (1997) é raça-específica e, geralmente, monogênica. Este tipo de resistência não é duradoura devido ao surgimento de novas raças do patógeno em período de tempo relativamente curto. A cultivar PMR 45 tem um gene de resistência dominante e tem sido a cultivar pioneira no oeste dos Estados Unidos e outras áreas por mais de 50 anos, mas é resistente apenas à raça 1 do patógeno. Este gene, conhecido como *Pm-1*, foi identificado por Jagger, Whitaker e Porter (1938). Desta forma, também foram utilizadas as cultivares PMR 5, PMR 6 e algumas outras cultivares como fonte de resistência às raças 1 e 2, resultantes de um gene dominante simples e modificadores (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997).

P. xanthii apresenta diversas raças fisiológicas (FAZZA, 2006; COHEN; BURGER; KATZIR, 2004; PINO et al., 2002; HOSOYA et al., 1999; ZHIHAO et al., 1999). A primeira nova raça identificada foi observada em 1938 no Vale Imperial da Califórnia, denominada raça 2, ao quebrar a resistência do gene *Pm-1* contra a raça 1, presente em PMR 45 (SITTERLY, 1979). A classificação destas raças é feita utilizando-se uma série diferencial de cultivares de meloeiro, mas a composição desta série é muito variável conforme o sistema de classificação (FAZZA, 2006; HOSOYA et al., 1999; ZHIHAO et al., 1999).

É necessário identificar as raças que ocorrem em uma dada região, principalmente para programas de melhoramento, já que direciona a cultivar que deve ser aí utilizada, assim maximizando a eficiência do controle da doença por meio da resistência. Diante disso, é de extrema importância a correta identificação de raças deste patógeno. Porém, a forma tradicional de identificação de raças é um método que permite erros. Conforme Cohen, Burguer e Katzir (2004), o uso da série diferencial para identificação das raças é suscetível a variações em respostas da planta à inoculação devido a flutuações ambientais, variabilidade genética dentro da população do patógeno e idade e estado nutricional da planta. Há necessidade, desta forma, de padronização

nas condições de teste de raças, como por exemplo, o uso de discos de folha de melão para o teste de raças como sugerido por Cohen (1993). Os usos de outras ferramentas, como marcadores moleculares, poderiam aliviar este problema.

2.1.3 Marcadores moleculares e variabilidade genética de *Podosphaera*

Marcadores moleculares têm sido utilizados com sucesso para avaliar a diversidade genética de fungos fitopatogênicos. O uso de marcadores moleculares com a finalidade de caracterizar 28 isolados de *S. fuliginea* (*P. xanthii*) foi descrito por Bardin et al. (1997), os quais realizaram testes de virulência, testes de grupo de compatibilidade sexual e avaliaram polimorfismos de DNA por meio de análise de fragmentos de restrição de comprimentos polimórficos da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) da região 5.8S do gene ribossomal. Não foram encontrados polimorfismos para as seqüências ITS através do uso de 11 enzimas de restrição e a análise por RAPD indicou um baixo nível de polimorfismo, que sugere uma relação genética próxima entre isolados, apesar de originarem de oito países e diferentes hospedeiros. Ainda de acordo com os autores, a presença de dois grupos de compatibilidade sexual na população e o baixo nível de desequilíbrio gamético observado indicam que recombinação pode ocorrer na população de *P. xanthii* (BARDIN et al., 1997), apesar do baixo nível de polimorfismo.

Outro trabalho relativo ao uso de marcadores moleculares para o estudo de populações de *P. xanthii* foi o de Katzir et al. (2000), no qual os autores usaram as técnicas de RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), ISSR (*Inter simple sequence repeat amplification*) e análise de ácidos graxos de conídios do patógeno. Assim como no trabalho de Bardin et al. (1997), baixo polimorfismo foi detectado com a análise por RAPD e por ISSR para 26 isolados de Israel. Apenas 2% dos *primers* de RAPD e 10% de *primers* de ISSR detectaram polimorfismo entre estes isolados. Mas os perfis de ácidos graxos obtidos separaram duas raças em dois subgrupos de ácidos graxos diferentes (KATZIR et al., 2000).

Não há trabalhos que relatam a utilização de polimorfismos de comprimento em fragmentos amplificados (AFLP – *Amplified fragment lenght polymorphism*) para a

caracterização de populações de *P. xanthii*. Esta técnica apresenta vantagens em relação a outras técnicas já testadas para análise molecular deste patógeno. Sua maior vantagem é a maior quantidade de fragmentos que são obtidos. Proporciona cobertura ampla do genoma, permite alta capacidade de detecção de polimorfismos em sítios de restrição e alta especificidade de amplificação devido ao uso de *primers* mais longos que os de RAPD (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Para *Podosphaera leucotricha* (E. and E.) Salm., agente causal do oídio de macieira, foi feito isolamento, identificação e caracterização molecular através da técnica de AFLP por Urbanietz e Dunemann (2005). Estes autores verificaram que a análise dos isolados com 43 combinações de *primers* revelou apenas 4-5% de bandas polimórficas pela técnica de AFLP. Com este resultado, concluíram que a diversidade genética presente nos isolados de *P. leucotricha* estudados também é baixa. Entretanto, a diversidade fenotípica, avaliada por coeficientes de similaridade estimados com base em dados de virulência, foi alta, variando de 0,73 a 1,0 para isolados coletados em estufa e de 0,26 a 1,0 para isolados coletados em locais próximos a cidade que estava alocada esta estufa. A baixa diversidade genética é típica de populações de fitopatógenos fúngicos que são introduzidos de algum lugar do mundo, onde apenas uma pequena parte da diversidade genética presente no centro de origem migrou, neste caso, para a Europa. Devido ao baixo nível de polimorfismo, acredita-se que as plantas desta estufa foram infectadas com esporos de origem assexuada.

O seqüenciamento é outra ferramenta útil para a análise molecular de fitopatógenos. A análise da seqüência da região ITS do DNA ribossomal pôde discriminar três grupos de isolados de *Podosphaera pannosa* (Wallr.:Fr.) de Bary, agente causal de oídio em rosas e *Prunus* spp., conforme trabalho de Leus et al. (2006). Entre 26 isolados, 18 foram altamente virulentos em rosa e avirulentos ou pouco virulentos em *Prunus avium*. O outro grupo com quatro isolados foi altamente virulento em ambos hospedeiros. A diferença entre estes grupos é de um par de bases. Dois isolados coletados em *Prunus* sp., que não infectam rosa, foram classificados como *P. pannosa*, baseando-se nas suas seqüências ITS que foram idênticas à dos isolados altamente virulentos a rosas. Os autores concluíram que diferentes isolados de *P. pannosa* apresentam variação na especificidade à hospedeiros.

Além de Leus et al. (2006), Cunningham, Lawrie e Pascoe (2005) verificaram que o estudo da região ITS do DNA ribossomal é apropriado para estudo da variação genética em nível de espécie em fungos agentes causais de oídio, principalmente em membros do gênero *Podosphaera*. Para isto, Cunningham, Lawrie e Pascoe (2005) amplificaram a região ITS do DNA ribossomal de 29 isolados de *Podosphaera tridactyla* obtidos de espécies de *Prunus* a qual foi analisada através de RFLP. Esta análise revelou seis grupos e uma comparação das seqüências de espécies representativas destes grupos revelou três clados. O clado 1 conteve todos os isolados obtidos de *Prunus* subg. *Prunus*. O clado 2 apresentou isolados provenientes de vários subgêneros de *Prunus*, exceto de *Prunus* subg. *Prunus*. O clado 3 compreendeu dois isolados do Japão e Coréia. A análise filogenética comparando *P. tridactyla* com uma gama de isolados de *Podosphaera* sugeriu que *P. tridactyla* é parafilética.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Obtenção e manutenção de isolados de *Podosphaera xanthii*

Isolados de *P. xanthii* foram coletados, identificados e conservados pela Clínica Fitopatológica da empresa Sakata Seeds Sudamerica LTDA. e por Fazzia (2006), junto ao Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia agrícola (ESALQ/USP). Estes isolados foram obtidos de plantas de melão, melancia e abóbora nas principais regiões produtoras do Brasil (Tabela 1).

Tabela 1 - Isolados de *Podosphaera xanthii* utilizados no presente trabalho

(continua)			
Nome do isolado	Raça	Hospedeiro	Local de origem
3371	0	Melancia	Tupã - SP
3712-2	3	Melão	Petrolina - PE
3584	5	Melão	Baraúna - RN
WMN 5.7	1	Melancia	Luiziânia - SP
WMN 9.1	1	Melancia	Queiróz - SP
4871-1	3	Melão	Mossoró - RN

Tabela 1 - Isolados de *Podosphaera xanthii* utilizados no presente trabalho

(conclusão)			
Nome do isolado	Raça	Hospedeiro	Local de origem
4871-3	5	Melão	Mossoró - RN
4842-1	3	Melão	Quixeré - CE
4843-2	3	Melão	Quixeré - CE
4842-2	5	Melão	Quixeré - CE
WMN 7.2	0	Melancia	Tupã - SP
3710-3	5	Melão	Petrolina - PE
4841-2	5	Melão	Mossoró - RN
4840-2	3	Melão	Baraúna - RN
4843-1	3	Melão	Quixeré - CE
WMN 11.1	1	Melancia	Tupã - SP
PET 1	5	Melão	Petrolina - PE
3265	1	Abóbora	Parapuã - SP
3510	5	Melão	Mossoró - RN
WMN 5.6	1	Melancia	Luiziânia - SP
4871-2	3	Melão	Mossoró - RN
4841-1	5	Melão	Mossoró - RN

A identificação das raças foi baseada na reação de série de cultivares diferenciadoras proposta por Fazzia (2006). As cultivares utilizadas foram 'Védrantais', 'PMR45', 'PMR5', 'PMR6', 'WMR29', 'Edisto47', 'PI414723' conforme Tabela 2. Esta etapa foi realizada na Clínica Fitopatológica da Sakata Seeds Sudamerica LTDA.

A manutenção dos isolados foi realizada através de inoculação em cotilédones de plantas de pepino (híbrido Safira) cultivadas em bandejas contendo vermiculita. Estes foram cortados e desinfetados superficialmente em câmara asséptica por tratamento de 30 segundos em hipoclorito de sódio 0,3% e duas lavagens em água destilada estéril antes de serem acomodados em placas de petri contendo três papéis de filtro estéreis umedecidos com água. Conídios do fungo foram transferidos para os cotilédones com auxílio de um cílio fixado na ponta de uma pipeta pasteur. Os cotilédones inoculados foram armazenados em câmara de germinação sob temperatura de 22°C e fotoperíodo 12/12 horas (luz/escuro) por aproximadamente 15 dias. Após este período, o isolado foi novamente inoculado, repetindo-se o procedimento. A

manutenção dos isolados foi realizada tanto na Clínica Fitopatológica da empresa quanto no Laboratório de Genética Molecular do setor de fitopatologia da ESALQ/USP.

Tabela 2 - Relação e reação esperada de cultivares de meloeiro quando inoculadas com diferentes raças de *Podosphaera xanthii*. (Adaptado de FAZZA, 2006)

Cultivares de meloeiro	Raças de <i>Podosphaera xanthii</i>						
	Classificação						
	Raça 1	Raça 2	Raça 3	Raça 4	Raça 5	Raça 2	Raça 0
		França				EUA	
Védrantais	S	S	S	S	S	S	R
PMR45	R	S	S	S	S	S	R
PMR5	R	R	S	R	R	R	R
PMR6	R	R	S	R	R	R	S
WMR29	R	R	S	S	S	NT	R
Edisto47	R	R	S	R	S	S	R
PI 414723	R	R	R	R	R	S	R

S=Suscetível; R=Resistente; NT=Não testado por este sistema

2.2.2 Caracterização molecular de isolados de *Podosphaera xanthii* com marcadores AFLP

O DNA dos isolados foi extraído conforme protocolo desenvolvido por Fazza (2006). Aproximadamente 50 µg de conídios, conidióforos e micélio de cada isolado foram coletados de colônias mantidas em cotilédones de pepino da variedade Safira com auxílio de agulha hipodérmica, colocados em tubos eppendorf contendo 100 µL de tampão de extração (50mM Tris HCl pH 7,5; 0,7M NaCl; 10mM EDTA pH 8,0; 0,5% SDS) à temperatura ambiente e agitados por 30 segundos. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 13.000rpm por 2 minutos e 90µL do sobrenadante foram transferidos para novos tubos contendo 90µL de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas por 2 minutos, centrifugadas por 10 minutos a 13.000rpm e secas à

temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, os pellets foram ressuspendidos em 20µL de água milli-Q estéril contendo RNase (1mg/mL). A quantificação foi realizada em gel de agarose a 1%, tendo como padrão fragmentos de DNA de fago λ com concentração conhecida de 10ng/µL. A eletroforese se deu em tampão 0,5X TBE (100mM de Tris base, 100mM de ácido bórico e 2mM de EDTA pH 8,0).

O procedimento de obtenção de marcadores AFLP foi baseado no protocolo adaptado de Vos et al. (1995). Foi feita digestão do DNA genômico por duas enzimas de restrição, uma de corte freqüente (*MseI*, New England-Biolabs, Estados Unidos) e outra de corte raro (*EcoRI*, New England-Biolabs, Estados Unidos), em reação composta por 2,0µL de tampão OnePhorAll (OPA)10X, 0,2µL de BSA (10µg/µL), 5µL de DNA (0,6ng/µL) e 2 unidades de cada uma das enzimas em um volume final de 20µL. A incubação foi feita a 37°C por 20 horas.

Após a digestão, procedeu-se a ligação de adaptadores em reação composta de 0,4µL de tampão da ligase (10X), 0,4µL de cada um dos adaptadores (5µM) e 0,13µL de T4 DNA ligase (3unidades/µL) em volume final de 4µL por tubo com DNA previamente digerido. A incubação foi realizada a 23°C por três horas. Depois desta etapa foi realizada a reação de pré-amplificação com 25ng de iniciadores *EcoRI* mais uma base (E+A) combinado com iniciadores *MseI* mais uma base (M+C), 0,8µL de dNTP (10mM), 2µL de tampão 10X, 1,2µL de MgCl₂ (25mM), 0,6µL de Taq DNA polimerase (5unidades/µL) e 2µL de DNA ligado (0,5ng/µL), em volume final de 20µL. Esta reação iniciou-se a 94°C por 2 minutos, passando a seguir por 26 ciclos compostos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, havendo um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos. Ao final deste processo, foram acrescentados 80µL de água milli-Q a cada um dos tubos.

O procedimento para a reação da amplificação seletiva foi realizado com iniciadores com 2 nucleotídeos a mais, além do já constante nos iniciadores da reação de pré-amplificação. Assim, utilizou-se as combinações E+AAA e M+CAA, E+AAC e M+CAC e E+AAA e M+CAT. A reação foi composta por 1,2µL de cada iniciador (25ng/µL), 0,4µL de dNTP (10mM), 2µL de tampão 10X, 1,2µL de MgCl₂ (25mM), 0,2µL de Taq DNA polimerase (5u/µL) e 3µL da reação de pré-amplificação diluída, em

volume final de 20µL. Esta reação iniciou-se a 94°C por 2 minutos, passando a seguir por 12 ciclos compostos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Após isso, foram realizados 23 ciclos compostos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, havendo um ciclo de extensão final a 72°C por 2 minutos.

Posteriormente, foi feita pré-corrida por eletroforese em gel de acrilamida 6% (50,4g de uréia, 7,2g de acrilamida, 0,36g de bisacrilamida em TBE1X até volume final de 120mL), por 1 hora a 80W a 45°C. Os produtos obtidos nas reações de amplificação seletiva foram submetidas a eletroforese nesse gel nas mesmas condições da pré-corrida, por 5 horas. O gel foi revelado através de metodologia descrita por Creste et al. (2001). Os géis foram fixados em 2L de solução 1% ácido acético glacial e 10% de álcool etílico por 10 minutos sob agitação constante, seguido de lavagem por 1 minuto em 2L de água destilada sob agitação. Terminada a lavagem, procedeu-se pré-tratamento por 2 minutos e 40 segundos em ácido nítrico 1,5% e posterior lavagem com 2L de água destilada. Os géis foram tratados com solução de nitrato de prata 0,2%, sob agitação, durante 20 minutos. Em seguida foram realizadas duas lavagens em 2L de água por 30 segundos cada. A revelação dos géis foi feita com 2L de solução gelada de 30 g/L de carbonato de sódio e adicionado 600µL de formaldeído 37%.

Os fragmentos visualizados no gel foram analisados visualmente produzindo uma tabela binária conforme a presença (1) ou ausência (0) de um determinado fragmento em cada isolado. Foram utilizados dois géis para cada combinação de iniciadores, já que não havia espaço para todos isolados no mesmo gel. Somente fragmentos reproduzíveis foram utilizados na análise. Estes foram identificados comparando-se os padrões eletroforéticos dos géis com os do um gel controle, no qual analisou-se, sob iguais condições, uma sub amostra de dez isolados que foram obtidos de nova extração, digestão, ligação, pré-amplificação e amplificação seletiva. No Anexo A estão os dados binários obtidos com as combinações de iniciadores utilizados.

Os dados foram analisados empregando o programa NTSYSpc (ROHLF, 2000). A matriz de similaridade foi calculada com base no coeficiente de Jaccard $GS(ij) = a / (a + b + c)$, onde $GS(ij)$ é a medida da similaridade entre isolados “i” e “j”; “a” é o número de bandas polimórficas que são compartilhadas por “i” e “j”; b é o número de bandas

presentes em “i” e ausentes em “j”; e “c” é o número de bandas presentes em “j” e ausentes em “i”. Os dados gerados foram utilizados na análise de agrupamento pelo método UPGMA (ROHLF, 2000) para a construção de um dendrograma.

2.2.3 Estudo da diversidade de *Podosphaera xanthii* através de seqüenciamento da região ITS-5.8S do rDNA

A região ITS-5.8S do gene ribossomal foi amplificada por PCR em uma reação contendo 0,5µL dos iniciadores ITS 4 e ITS 5 (WHITE et al. 1990) a 5µM cada, 0,5µL de dNTP (10mM), 2,5µL de tampão 10X, 1,5µL de MgCl₂ (25mM), 0,2µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) e 2µL de DNA de *P. xanthii* (2ng/µL), em volume final de 25µL. Esta reação iniciou-se a 95°C por 5 minutos, passando a seguir por 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 50 segundos.

A partir de gel de agarose 1% foi verificada a qualidade da amplificação dos fragmentos utilizando como padrão fragmentos de DNA de fago λ com concentração conhecida de 50 ng/µL, 100 ng/µL e 200 ng/µL. A eletroforese ocorreu em tampão 0,5X TBE (100mM de Tris base, 100mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA pH 8,0).

Foram feitas duas PCR's para o seqüenciamento nas quais foram utilizados aproximadamente 200 ng de produto da primeira PCR descrita acima. Além deste foi também utilizado 1µL de iniciador *forward* ITS 4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) a 3,2µM ou 1µL de iniciador *reverse* ITS 5 (GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) a 3,2µM, mais 2µL de tampão *Save Money* (300µL de Tris-HCl pH 9 1M, 300µL de MgCl₂ 0,025M e 900µL de água milli-Q), 2µL do kit *Big Dye Terminator* (*Applied Biosystem*) e quantidade de água milli-Q suficiente para completar 10µL da reação. A reação iniciou-se a 96°C por 3 minutos e consistiu de 25 ciclos compostos de 96°C por 10 segundos, 50°C a 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

Os amplicons foram precipitados em 80µL de isopropanol a 75% para cada amostra e agitados em vortex por 10 segundos. As amostras foram deixadas no escuro por 15 minutos e foram centrifugadas por 45 minutos em centrífuga de placa à 20°C e 4000rpm. O sobrenadante foi descartado e precipitado lavado com 150µL de etanol

gelado a 70%. As amostras foram novamente centrifugadas durante 15 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o DNA foi então seco durante 1 hora em temperatura ambiente.

Foram adicionados 3µL de tampão *Blue Dextran* (Promega, Estados Unidos) para cada amostra e agitados em vortex para ressuspender o DNA. A solução com o DNA foi desnaturada a 95°C por 5 minutos e imediatamente imersa em gelo até o momento do seqüenciamento, realizado em seqüenciador ABI 377 Prism, conforme protocolo do fabricante (*Applied Biosystems*, Estados Unidos).

O gel foi preparado com 18g de uréia, 26mL de água bidestilada e 5mL de solução *Long Ranger* (Cambrex, Estados Unidos) contendo 5% de acrilamida. Foram então adicionados 5mL de TBE 10x, 250ul de persulfato de amônio 10% simultaneamente a 35µL de TEMED. Após a polimerização, 1,5µL de cada amostra foram pipetados no gel.

As seqüências foram alinhadas e editadas pelo programa *Sequencher* (Gene Codes Corporation Ann Arbor, MI, Estados Unidos). Cada seqüência foi editada manualmente através de inspeção visual. Através do programa CLUSTAL X, versão 1.81 (THOMPSON et al., 1997) foi realizado novo alinhamento observado no Anexo D. Foram utilizados os parâmetros “gap-opening penalty” de 10.0 e “gap-extention penalty” de 0.1. As seqüências foram comparadas e alinhadas com seqüências de *P. xanthii* e outras espécies de *Podosphaera* e *G. cichoracearum* publicadas no GenBank (*P. xanthii* acessos EU327327, EU190973, EF050036, AY450961, AB040326, *Podosphaera fusca* EU159425, *Podosphaera leucotricha* EU148597, *Podosphaera pannosa* AB022348, *Podosphaera trydactyla* var. *trydactyla* AB022393, *Podosphaera clandestina* AB026150, *Podosphaera spiraeae* AB026153, *Podosphaera longiseta* AB022422, *Podosphaera aphanis* var. *aphanis* AB000938, *Podosphaera ferruginea* var. *ferruginea* AB027232, *Podosphaera balsaminae* AB040344, *Golovinomyces cichoracearum* AB077688). Relações filogenéticas entre as espécies foram determinadas utilizando 1000 réplicas para cálculo de valor de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) pelo método de máxima parcimônia utilizando o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 4 (TAMURA et al., 2007).

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização molecular de isolados de *Podosphaera xanthii* com marcadores AFLP

Vários fragmentos foram obtidos a partir das três combinações de iniciadores, como visto na Figura 1. O número médio de fragmentos obtidos por combinação foi 51 dos quais, em média, 31 foram considerados reproduzíveis e, destes, uma média de 28 foram polimórficos. Para a primeira combinação, 76,92% das bandas reproduzíveis foram polimórficas, para a segunda 91,67% e para a terceira 100%. Ao todo foram avaliados 92 fragmentos, de tamanho variando entre 50 e 800 pb (Anexo A). Não foram encontrados isolados 100% similares, indicando a alta variabilidade entre isolados, como pode ser visto na matriz de distâncias (Anexo C). A similaridade genética máxima observada entre isolados foi de 69% entre os isolados 4840-2 e 4871-2, provenientes de plantas de melão diferentes coletadas no Rio Grande do Norte, a primeira em Baraúna e a segunda em Mossoró. Ambos isolados são da raça 3. A similaridade mínima de 23% foi verificada entre os isolados 4843-2 e 4841-1. O primeiro foi classificado como raça 3 e o segundo foi classificado como raça 5. Esses isolados foram coletados em melão, mas o primeiro no Ceará, no município de Quixeré, e o segundo no Rio Grande do Norte, em Mossoró. Não foram identificados marcadores que discriminassem raças ou que separassem origens geográficas ou hospedeiros com as combinações de iniciadores utilizadas.

Obteve-se um dendrograma no qual foi possível verificar dois grupos com 40% de similaridade genética em média entre eles (Figura 2). No primeiro clado estão agrupados isolados das raças 1, 3 e 5. No outro, há uma sub-divisão na qual verifica-se similaridade genética média de 42% entre estes. Neste, um clado (2° clado) concentrou

Figura 1 - Eletroforese dos fragmentos AFLP amplificados com os iniciadores E+AAA e M+CAA de representantes de isolados de *Podosphaera xanthii*. M= marcador molecular de 50pb (Promega)

isolados da raça 0, 1, 3 e 5 e o outro (3° clado) isolados da raça 0, 3 e 5. Não houve preciso agrupamento das raças, já que ocorreram isolados de raças diferentes em um mesmo clado e outros isolados da mesma raça e/ou raça diferente estavam presentes nos outros cladros. Verificou-se que isolados de melão, melancia e abóbora estavam no primeiro clado. Nos outros dois cladros estavam presentes apenas isolados de melão e melancia. Quanto à origem geográfica, também não houve agrupamento. Em cada um dos cladros haviam isolados de São Paulo, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Ceará.

Figura 2 - Dendrograma dos isolados de *Podosphaera xanthii* analisados através de AFLP. A similaridade genética entre os isolados foi estimada pelo coeficiente de Jaccard e o agrupamento fenético pelo método UPGMA

3.2 Diversidade genética de isolados de *Podosphaera xanthii* através de sequenciamento da região ITS-5.8S do rDNA

Diferente do que foi observado com o marcador molecular AFLP, nenhuma diversidade foi verificada na sequência de 490 pb da região ITS 5.8S do DNA ribossomal. Os isolados foram agrupados em um único clado com 100% de similaridade junto com duas seqüências de *P. xanthii* depositadas no GenBank acessos números

Figura 3 – Árvore filogenética (neighbour-joining) dos isolados de *Podosphaera xanthii* seqüenciados na região 5.8S do rDNA. Os números nos nós indicam valores de bootstrap

AB040326 (HIRATA et al., 2000) e AY450961 (CUNNINGTON; LAWRIE; PASCOE, 2004) conforme a Figura 3. O primeiro acesso foi obtido de pepino, no Japão, e o segundo, de *Vigna* sp., na Austrália.

As outras seqüências de *P. xanthii*, assim como as de *P. fusca* e de *P. balsaminae*, ficaram em clados diferentes ao clado onde foram agrupados os isolados aqui estudados. *P. fusca*, que também causa oídio em cucurbitáceas, formou clado junto com *P. balsaminae* embora o primeiro tenha sido obtido de *Calendula officinalis* L. e o segundo de *Impatiens textori*. *P. trydactyla* var. *trydactyla* de *Prunus japonica* e *P. longiseta* de *Prunus grayana*, mesmo sendo do mesmo gênero que *P. xanthii*, foram mais diferentes geneticamente à este que *G. cichoracearum* sendo este obtido de *Lactuca scariola*. As diferenças entre as seqüências de bases das espécies de *P. xanthii*, os isolados aqui trabalhados e outras espécies de *Podosphaera* podem ser vistas no alinhamento de seqüências apresentado no Anexo D.

4 DISCUSSÃO

4.1 Variabilidade genética entre isolados de *Podosphaera xanthii* avaliadas por meio de marcadores AFLP

Bardin et al. (1997) relataram baixa diversidade genética entre isolados de *P. xanthii* coletados de várias cucurbitáceas em várias localidades, a exemplo deste trabalho. Esses autores verificaram níveis de similaridades mínimo e máximo de 64% e 100%, respectivamente. No caso de isolados brasileiros, estes valores variaram de 23% a 69%, evidenciando maior variabilidade do que relatado por Bardin et al. (1997). A diversidade de hospedeiros e a quantidade de isolados avaliados por estes autores foram semelhantes aos do presente trabalho. Bardin et al. (1997) utilizaram isolados de melão, melancia, pepino e abóbora, totalizando 28 isolados, enquanto que no presente trabalho foram utilizados isolados dos mesmos hospedeiros exceto pepino, num total de 22 isolados. Devido a tais semelhanças, esses fatores possivelmente não foram os responsáveis pelas diferenças entre os dados moleculares de diversidade genética verificados entre os dois trabalhos.

É provável que isolados utilizados por Bardin et al. (1997), todos coletados em países do hemisfério Norte, sejam de composição genética mais homogênea do que a existente na população de *P. xanthii* do Brasil. Essa baixa variabilidade de isolados pode ser devida à introdução mais recente desse patógeno nesses países e ao fato de o Brasil possuir clima tropical favorável ao desenvolvimento do patógeno e variadas culturas de cucurbitáceas presentes na maior parte do ano, disponibilizando tecido hospedeiro. Esses fatores proporcionam maior capacidade de adaptação ou evolução mais rápida de seus novos recombinantes, implicando maior variabilidade genética.

Um outro fator que pode explicar a discrepância entre os dois trabalhos reside no fato que neste trabalho usamos marcadores AFLP, em oposição a marcadores RAPD usados por Bardin et al. (1997). A técnica de AFLP é muito mais informativa do ponto de vista genético, visto que permite obter um grande número de fragmentos em um único gel e permite alto poder de detecção de variabilidade genética por aliar técnicas de RFLP, a qual explora polimorfismos de ausência e presença de sítios de restrição, e RAPD a qual explora polimorfismos em sítios de hibridização de *primers* (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A alta variabilidade genética de isolados de *P. xanthii* encontrada no Brasil é um entrave para o melhoramento de plantas, já que isso não permite direcionar o melhoramento para produção de novas cultivares, recomendadas para uma dada região, as quais contenham genes de resistência a raças que ocorrem nesta região. Então o desenvolvimento de estratégias de manejo da resistência do hospedeiro, como o uso de piramidamento de genes, pode ser dificultado.

No presente trabalho não foram verificados clados que reunissem todos isolados de um mesmo hospedeiro, região de origem ou raça, a exemplo dos resultados relatados por Bardin et al. (1997). Essa falta de uniformidade de clados quanto à origem dos isolados possivelmente indica a não especialização dos mesmos quanto aos seus hospedeiros. Então, isolados provenientes de melão poderiam infectar plantas de abóbora, por exemplo, e isolados de abóbora poderiam infectar plantas de melão, o que já havia sido relatado por Fazza (2006). Por outro lado, devida à intensa dispersão do patógeno tanto no Brasil como nos países amostrados por Bardin et al. (1997), a população de isolados esteja misturada de tal forma, que não há como identificar

geneticamente isolados de uma mesma região de origem. Provavelmente isso explica a ausência de clados que separam isolados em regiões de origem.

Não foram verificados marcadores raça-específicos. Esses marcadores seriam úteis na identificação prática dessas raças devido à utilização de um método uniforme, reduzindo a variação existente na classificação delas, por meio de série diferencial. A região amostrada pelos iniciadores escolhidos para o AFLP provavelmente não incluiu regiões genômicas que abrigam genes responsáveis pela especificidade com relação ao hospedeiro.

4.2 Ausência de diversidade entre seqüências de *Podosphaera xanthii* avaliadas por meio de seqüenciamento da região ITS-5.8S do rDNA

O seqüenciamento da região ITS 5.8S do rDNA evidenciou similaridade de 100% entre os isolados brasileiros de *P. xanthii*, diferindo do resultado obtido com a análise AFLP. Isso ocorreu já que a técnica de AFLP proporciona numerosos marcadores distribuídos randomicamente pelo genoma (BENSCH; ÅKESSON, 2005), conforme discutido acima, ao passo que o seqüenciamento aqui realizado foi feito especificamente na região ITS 5.8S do DNA ribossomal. Esta região genômica é utilizada para estudos filogenéticos em nível inter específico, segundo Cunnington, Lawrie e Pascoe (2005), e se aplica particularmente a membros do gênero *Podosphaera*. Não foi somente neste trabalho que a região ITS evidenciou seqüências iguais de DNA de isolados de oídio; seqüências de nucleotídeos de cinco isolados de oídio obtidos de cucurbitáceas também foram idênticas conforme Hirata et al. (2000).

Logo, os isolados aqui utilizados são da mesma espécie, já que agruparam com seqüências de *P. xanthii* da Austrália e do Japão, como confirmado pelo seqüenciamento da região ITS 5.8S do DNA ribossomal e pela árvore filogenética. Entretanto, mais próximos que outras seqüências, uma seqüência de *P. xanthii* da Hungria e outra de Taiwan formaram um clado e uma seqüência da Itália ficou isolada deste e do clado de *P. xanthii*, o qual conteve os isolados aqui estudados junto com as seqüências da Austrália e do Japão. Apesar dessa pequena diferença, não há indicativos de que esses isolados da Europa e de Taiwan sejam de outra espécie, visto que não existem diferenças morfológicas entre eles.

É provável que para *P. xanthii* outra região seria adequada para estudo filogenético de raças. Conforme Saenz e Taylor (1999), genes que codificam proteínas também podem ajudar a entender as relações entre a maioria dos clados identificados no estudo desses autores, os quais demonstraram a utilidade do seqüenciamento da região ITS para identificar a maioria das linhagens de oídio. Com intuito de uma melhor identificação do ancestral do oídio e de ascomicetos próximos a esse grupo de fungos, dados de seqüenciamento de genes mais conservados como a subunidade maior do gene do rRNA ou a subunidade mitocondrial menor do gene do rRNA podem ser úteis, segundo esses mesmos autores. Há necessidade, então, de pesquisas que busquem novas regiões do genoma do patógeno para identificação e caracterização dos isolados de oídio de cucurbitáceas. Para isso, devem-se utilizar iniciadores que amplifiquem seqüências conservadas em fungos, como os genes da β -tubulina e histonas (GLASS; DONALDSON, 1995).

5 CONCLUSÕES

Análise da diversidade genética com base em marcadores AFLP revelou alta variabilidade entre isolados.

Essa variabilidade não se revelou estruturada segundo hospedeiro ou local de origem geográfica.

Em contraposição aos resultados de AFLP, a análise das seqüências da região ITS 5.8S não revelou nenhum polimorfismo entre isolados, indicando que todos são da mesma espécie.

A heterogeneidade genética entre isolados de *P. xanthii* no Brasil representa um entrave ao melhoramento genético do meloeiro.

Outras regiões do genoma do fungo devem ser estudadas na tentativa de identificar marcadores que possibilitem distinguir raças de *P. xanthii*.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J.L.P.; VILELA, N.J. Aspectos socioeconômicos. In: SILVA, H.R.; COSTA, N.D. (Ed.). Melão: produção aspectos técnicos. Brasília: EMBRAPA, 2003. cap. 2, p.15-18.
- ARAÚJO, J.P. Cultura do melão. Petrolina: EMBRAPA, 1981. 40 p.
- BALLANTYNE, B. Powdery mildew on Cucurbitaceae: identity, distribution, host range and sources of resistance. Proceedings of the Linnean Society of New South Wales, Sydney, v. 99, p. 100 – 120, 1975.
- BARDIN, M.; CARLIER, J.; NICOT, P.C. Genetic differentiation in the French population of *Erysiphe cichoracearum*, a causal agent of powdery mildew of cucurbits. Plant Pathology, Oxford, v. 48, p. 531-540, 1999.
- BARDIN, M.; NICOT, P.C.; NORMAN, P.; LEMAIRE, J.M. Virulence variation and DNA polymorphism in *Sphaerotheca fuliginea*, causal agent of powdery mildew of cucurbits. European Journal of Plant Pathology, Dordrecht, v. 103, p. 545–554, 1997.
- BENSCH, S.; ÅKESSON, M. Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? Molecular Ecology, Oxford, v. 14, p. 2899-2914, 2005.
- COHEN, R. A leaf disk assay for detectionh of resistance of melon to *Sphaerotheca fuliginea* race 1. Plant Disease, St. Paul, v. 77, p.513-517, 1993.
- COHEN, R.; BURGER, Y.; KATZIR, N. Monitoring physiological races of *Podosphaera xanthii* (syn. *Sphaerotheca fuliginea*), the causal agent of powdery mildew in cucurbits: factors affecting race identification and the importance for research and commerce. Phytoparasitica, Bet Dagan, v. 32, n. 2, p. 174-183, 2004.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. Plant Molecular Biology Reporter, Athens, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.
- CUNNINGTON, J.H.; LAWRIE, A.C.; PASCOE, I.G. Molecular determination of anamorphic powdery mildew fungi on the Fabaceae in Australia. Australasian Plant Pathology, Queensland, v. 33, p. 281-284, 2004.
- _____. Genetic variation within *Podosphaera tridactyla* reveals a paraphyletic species complex with biological specialisation towards specific *Prunus* subgenera. Mycological Research, Amsterdam, v. 109, p. 357–362, 2005.

DIAS, R.C.S.; COSTA, N.D.; SILVA, P.C.G.; QUEROZ, M.A.; ZUZA, F.; LEITE, L.A.S.; PESSOA, P.F.A.P.; TARAO, D. A cadeia produtiva do melão no Nordeste. In: CASTRO, A.M.G.; LIMA, S.M.V.; GOEDART, W.J.; FREITAS FILHO, A.; VASCONCELOS, J.R.P. (Ed.). Cadeias produtivas e sistemas naturais: prospecção tecnológica. Brasília: Embrapa, SPI; Embrapa, DPD, 1998. cap. 17, p. 441-494.

EPINAT, C.; PITRAT, M.; BERTRAND, F. Genetic analysis of resistance of five melon lines to powdery mildews. *Euphytica*, Wagening, v. 65, p. 135 – 144, 1993.

FAZZA, A.C. Caracterização e ocorrência de agentes causais de oídio em cucurbitáceas no Brasil e reação de germoplasma de meloeiro. 2006. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, Lancaster, v. 39, p. 783–791. 1985

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220p.

GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the pcr to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 61, n. 4, p. 1323–1330, 1995.

HIRATA, T.; CUNNINGTON, J.H.; PAKSIRI, U.; LIMKAISANG, S.; SHISHKOFF, N.; GRIGAILIUNAITE, B.; SATO, Y.; TAKAMATSU, S. Evolutionary analysis of subsection Magnicellulatae of Podosphaera section *Sphaerotheca* (Erysiphales) based on the rDNA ITS sequences with special reference to host plants. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 78, p. 1521-1530, 2000.

HOSOYA, K.; NARISAWA, K.; PITRAT, M.; EZURA, H. Race identification in powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) on melon (*Cucumis melo*) in Japan. *Plant Breeding*, Berlin, v. 118, p. 259-262, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS . Estatísticas. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br/x-es/f-esta.html>>. Acesso em: 30 ago. 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção agrícola. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br/cgi-bim/v/m/pamltap> Acesso em: 30 ago. 2006.

_____. Produção agrícola municipal. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 02 fev. 2007.

JAGGER, I.C.; WHITAKER, T.W.; PORTER, D.R. Inheritance on *Cucumis melo* of resistance to powdery mildew (*Erysiphe cichoracearum*). *Phytopathology*, Saint Paul, v. 28, p. 761, 1938.

KATZIR, N.; COHEN, R.; GREENBERG, R.; SHRAIBER, S.; TZURI, G.; BEN-ZEEV, I. S.; YARDEN, O. Variability among Israeli isolates of *Sphaerotheca fuliginea*: Virulence races, DNA polymorphism, and fatty acid profiles. Curcubit Genetics Cooperative Report, Raleigh, v. 23, p. 30-31, 2000.

KIRKBRIDE, J.H. Biosystematic monograph of the genus *Cucumis* (Cucurbitaceae). North Carolina : Parkway, Boone, 1993. 159p.

KŘÍSTKOVÁ, E., LEBEDA, A. *Citrullus lanatus* – a potential host of powdery mildew in the Czech Republic. Cucurbit Genetics Cooperative Report, Raleigh, v. 23, p. 46– 48, 2000.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das cucurbitáceas (abóbora, abobrinha, chuchu, melancia, melão, moranga, pepino). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. Manual de fitopatologia. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 293-302.

LEUS, L.; DEWITTE, A.; VAN HUYLENBROECK, J.; VANHOUTTE, N.; VAN BOCKSTAELE, E.; HÖFTE, M. *Podosphaera pannosa* (syn. *Sphaerotheca pannosa*) on *Rosa* and *Prunus* spp.: Characterization of pathotypes by differential plant reactions and ITS sequences. Journal of Phytopathology, Berlin, v. 154, p. 23-28, 2006.

MCCREIGHT, J.D. Melon-powdery mildew interactions reveal variation in melon cultigens and *Podosphaera xanthii* races 1 and 2. Journal of American Society Horticultural Science, Alexandria, v.131, n.1, p.59-65, 2006.

MOHAMED, Y.F.; BARDIN, M.; NICOT, P.C.; PITRAT, M. Causal agents of powdery mildew of cucurbits in Sudan. Plant Disease, St. Paul, v. 79, p. 634–636, 1995.

PAIVA, W.O.; QUEIRÓZ, M.A. Origem, evolução e classificação botânica. In: SILVA, H.R.; COSTA, N.D. (Ed.). Melão: produção aspectos técnicos. Brasília: EMBRAPA, 2003. cap. 3, p. 19 -21.

PEARL-TREVES, R.; STEPANSKY, A.; SCHAFFER, A. A.; KOVALSKY, I. Intraespecific classification of *Cucumis melo*: how is the morphological and biochemical variation of melons reflected at the DNA level? In: MCCREIGHT, J.D. (Ed.). Cucurbitaceae'98: evaluation and enhancement of cucurbit germoplasm. Alexandria: ISHS Press, 1998. p. 310-319.

PINO, D.; OLLALA, L.; PEREZ-GARCIA, A.; RIVERA, M.E.; GARCIA, S.; MORENO, R.; VICENTE, A.; TORES, J.A. Occurrence of races and pathotypes of cucurbits powdery mildew in Southeastern Spain. Phytoparasitica, Bet Dagan ,v. 30, n. 5, p. 459-466, 2002.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; BOITEUX, L.S.; OCCHIENA, E.M. Powdery mildew on melon (*Cucumis melo*) caused by *Sphaerotheca fuliginea* in Brazil. Plant Disease, St. Paul, v.69, n.12, p.1069-1070, 1985.

ROBINSON, R.W.; DECKER-WALTERS, D.S. Cucurbits. Cambridge: CAB International, 1997. 226 p.

ROHLF, F.J. NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.02i (software). New York: Stone Brook, 2000.

SAENZ, G.S.; TAYLOR, J.W. Phylogeny of the Erysiphales (powdery mildews) inferred from internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences. Canadian Journal of Botany, Ottawa, v. 77, p. 150–168, 1999.

SILVA, H.R.; COSTA, N.D. Introdução. In: SILVA, H.R.; COSTA, N.D. (Ed.). Melão: produção aspectos técnicos. Brasília: EMBRAPA, 2003. cap. 1, p. 13-14.

SITTERLY, W.R. The powdery mildews of cucurbits. In: SPENCER, D. (Ed). The powdery mildews. London: Academic Press, 1978. p. 359–379.

STADNIK, M.J.; RIVERA, M.C. Oídios. Jaguariúna : Embrapa Meio Ambiente, 2001. 484 p.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, Chicago, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAVARES, S. C. C. H.; CRUZ, S. C.; MENEZES, W. A. BIOMIX – Biofungicida na agricultura orgânica em região semi-árida do Vale do São Francisco. Fitopatologia Brasileira, Fortaleza, v.24, n.542, p.336, 1999. Resumo.

TAVARES, S.C.C.H. Melão: fitossanidade. Brasília: EMBRAPA, 2002. 87 p.

THOMAS, C.E.; KISHABA, N.A.; MCCREIGHT, J.D.; NUGENT, P.E. The importance of monitoring races of powdery mildew on muskmelon. Cucurbit Genetics Cooperative Report, Raleigh, v. 7, p. 58 – 59, 1984.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAC, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, Oxford, v. 24, p. 4876–4882, 1997.

URBANIETZ, A.; DUNEMANN, F. Isolation, identification and molecular characterization of physiological races of apple powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*). Plant Pathology, Oxford, v. 54, p. 125-133, 2005.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.D.; LEE, S.; TAYLOR, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315–332.

ZHIHAO, X.; WEILIN, S.; KAIMEI, H.; SHENGJUN, Z. Determination of physiological race of powdery mildew and its virulence to different melon genotypes. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, Zhejiang, v.11, n. 5, p. 1-5, 1999.

ANEXOS

ANEXO A – Dados obtidos a partir da visualização de gel com as combinações de iniciadores utilizadas

(continua)

		Isolados																			
		W	4		4	W					W	4	4	4	4	3	4	3		4	4
		M	8	P	3	8	N	M	W	3	M	8	8	8	8	7	8	7		8	8
		N	7	E	5	3	1	N	N	2	5	2	1	3	2	2	1	0	3	4	7
		9.	1-	T	8	-	1.	5.	5.	6	1	7.	-	-	-	-	-	-	7	-	1-
		1	1	1	4	2	1	6	7	5	0	2	2	2	1	1	2	3	3	1	2
B a n d a s	E7M6 83	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	E7M6 88	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	E7M6 91	1	1	1	0	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1
	E7M6 93	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	9	0	1	1	0	0	0	1	1	0
	E7M6 97	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
	E7M6 98	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	E7M6 112	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0
	E7M6 113	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	9	1	0	0
	E7M6 121	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1
	E7M6 142	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	E7M6 143	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	E7M6 144	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	E7M6 158	0	0	0	1	1	0	1	9	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E7M6 164	0	1	1	1	0	9	9	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	9	9
	E7M6 166	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	9	0
	E7M6 192	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	E7M6 198	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	E7M6 201	1	0	0	9	0	9	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
	E7M6 210	1	0	1	0	0	9	0	0	1	1	1	0	0	1	9	9	9	1	0	0
	E7M6 260	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	9	0	1	1	0	0	0
	E7M6 312	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0

ANEXO A – Dados obtidos a partir da visualização de gel com as combinações de iniciadores utilizadas

(continuação)

Isolados																						
	W	4			4	W					W	4	4	4	4	3	4	3		4	4	4
	M	8			8	M	W	W			M	8	8	8	8	7	8	7		8	8	8
	N	7	P	3	4	N	M	M	3	3	M	4	4	4	4	1	7	1	3	4	7	4
	9.	1	E	5	3	1	N	N	2	5	N	2	1	3	2	2	1	0	3	0	1	1
	1	-	T	8	-	1.	5.	5.	6	1	7.	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-
	1	1	1	4	2	1	6	7	5	0	2	2	2	1	1	2	3	3	1	2	2	1
	1	1	1	4	2	1	6	7	5	0	2	2	2	1	1	2	3	3	1	2	2	1
E7M6																						
328	0	9	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
E7M6																						
332	1	0	0	9	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
E7M6																						
351	0	0	0	9	9	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	
E7M6																						
367	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	9	0	
E7M6																						
368	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
E8M7																						
71	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	
E8M7																						
78	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
E8M7																						
79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
E8M7																						
79,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
E8M7																						
111	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	
E8M7																						
113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
E8M7																						
115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
E8M7																						
124	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
E8M7																						
140	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
E8M7																						
145	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	
E8M7																						
159	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
E8M7																						
161	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
E8M7																						
163	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	
E8M7																						
183	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	
E8M7																						
230	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	
E8M7																						
241	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	

ANEXO A – Dados obtidos a partir da visualização de gel com as combinações de iniciadores utilizadas

(continuação)

		Isolados																					
		4		4	W						4	4	4	4	3	4	3		4	4	4		
		W	8		8	M	W	W			W	8	8	8	8	7	8	7		8	8	8	
		M	7	P	3	4	N	M	M	3	3	M	4	4	4	4	1	7	1	3	4	7	4
		N	1	E	5	3	1	N	N	2	5	N	2	1	3	2	2	1	0	3	0	1	1
		9.	-	T	8	-	1.	5.	5.	6	1	7.	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-
		1	1	1	4	2	1	6	7	5	0	2	2	2	1	1	2	3	3	1	2	2	1
B a n d a s	E8M72																						
	43	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	9	1	1	1
	E8M7																						
	365	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	E8M7																						
	408	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	E8M7																						
	439	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	E8M7																						
	672	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
	E8M7																						
	695	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
	E8M7																						
	730	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	E8M7																						
	794	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	E7M9																						
	72,6	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
	E7M9																						
	73,6	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
	E7M9																						
	75,9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1
	E7M9																						
	76,1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
	E7M9																						
	76,4	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	9
	E7M9																						
	76,8	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
	E7M9																						
	79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
	E7M9																						
	79,8	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E7M9																						
	82	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
	E7M9																						
	83	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
E7M9																							
86	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
E7M9																							
87	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
E7M9																							
88	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	

ANEXO A – Dados obtidos a partir da visualização de gel com as combinações de iniciadores utilizadas

(continuação)

		Isolados																					
		4		4	W						4	4	4	4	3	4	3		4	4	4		
		W	8		8	M	W	W			W	8	8	8	8	7	8	7		8	8	8	
		M	7	P	3	4	N	M	M	3	3	M	4	4	4	4	1	7	1	3	4	7	4
		N	1	E	5	3	1	N	N	2	5	N	2	1	3	2	2	1	0	3	0	1	1
		9.	-	T	8	-	1.	5.	5.	6	1	7.	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-
		1	1	1	4	2	1	6	7	5	0	2	2	2	1	1	2	3	3	1	2	2	1
B a n d a s	E7M9 89	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0
	E7M9 89,7	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	E7M9 100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
	E7M9 106	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	E7M9 122	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9
	E7M9 174	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0
	E7M9 191	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E7M9 193	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	9	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	E7M9 206	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	9	1	9	0
	E7M9 209	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	9	1	9	0
	E7M9 211	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
	E7M9 219	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
	E7M9 220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	E7M9 223	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	E7M9 283	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E7M9 296	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E7M9 303	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E7M9 345,6	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E7M9 346,9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E7M9 378	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0

ANEXO A – Dados obtidos a partir da visualização de gel com as combinações de iniciadores utilizadas

(conclusão)

		Isolados																				
B a n d a s		4			4	W						4	4	4	4	3	4	3		4	4	4
	W	8			8	M	W	W			W	8	8	8	8	7	8	7		8	8	8
	M	7	P	3	4	N	M	M	3	3	M	4	4	4	4	1	7	1	3	4	7	4
	N	1	E	5	3	1	N	N	2	5	N	2	1	3	2	2	1	0	3	0	1	1
	9.	-	T	8	-	1.	5.	5.	6	1	7.	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-
	1	1	1	4	2	1	6	7	5	0	2	2	2	1	1	2	3	3	1	2	2	1
E7M9																						
388	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
E7M9																						
406	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E7M9																						
409	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0
E7M9																						
432	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
E7M9																						
439	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
E7M9																						
470	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
E7M9																						
474	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E7M9																						
488	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
E7M9																						
493	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1=presença de banda; 0=ausência de banda; 9=banda fantasma

ANEXO B – Sequências da região ITS 5.8S do rDNA obtidas com os isolados de
Podosphaera xanthii aqui estudados

(continua)

Isolado	Seqüência
3265	ATTACTGAGCGCGAGGCCCGCAGCGCGCACGCGCTGCGGCGGTTGA CCCTCCACCCGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCG ACCTGCCGGCTCCGGCTGGCGAGTGCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCG TGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAAATGTGGAATTAGTAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAGAACAC CCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTCGGCGGGCCCCTA AACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTAGTCATGTATCTCGCG ACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCAGTCTTTGGATGACCTC GGA
3371	ATTACTGAGCGCGAGGCCCGCAGCGCGCACGCGCTGCGGCGGTTGA CCCTCCACCCGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCG ACCTGCCGGCTCCGGCTGGCGAGTGCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCG TGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAAATGTGGAATTAGTAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAGAACAC CCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTCGGCGGGCCCCTA AACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTAGTCATGTATCTCGCG ACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCAGTCTTTGGATGACCTC GGA
3584	ATTACTGAGCGCGAGGCCCGCAGCGCGCACGCGCTGCGGCGGTTGA CCCTCCACCCGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCG ACCTGCCGGCTCCGGCTGGCGAGTGCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCG TGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAAATGTGGAATTAGTAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA

ANEXO B – Sequências da região ITS 5.8S do rDNA obtidas com os isolados de
Podosphaera xanthii aqui estudados

(continuação)

Isolado	Seqüência
	GTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAGAACAC CCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTCGGCGGCCCTA AACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTAGTCATGTATCTCGCG ACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCAGTCTTTGGATGACCTC GGA
3710-3	ATTACTGAGCGCGAGGCCCGCAGCGCGCACGCGCTGCGGCGGTTGA CCCTCCACCCGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCG ACCTGCCGGCTCCGGCTGGCGAGTGCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCG TGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAAATGTGGAATTAGTAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAGAACAC CCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTCGGCGGCCCTA AACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTAGTCATGTATCTCGCG ACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCAGTCTTTGGATGACCTC GGA
3712-2	ATTACTGAGCGCGAGGCCCGCAGCGCGCACGCGCTGCGGCGGTTGA CCCTCCACCCGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCG ACCTGCCGGCTCCGGCTGGCGAGTGCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCG TGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAAATGTGGAATTAGTAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAGAACAC CCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTCGGCGGCCCTA AACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTAGTCATGTATCTCGCG ACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCAGTCTTTGGATGACCTC GGA

ANEXO B – Sequências da região ITS 5.8S do rDNA obtidas com os isolados de
Podosphaera xanthii aqui estudados

(continuação)

Isolado	Seqüência
4840-2	ATTACTGAGCGCGAGGCCCGCAGCGCGCACGCGCTGCGGCGGTTGA CCCTCCACCCGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCG ACCTGCCGGCTCCGGCTGGCGAGTGCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCG TGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAAATGTGGAATTAGTAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAGAACAC CCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTCGGCGGGCCCCTA AACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTAGTCATGTATCTCGCG ACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCCACTCTTTGGATGACCTC GGA
4841-2	ATTACTGAGCGCGAGGCCCGCAGCGCGCACGCGCTGCGGCGGTTGA CCCTCCACCCGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCG ACCTGCCGGCTCCGGCTGGCGAGTGCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCG TGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAAATGTGGAATTAGTAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAGAACAC CCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTCGGCGGGCCCCTA AACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTAGTCATGTATCTCGCG ACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCCACTCTTTGGATGACCTC GGA
4842-1	ATTACTGAGCGCGAGGCCCGCAGCGCGCACGCGCTGCGGCGGTTGA CCCTCCACCCGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCG ACCTGCCGGCTCCGGCTGGCGAGTGCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCG TGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAAATGTGGAATTAGTAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA

ANEXO B – Sequências da região ITS 5.8S do rDNA obtidas com os isolados de
Podosphaera xanthii aqui estudados

(continuação)

Isolado	Seqüência
	GTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAGAACAC CCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTCGGCGGCCCTA AACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTAGTCATGTATCTCGCG ACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCAGTCTTTGGATGACCTC GGA
4871-1	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTGCGGCGGTTGA CCCTCCACCCGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCG ACCTGCCGGCTCCGGCTGGCGAGTGCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCG TGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAAATGTGGAATTAGTAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAGAACAC CCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTCGGCGGCCCTA AACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTAGTCATGTATCTCGCG ACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCAGTCTTTGGATGACCTC GGA
4871-2	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTGCGGCGGTTGA CCCTCCACCCGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCG ACCTGCCGGCTCCGGCTGGCGAGTGCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCG TGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAAATGTGGAATTAGTAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAGAACAC CCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTCGGCGGCCCTA AACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTAGTCATGTATCTCGCG ACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCAGTCTTTGGATGACCTC GGA

ANEXO B – Sequências da região ITS 5.8S do rDNA obtidas com os isolados de
Podosphaera xanthii aqui estudados

(continuação)

Isolado	Sequência
PET1	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTGCGGCGGTTGA CCCTCCACCCGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCG ACCTGCCGGCTCCGGCTGGCGAGTGCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCG TGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAAATGTGGAATTAGTAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAGAACAC CCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTCGGCGGGCCCCTA AACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTAGTCATGTATCTCGCG ACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCAGTCTTTGGATGACCTC GGA
WMN_1 1.1	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTGCGGCGGTTGA CCCTCCACCCGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCG ACCTGCCGGCTCCGGCTGGCGAGTGCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCG TGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAAATGTGGAATTAGTAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAGAACAC CCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTCGGCGGGCCCCTA AACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTAGTCATGTATCTCGCG ACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCAGTCTTTGGATGACCTC GGA
WMN_5 .7	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTGCGGCGGTTGA CCCTCCACCCGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCG

ANEXO B – Sequências da região ITS 5.8S do rDNA obtidas com os isolados de
Podosphaera xanthii aqui estudados

(continuação)

Isolado	Sequência
	ACCTGCCGGCTCCGGCTGGCGAGTGCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCG TGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAAATGTGGAATTAGTAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAGAACAC CCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTCGGCGGCCCTA AACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTAGTCATGTATCTCGCG ACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCAGTCTTTGGATGACCTC GGA
WMN_7	ATTACTGAGCGCGAGGCCCGCAGCGCGCACGCGCTGCGGCGGTTGA
.2	CCCTCCACCCGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCG ACCTGCCGGCTCCGGCTGGCGAGTGCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCG TGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAAATGTGGAATTAGTAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAGAACAC CCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTCGGCGGCCCTA AACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTAGTCATGTATCTCGCG ACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCAGTCTTTGGATGACCTC GGA
WMN_9	ATTACTGAGCGCGAGGCCCGCAGCGCGCACGCGCTGCGGCGGTTGA
.1	CCCTCCACCCGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCG ACCTGCCGGCTCCGGCTGGCGAGTGCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCG TGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAAATGTGGAATTAGTAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAGAACAC CCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTCGGCGGCCCTA

ANEXO B – Sequências da região ITS 5.8S do rDNA obtidas com os isolados de
Podosphaera xanthii aqui estudados

(continuação)

Isolado	Seqüência
	AACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTAGTCATGTATCTCGCG ACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCAGTCTTTGGATGACCTC GGA
3510	ATTACTGAGCGCGAGGCCCGCAGCGCGCACGCGCTGCGGCGGTTGA CCCTCCACCCGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCG ACCTGCCGGCTCCGGCTGGCGAGTGCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCG TGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAAATGTGGAATTAGTAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAGAACAC CCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTCGGCGGGCCCCTA AACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTAGTCATGTATCTCGCG ACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCAGTCTTTGGATGACCTC GGA
4842-2	ATTACTGAGCGCGAGGCCCGCAGCGCGCACGCGCTGCGGCGGTTGA CCCTCCACCCGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCG ACCTGCCGGCTCCGGCTGGCGAGTGCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCG TGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAAATGTGGAATTAGTAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAGAACAC CCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTCGGCGGGCCCCTA AACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTAGTCATGTATCTCGCG ACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCAGTCTTTGGATGACCTC GGA
4841-1	ATTACTGAGCGCGAGGCCCGCAGCGCGCACGCGCTGCGGCGGTTGA CCCTCCACCCGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCG

ANEXO B – Sequências da região ITS 5.8S do rDNA obtidas com os isolados de
Podosphaera xanthii aqui estudados

(conclusão)

Isolado	Seqüência
	ACCTGCCGGCTCCGGCTGGCGAGTGCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCG TGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAAATGTGGAATTAGTAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCAGAACAC CCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTCGGCGGCCCTA AACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTAGTCATGTATCTCGCG ACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCAGTCTTTGGATGACCTC GGA

ANEXO C – Matriz de distâncias dos isolados obtida com o programa NTSYS Pc pelo método UPGMA

Row/Col:	VMM9.1	487 1-1	PET 1	358+	4843-2	VMM 11.1	VMM5.6	VMM5.7	3265	3510	VMM7.2	4842-2	4841-2	4843-1	4842-1	37 12-2	487 1-3	37 10-3	337 1	4840-2	487 1-2	4841-1
VMM9.1	1.0000000																					
487 1-1	0.4791667	1.0000000																				
PET 1	0.5208333	0.642857 1	1.0000000																			
358+	0.3777778	0.3863636	0.4000000	1.0000000																		
4843-2	0.4423077	0.5319149	0.4509804	0.4130435	1.0000000																	
VMM 11.1	0.3720930	0.4615385	0.4500000	0.4000000	0.3863636	1.0000000																
VMM5.6	0.3790000	0.4418605	0.4222222	0.5588235	0.5000000	0.6290000	1.0000000															
VMM5.7	0.3859649	0.4615385	0.4716981	0.4255319	0.5000000	0.3541667	0.4680851	1.0000000														
3265	0.3898305	0.4905960	0.5283019	0.3333333	0.4961404	0.3137255	0.3773585	0.6730769	1.0000000													
3510	0.4533333	0.4583333	0.4025974	0.2972973	0.4729730	0.3098592	0.3698630	0.5200000	0.5394737	1.0000000												
VMM7.2	0.3620690	0.4901961	0.4363636	0.3846154	0.3559322	0.3790000	0.4600000	0.3934425	0.4590164	0.5270270	1.0000000											
4842-2	0.3636364	0.4117647	0.3703704	0.3913043	0.3818182	0.3863636	0.4255319	0.4814815	0.5960377	0.4102564	0.4961404	1.0000000										
4841-2	0.4169667	0.4444444	0.4255319	0.3488372	0.4081633	0.4473684	0.4285714	0.4897959	0.4615385	0.3552632	0.5000000	0.5000000	1.0000000									
4843-1	0.5208333	0.4893617	0.4117647	0.3478261	0.3962264	0.5263158	0.4444444	0.3448276	0.4210525	0.4025974	0.5094340	0.5744681	0.4888889	1.0000000								
4842-1	0.3488372	0.4000000	0.3571429	0.3823529	0.3720930	0.4545455	0.4857143	0.3333333	0.2941176	0.2916967	0.3750000	0.3260870	0.5142857	0.3488372	1.0000000							
37 12-2	0.3617021	0.3777778	0.3404255	0.4210526	0.4347826	0.4722222	0.5000000	0.3725490	0.4117647	0.3378378	0.3921569	0.4347826	0.5128205	0.3695652	0.5454545	1.0000000						
487 1-3	0.3958333	0.4444444	0.4347826	0.3720930	0.5000000	0.4000000	0.4285714	0.4897959	0.5000000	0.3972603	0.4074074	0.5000000	0.4761905	0.3750000	0.3947368	0.5128205	1.0000000					
37 10-3	0.3636364	0.4400000	0.4800000	0.3617021	0.4000000	0.4285714	0.4782609	0.3793103	0.4310345	0.4473684	0.5769231	0.4615385	0.5333333	0.4800000	0.4285714	0.4130435	0.4375000	1.0000000				
337 1	0.4893617	0.4042553	0.4375000	0.3953488	0.3461538	0.5000000	0.5000000	0.3962264	0.4259259	0.3918919	0.4423077	0.5000000	0.4651163	0.4888889	0.3571429	0.3478261	0.4318182	0.4375000	1.0000000			
4840-2	0.3529412	0.4883721	0.5000000	0.4146341	0.3877551	0.4864865	0.5128205	0.5555556	0.4313725	0.4366197	0.3962264	0.5000000	0.4761905	0.4782609	0.4473684	0.3333333	0.4761905	0.5434783	0.4761905	1.0000000		
487 1-2	0.3478261	0.4000000	0.4500000	0.3684211	0.3260870	0.4545455	0.4894595	0.4000000	0.3541667	0.3676471	0.4042553	0.4634146	0.5588235	0.4750000	0.5000000	0.3947368	0.3947368	0.5121951	0.4146341	0.6875000	1.0000000	
4841-1	0.2888889	0.3333333	0.310732	0.3333333	0.2340425	0.3636364	0.3611111	0.3406091	0.3191489	0.2896551	0.3541667	0.4146341	0.4166667	0.4000000	0.4333333	0.4117647	0.3421053	0.4390244	0.3947368	0.5454545	0.6206897	1.0000000

ANEXO D – Alinhamento das seqüências de DNA obtidas no GenBank e de isolados através do programa CLUSTAL

<i>P. clandestina</i>	ATTACTGAGCGTGAAGCCACGTAGGGCGCTTGTCTCTG--CG-CGGCTGACCCTCCA--CC	55
<i>P. spiraeae</i>	ATTACTGAGCGTGAAGCTACGTAGGGCGCTTGTCTCTG--CG-CGGCTGACCCTCCA--CC	55
<i>P. aphanis</i>	ATTACTGAGCGTGAAGCCACGCAGGGCGCCTGTCTCTG--CG-CGGCTGACCCTCCA--CC	55
<i>P. ferruginea</i>	ATTACTGAGCGTGAAGCCACGCAGGGCGCCTGTCTCTG--CG-CGGCTGACCCTCCA--CC	55
<i>P. pannosa</i>	ATTACTGAGCGCGAAGCCACGCAGGACGCTTGTCTCTG--CG-CGGCTGACCCTCCA--CC	55
<i>P. leucotricha</i>	ATTACTGAGCGTGAAGCCACGCAGGACACTCGTTCTG--CG-CGGCTGACCCTCCA--CC	55
3265	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
4841-1	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
3371	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
3584	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
3710-3	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
3712-2	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
4840-2	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
4841-2	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
4842-1	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
4871-1	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
4871-2	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
PET1	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
WMN_11.1	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
WMN_5.7	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
WMN_7.2	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
WMN_9.1	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
4842-2	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
3510	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
<i>P. xanthii</i> AY450961	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
<i>P. balsaminae</i>	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCAAGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
<i>P. fusca</i>	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCAAGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
<i>P. xanthii</i> EU327327	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
<i>P. xanthii</i> EF050036	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCACGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
<i>P. xanthii</i> EU190973	ATTACTGAGCGCGAGGCCCCGCAGCGCGCAAGCGCTG--CGGCGGTTGACCCTCCA--CC	56
<i>P. xanthii</i> AB040326	-----CCA--CC	5
<i>P. tridactyla</i>	AAATTTGAAATCTGGCTCCTTCGGGGCCCGAATTGTAATTTGTAGAAGATGCTTTG--GG	58
<i>P. longiseta</i>	ACCACCAGGAGTGGAGCC--TGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTC	59

ANEXO D – Alinhamento das seqüências de DNA obtidas no GenBank e de isolados através do programa CLUSTAL

<i>P. clandestina</i>	CGTGTGAACTGAT-TTTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-ACCGGCT	105
<i>P. spiraeae</i>	CGTGTGAACTGAT-TTTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-ATCGGCT	105
<i>P. aphanis</i>	CGTGTGAACTGAT-TATGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-ACCGGCT	105
<i>P. ferruginea</i>	CGTGTGAACTGAT-TATGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-ACCGGCT	105
<i>P. pannosa</i>	CGTGTGAACTGAA-TTTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-ACCGGCT	105
<i>P. leucotricha</i>	CGTGTGAACTATT-TGTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-ACCGGCT	105
3265	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
4841-1	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
3371	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
3584	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
3710-3	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
3712-2	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
4840-2	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
4841-2	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
4842-1	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
4871-1	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
4871-2	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
PET1	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
WMN_11.1	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
WMN_5.7	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
WMN_7.2	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
WMN_9.1	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
4842-2	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
3510	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
<i>P. xanthii</i> AY450961	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
<i>P. balsaminae</i>	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
<i>P. fusca</i>	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
<i>P. xanthii</i> EU327327	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
<i>P. xanthii</i> EF050036	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGC-	106
<i>P. xanthii</i> EU190973	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	107
<i>P. xanthii</i> AB040326	CGTGTGAACTCTTATCTGTTGCTTTGG-CGGGCCG-----GGCTCGACCT-GCCGGCT	56
<i>P. tridactyla</i>	TCTG-GGCCTGGCCTAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCGTAGAGGGTGAGAAT-CCC GTAT	116
<i>P. longiseta</i>	CAGACACAATAAGGATTGACAGATTGA--GAGCTCT-----TTCTTGATTTTGTGGGTG	111
	* * * * *	

ANEXO D – Alinhamento das seqüências de DNA obtidas no GenBank e de isolados através do programa CLUSTAL

<i>P. clandestina</i>	CCGGCTGGGGAGTGCCCCGCCAGAGACGCCCCAACTCGTGTCAGTTAGTGCAGTCTGAGAAA	165
<i>P. spiraeae</i>	CCGGCTGGGGAGTGCCCCGCCAGAGAAGCCCCAACTCGTGTCAGTTAGTGCAGTCTGAGAAA	165
<i>P. aphanis</i>	CCGGCTGGGGAGTGCCCCGCCAGAGAAGCCCCAACTCATGTAGTTAGTGCAGTCTGAGAAA	165
<i>P. ferruginea</i>	CCGGCTGGGGAGTGCCCCGCCAGAGAAGCCCCAACTCATGTAGTTAGTGCAGTCTGAGAAA	165
<i>P. pannosa</i>	CCGGCTGGGGAGTGCCCCGCCAGAGAAGCCCCAACTCGTGTCAGTTAGTGCAGTCTGAGAAA	165
<i>P. leucotricha</i>	CCGGCTGGGGAGCGCCCCGCCAGAGAAGCCCCAACTCGTGTCAGTTAGTGCAGTCTGAGTCT	165
3265	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
4841-1	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
3371	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
3584	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
3710-3	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
3712-2	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
4840-2	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
4841-2	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
4842-1	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
4871-1	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
4871-2	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
PET1	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
WMN_11.1	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
WMN_5.7	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
WMN_7.2	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
WMN_9.1	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
4842-2	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
3510	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
<i>P. xanthii</i> AY450961	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
<i>P. balsaminae</i>	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
<i>P. fusca</i>	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
<i>P. xanthii</i> EU327327	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
<i>P. xanthii</i> EF050036	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	166
<i>P. xanthii</i> EU190973	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCGTTAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	167
<i>P. xanthii</i> AB040326	CCGGCTGGCGAGTGCCCCGTCAGAGAAGCCCCAACTCGTGCTGTGAGTGTTGTCTGAGGAA	116
<i>P. tridactyla</i>	GCGGCTGGCGCCCGTGCCCCGTGTAAAGCTCT--TTCAACGAGTC-GAGTTGTTTGGGAAT	173
<i>P. longiseta</i>	GTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAAC	171
	** * * * * * * * *	

ANEXO D – Alinhamento das seqüências de DNA obtidas no GenBank e de isolados através do programa CLUSTAL

<i>P. clandestina</i>	CA----TTTAATAAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	218
<i>P. spiraeae</i>	CA----TTTAATAAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	218
<i>P. aphanis</i>	CA----TTTAATAAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	218
<i>P. ferruginea</i>	AA----CTTAATAAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	218
<i>P. pannosa</i>	AA----CTTAATAAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	218
<i>P. leucotricha</i>	AA----ATTAATAAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	218
3265	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
4841-1	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
3371	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
3584	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
3710-3	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
3712-2	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
4840-2	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
4841-2	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
4842-1	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
4871-1	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
4871-2	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
PET1	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
WMN_11.1	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
WMN_5.7	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
WMN_7.2	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
WMN_9.1	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
4842-2	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
3510	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
<i>P. xanthii</i> AY450961	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
<i>P. balsaminae</i>	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
<i>P. fusca</i>	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
<i>P. xanthii</i> EU327327	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	221
<i>P. xanthii</i> EF050036	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	220
<i>P. xanthii</i> EU190973	ATTTCGTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	224
<i>P. xanthii</i> AB040326	AT---GTGGAATTAGTAA-AACTTTCAACAACGGATC--TCTTGGCTCTGGCATCGATGA	170
<i>P. tridactyla</i>	GCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGC-CAGAGACCGATAG	232
<i>P. longiseta</i>	GAGACCTTAACCTGCTAA--ATAGCCAGGCTAGCTTTGGCTGGTCGCCGGCTTCTTAGA	228
	* * * * *	

ANEXO D – Alinhamento das seqüências de DNA obtidas no GenBank e de isolados através do programa CLUSTAL

<i>P.clandestina</i>	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	270
<i>P.spiraeae</i>	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	270
<i>P.aphanis</i>	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	270
<i>P.ferruginea</i>	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	270
<i>P.pannosa</i>	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	270
<i>P.leucotricha</i>	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	270
3265	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
4841-1	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
3371	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
3584	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
3710-3	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
3712-2	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
4840-2	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
4841-2	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
4842-1	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
4871-1	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
4871-2	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
PET1	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
WMN_11.1	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
WMN_5.7	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
WMN_7.2	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
WMN_9.1	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
4842-2	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
3510	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
<i>P.xanthii</i> AY450961	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
<i>P.balsaminae</i>	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
<i>P.fusca</i>	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
<i>P.xanthii</i> EU327327	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	273
<i>P.xanthii</i> EF050036	AGAAC--GCAG-----CTAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	272
<i>P.xanthii</i> EU190973	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	276
<i>P.xanthii</i> AB040326	AGAAC--GCAG-----CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCA	222
<i>P.tridactyla</i>	CGAACAAGTAGAGTGATCGGAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAG-AGAGTTAAACAGTACG	291
<i>P.longiseta</i>	GGGACTATCGGC---TCAAGCCGATGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCC	284
	* * * * *	

ANEXO D – Alinhamento das seqüências de DNA obtidas no GenBank e de isolados através do programa CLUSTAL

<i>P. clandestina</i>	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	324
<i>P. spiraeae</i>	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	324
<i>P. aphanis</i>	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	324
<i>P. ferruginea</i>	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	324
<i>P. pannosa</i>	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	324
<i>P. leucotricha</i>	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	324
3265	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
4841-1	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
3371	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
3584	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
3710-3	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
3712-2	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
4840-2	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
4841-2	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
4842-1	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
4871-1	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
4871-2	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
PET1	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
WMN_11.1	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
WMN_5.7	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
WMN_7.2	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
WMN_9.1	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
4842-2	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
3510	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
<i>P. xanthii</i> AY450961	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
<i>P. balsaminae</i>	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
<i>P. fusca</i>	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
<i>P. xanthii</i> EU327327	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	327
<i>P. xanthii</i> EF050036	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	326
<i>P. xanthii</i> EU190973	TCGGATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	330
<i>P. xanthii</i> AB040326	TCGAATCTTT-----GAACGCACATTGCGCCCCCGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTT	276
<i>P. tridactyla</i>	TGAAATTGTT-----GAAAGGGAAGCGC-----TGGCAACCAGACTTGGGCGC-TGTT	338
<i>P. longiseta</i>	TTAGATGTTCTGGGCGCGCTACACTGACAGAGCCAACGAGTTTCTTCCTTGTT	344
	* * * * * * * * * * * * * * *	

ANEXO D – Alinhamento das seqüências de DNA obtidas no GenBank e de isolados através do programa CLUSTAL

<i>P. clandestina</i>	CGAGCG--TCAGAACATCCTCTCAAGC-----CTGGCTTGGTCTTGGGGCGCGCCGGCCC	377
<i>P. spiraeae</i>	CGAGCG--TCAGAACATCCTCTCAAGC-----CTGGCTTGGTCTTGGGGCGCGCCGGCTC	377
<i>P. aphanis</i>	CGAGCG--TCAGAACATCCTCTCAAGC-----CTGGCTTGGTCTTGGGGCGCGCCGGTTC	377
<i>P. ferruginea</i>	CGAGCG--TCAGAACATCCTCTCAAGC-----CTGGCTTGGTCTTGGGGCGCGCCGGTTC	377
<i>P. pannosa</i>	CGAGCG--TCAGAACATCCTCTCAAGC-----CTGGCTTGGTCTTGGGGCGCGCCGGCTC	377
<i>P. leucotricha</i>	CGAGCG--TCAGAACATCCTCTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGTGCGCCAGTGT	377
3265	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
4841-1	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
3371	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
3584	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
3710-3	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
3712-2	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
4840-2	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
4841-2	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
4842-1	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
4871-1	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
4871-2	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
PET1	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
WMN_11.1	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
WMN_5.7	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
WMN_7.2	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
WMN_9.1	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
4842-2	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
3510	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
<i>P. xanthii</i> AY450961	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
<i>P. balsaminae</i>	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTGGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
<i>P. fusca</i>	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTGGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
<i>P. xanthii</i> EU327327	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTGGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	379
<i>P. xanthii</i> EF050036	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTGGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	378
<i>P. xanthii</i> EU190973	CGAGCG--TCAGAACCCCC-CTCAAGC-----CTGGCTTGGTGTTGGGGCTCGCCGGCTC	382
<i>P. xanthii</i> AB040326	CGAGCG--TCAGAACACCC-CTCAAGC-----CTAGCTTGGTCTTGGGGCTCGCCGGCTC	328
<i>P. tridactyla</i>	GATCCG--TTAGGGTTCTCCCTAGGGCAC---TCAGCAGTGCGCAGGCCAGCATCGGTTT	393
<i>P. longiseta</i>	CGAAAGATCTGGGTAATCTTGTTAAACTCTGTGCTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTAT	404
	* * * * *	

ANEXO D – Alinhamento das seqüências de DNA obtidas no GenBank e de isolados através do programa CLUSTAL

<i>P. clandestina</i>	GGCGTCCCCTAAACATAGTGGCGGTACCGTTGTGCTCTCCGCGTA-GTCACGTATCTCGC	436
<i>P. spiraeae</i>	GGCGTCCCCTAAACATAGTGGCGGTACCGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCACGTATCTCGC	436
<i>P. aphanis</i>	GGCGTCCCCTAAACATAGTGGCGGTACCGTTGTGCTCTCCGCGTA-GTCACGTATCTCGC	436
<i>P. ferruginea</i>	GGCGTCCCCTAAACACAGTGGCGGTACCGTTGTGCTCTCCGCGTA-GTCACGTATCTCGC	436
<i>P. pannosa</i>	GGCGTCCCCTAAACAGAGTGGCGGTACCGTTGTGCTCTCCGCGTA-GTCACGTATCTCGC	436
<i>P. leucotricha</i>	GGCGTCCCCTAAACATAGTGGCGGTACCGTTGTGCTCTCCGCGTA-GTCACATATCTCGC	436
3265	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
4841-1	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
3371	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
3584	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
3710-3	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
3712-2	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
4840-2	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
4841-2	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
4842-1	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
4871-1	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
4871-2	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
PET1	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
WMN_11.1	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
WMN_5.7	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
WMN_7.2	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
WMN_9.1	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
4842-2	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
3510	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
<i>P. xanthii</i> AY450961	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
<i>P. balsaminae</i>	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGTTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
<i>P. fusca</i>	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGTTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
<i>P. xanthii</i> EU327327	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGTTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	438
<i>P. xanthii</i> EF050036	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGTTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	437
<i>P. xanthii</i> EU190973	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGTTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	441
<i>P. xanthii</i> AB040326	GGCGGCCCCCTAAACGCAGTGGCGGTGCTGGTGTGCTCTCCGCGTA-GTCATGTATCTCGC	387
<i>P. tridactyla</i>	GGGGGGTTGGAGAAAGGCTGGTGG-AATGTAGCTGCCCTCGGGCA-GTGTTATAGCCACT	451
<i>P. longiseta</i>	TGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCGCTGATTACGTCCC	464
	* * * * *	

ANEXO D – Alinhamento das seqüências de DNA obtidas no GenBank e de isolados através do programa CLUSTAL

<i>P. clandestina</i>	GACAGAGTGGCGATGGGACCTGCCAAAACCCACATATTTTTTT-----GGATGACCTCGG	490
<i>P. spiraeae</i>	GACAGAGTGGCGATGGGACCTGCCAAAACCCACATATTTTTTT-----GGATGACCTCGG	490
<i>P. aphanis</i>	GACAGAGTGGCGATGGGACCTGCCAAAACCCACATATTTCTTT-----GGATGACCTCGG	490
<i>P. ferruginea</i>	GACAGAGTGGCGATGGGACCTGCCAAAACCCACATATTTTTTT-----GGATGACCTCGG	490
<i>P. pannosa</i>	GACAGAGTGGCGACGGGACCTGCCAAAACCCACCTATTTTTTTT-----GGATGACCTCGG	491
<i>P. leucotricha</i>	GACAGAGCCACCACGGCACCTGCCAGAATCCCT---TTTTTCAT-----GGATGACCTCGG	488
3265	GACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
4841-1	GACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
3371	GACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
3584	GACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
3710-3	GACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
3712-2	GACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
4840-2	GACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
4841-2	GACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
4842-1	GACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
4871-1	GACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
4871-2	GACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
PET1	GACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
WMN_11.1	GACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
WMN_5.7	GACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
WMN_7.2	GACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
WMN_9.1	GACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
4842-2	GACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
3510	GACAGAGTGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
<i>P. xanthii</i> AY450961	GACAG-----	443
<i>P. balsaminae</i>	GACAGAGCGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
<i>P. fusca</i>	GACAGAGCGGCGACGGCACCCGCCAGAACC--CCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	489
<i>P. xanthii</i> EU327327	GACAGAGCGGCGACGGCACCCGCCAGAACCCTCCAGTCTTT-----GGATGACCTCGG	491
<i>P. xanthii</i> EF050036	GACAG-----	442
<i>P. xanthii</i> EU190973	GACAG-----	446
<i>P. xanthii</i> AB040326	GACAG-----	392
<i>P. tridactyla</i>	GGCGGCATGCAGCCTCCCCGACCGAGGACCGCGCTTCGGCTA-----GGATGCTGGCGT	506
<i>P. longiseta</i>	TGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTAAGTGAGGCTTTTCGG	524

*

ANEXO D – Alinhamento das seqüências de DNA obtidas no GenBank e de isolados através do programa CLUSTAL

<i>P.clandestina</i>	A 491
<i>P.spiraeae</i>	A 491
<i>P.aphanis</i>	A 491
<i>P.ferruginea</i>	A 491
<i>P.pannosa</i>	A 492
<i>P.leucotricha</i>	A 489
3265	A 490
4841-1	A 490
3371	A 490
3584	A 490
3710-3	A 490
3712-2	A 490
4840-2	A 490
4841-2	A 490
4842-1	A 490
4871-1	A 490
4871-2	A 490
PET1	A 490
WMN_11.1	A 490
WMN_5.7	A 490
WMN_7.2	A 490
WMN_9.1	A 490
4842-2	A 490
3510	A 490
<i>P.xanthii</i> AY450961	-
<i>P.balsaminae</i>	A 490
<i>P.fusca</i>	A 490
<i>P.xanthii</i> EU327327	A 492
<i>P.xanthii</i> EF050036	-
<i>P.xanthii</i> EU190973	-
<i>P.xanthii</i> AB040326	-
<i>P.tridactyla</i>	A 507
<i>P.longiseta</i>	A 525