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

**Avaliação de uma região *hotspot* do gene citocromo b para resistência aos fungicidas inibidores da quinona oxidase (QoI) em patógenos de uva
Niágara Rosada**

Nathália de Moraes

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

**Piracicaba
2016**

Nathália de Moraes
Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas

Avaliação de uma região *hotspot* do gene citocromo b para resistência aos fungicidas inibidores da quinona oxidase (QoI) em patógenos de uva Niágara Rosada

Orientadora:
Profa. Dra. **CLAUDIA BARROS MONTEIRO-VITORELLO**

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

Piracicaba
2016

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

Moraes, Nathália de

Avaliação de uma região *hotspot* do gene citocromo b para resistência aos fungicidas inibidores da quinona oxidase (Qol) em patógenos de uva Niágara Rosada / Nathália de Moraes. - - Piracicaba, 2016.

106 p. : il.

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

1. Resistência a fungicidas 2. Mutação no gene *cytB* 3. Antracnose da videira
4. Ferrugem da videira 5. Míldio da videira 6. Evolução da resistência 7. Viticultura paulista 8. *Genome Walking* I. Título

CDD 634.83
M827a

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

Aos meus pais, Adilson e Ana Maria, meus pilares e meu farol durante os 26 anos de minha vida;

Ao meu namorado e melhor amigo Lucas, meu porto seguro, que me faz sempre acreditar que sou capaz.

Dedico

“E o amor (...) é a única bagagem que você pode trazer. O amor (...) é tudo que você não pode deixar para trás”

U2

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ, à Universidade de São Paulo - USP e ao Departamento de Genética - LGN pela estrutura oferecida, pela qualidade de ensino e pelo ambiente engrandecedor ao qual tive contato durante os quase oito anos em que aqui estive presente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de auxílio financeiro (Processo nº 2014/19711-7).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) também pelo suporte financeiro.

Em especial à Professora Claudia Barros Monteiro-Vitorello pelos 7 anos de convivência, pela paciência, orientação, inspiração e suporte. Agradeço imensamente pela oportunidade e por tudo que aprendi profissionalmente e pessoalmente.

À Professora Maria Carolina Quecine-Verdi pelos anos de amizade e por ser sempre prestativa em me ajudar.

À Professora Lilian Amorim pela oportunidade de fazer parte do projeto temático FAPESP ao qual esse trabalho pertence (Processo nº 2013/24003-9) e aos integrantes de seu grupo pela ajuda durante a realização do trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Genética pela prestatividade, em especial ao Fernando Leopoldino.

Aos técnicos de laboratório Ana, Gorga e Elaine pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amigos do Genomics Group pelos anos de convivência e amizade e pelos momentos de descontração e alegrias, em especial Patricia, Juliana, Leila, Natália, Sintia e Mariana.

Aos meus amigos Gislaine, Daniel e Leandro pelos momentos sempre agradáveis, saudosos e divertidos que passamos juntos.

Às minhas irmãs de coração, Rafaella e Lívia, com as quais tive o prazer de conviver por quase 7 anos e que se tornaram parte desse capítulo da minha vida; obrigada pelos momentos de felicidade e por terem me apoiado nas horas difíceis.

Ao meu melhor amigo e namorado Lucas por todo amor, carinho, disposição em me ajudar e por ter me passado confiança mesmo nos momentos em que eu não acreditava mais. Obrigada também pelos momentos de descontração e alegria ao seu lado.

Aos meus pais, Adilson e Ana Maria, por serem simplesmente TUDO em minha vida.

A todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho e principalmente à Deus, por ter me dado a oportunidade de conhecer todas essas pessoas cheias de luz e por ter me guiado e protegido durante a caminhada da vida.

“Life is either a daring adventure or nothing”

Helen Keller

“One, remember to look up at the stars and not down at your feet. Two, never give up work. Work gives you meaning and purpose and life is empty without it. Three, if you are lucky enough to find love, remember it is there and don't throw it away.”

Stephen Hawking

“Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist. Be curious, and however difficult life may seem, there is always something you can do, and succeed at. It matters that you don't just give up.”

Stephen Hawking

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	21
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 A uva e o panorama mundial do cultivo da videira.....	25
2.2 A uva no Brasil e o panorama do cultivo da videira no estado de São Paulo.....	27
2.3 A antracnose da videira.....	29
2.4 O míldio da videira.....	31
2.5 A ferrugem da videira.....	34
2.6 Controle das doenças antracnose, míldio e ferrugem: os fungicidas do tipo QoI.....	37
2.7 Resistência dos fitopatógenos aos fungicidas do tipo QoI.....	39
2.8 O gene <i>cytB</i> e o estabelecimento das mutações aos fungicidas do tipo QoI.....	40
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	45
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 Local de desenvolvimento dos experimentos.....	47
4.2 Coleta e isolamento do material biológico.....	47
4.3 Cultivo e manutenção dos isolados.....	50
4.4 Extração de DNA total.....	51
4.4.1 Extração de DNA total de <i>S. ampelinum</i>	51
4.4.2 Extração de DNA total de <i>P. viticola</i> e <i>P. euvitis</i>	52
4.5 Desenho de <i>primers</i> para amplificação da região <i>hotspot</i>	53
4.5.1 Desenho de <i>primers</i> para amplificação da região <i>hotspot</i> em <i>S. ampelinum</i>	53
4.5.2 <i>Primers</i> para amplificação da região <i>hotspot</i> em <i>P. viticola</i>	56
4.5.3 Desenho de <i>primers</i> para amplificação da região <i>hotspot</i> em <i>P. euvitis</i>	57
4.6 Amplificação e sequenciamento da região <i>hotspot</i> do gene <i>cytB</i>	57
4.6.1 Amplificação da região <i>hotspot</i> do gene <i>cytB</i> em <i>S. ampelinum</i>	57
4.6.2 Amplificação da região <i>hotspot</i> do gene <i>cytB</i> em <i>P. viticola</i>	57
4.6.3 Amplificação da região <i>hotspot</i> do gene <i>cytB</i> em <i>P. euvitis</i>	58
4.6.4 Sequenciamento da região <i>hotspot</i> do gene <i>cytB</i>	58
4.7 Caracterização da região <i>hotspot</i> do gene <i>cytB</i>	58

4.7.1 Caracterização da região <i>hotspot</i> do gene <i>cytB</i> em <i>P. viticola</i>	58
4.7.2 Caracterização da região <i>hotspot</i> do gene <i>cytB</i> em <i>P. euvitis</i>	59
4.8 O sequenciamento do gene <i>cytB</i>	60
4.8.1 O sequenciamento do gene <i>cytB</i> em <i>S. ampelinum</i>	60
4.8.2 O sequenciamento do gene <i>cytB</i> em <i>P. viticola</i>	62
4.8.3 O sequenciamento do gene <i>cytB</i> em <i>P. euvitis</i>	62
5 RESULTADOS	65
5.1 Caracterização da região <i>hotspot</i> do gene <i>cytB</i>	65
5.1.1 <i>S. ampelinum</i>	65
5.1.1.1 Extração de DNA total.....	65
5.1.1.2 <i>Primers</i> para amplificar a região <i>hotspot</i>	65
5.1.1.3 Amplificação e sequenciamento da região <i>hotspot</i> do gene <i>cytB</i>	66
5.1.2 <i>P. viticola</i>	67
5.1.2.1 Extração de DNA total.....	67
5.1.2.2 Amplificação e sequenciamento da região <i>hotspot</i> do gene <i>cytB</i>	67
5.1.2.3 Caracterização da região <i>hotspot</i> do gene <i>cytB</i>	71
5.1.3 <i>P. euvitis</i>	73
5.1.3.1 Extração de DNA total.....	73
5.1.3.2 <i>Primers</i> para amplificar a região <i>hotspot</i>	74
5.1.3.3 Amplificação e sequenciamento da região <i>hotspot</i> do gene <i>cytB</i>	75
5.1.3.4 Caracterização da região <i>hotspot</i> do gene <i>cytB</i>	77
5.2 O sequenciamento do gene <i>cytB</i>	78
5.2.1 <i>S. ampelinum</i>	78
5.2.2. <i>P. viticola</i>	80
5.2.3 <i>P. euvitis</i>	82
6 DISCUSSÃO.....	85
7 CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS.....	93
APÊNDICE.....	105

RESUMO

Avaliação de uma região *hotspot* do gene citocromo b para resistência aos fungicidas inibidores da quinona oxidase (QoI) em patógenos de uva Niágara Rosada

A videira é uma das plantas mais antigas cultivadas pela humanidade, sendo que no Brasil a uva é a terceira fruta com maior volume de produção, atrás apenas do cultivo das bananas e das laranjas. Apesar da produção rentável, principalmente aos pequenos produtores, o parreiral é susceptível a várias doenças cujo manejo compromete até 59% dos gastos do produtor. No estado de São Paulo, dentre as doenças, três têm destaque: a antracnose (causada pelo *Sphaceloma ampelinum*), o míldio da videira (causado pelo *Plasmopara viticola*) e a ferrugem (causada pelo *Phakopsora euvtis*). Os produtores utilizam controle químico de forma intensa e preventiva, chegando a 100 aplicações de fungicidas em um ciclo de até 120 dias. Os principais fungicidas utilizados são os inibidores da quinona oxidase (QoI), que agem impedindo o transporte de elétrons do citocromo b ao citocromo c1 na cadeia respiratória da mitocôndria. Porém, existem relatos de resistência ao fungicida aplicado no campo em diversos países. As substituições G143A, G137R e F129L na sequência da proteína citocromo b impedem que o fungicida se ligue ao seu sítio alvo. As mutações que levam às substituições estão localizadas em uma das regiões chamada *hotspot* do gene citocromo b (*cytB*). Visto que, pela carência de estudos, a resistência genética a esses fungicidas nunca foi relatada no Brasil, o objetivo principal desse trabalho foi sequenciar e caracterizar a região *hotspot* em isolados de míldio, ferrugem e antracnose provenientes de parreirais do estado de São Paulo. Foram selecionados 35 isolados de 11 locais diferentes; desses, 11 isolados de míldio foram considerados geneticamente resistentes, pois apresentam a mutação para o resíduo alanina na posição 143, e 4 isolados foram considerados geneticamente sensíveis. Os dois isolados de ferrugem selecionados também foram considerados geneticamente sensíveis. Pela estratégia de *Genome Walking* foi possível sequenciar 65% do gene *cytB* de um dos isolados brasileiros de *P. viticola*; foram encontrados poucos polimorfismos e nenhum íntron na sequência analisada. Os resultados obtidos com esse estudo podem servir de suporte para a tomada de decisões de manejo mais adequadas para a realidade da viticultura brasileira; além disso, são importantes para futuros estudos sobre a evolução do patógeno com a pressão seletiva exercida pelos fungicidas.

Palavras-chave: Resistência a fungicidas; Mutação no gene *cytB*; Antracnose da videira; Ferrugem da videira; Míldio da videira; Evolução da resistência; Viticultura paulista; *Genome Walking*

ABSTRACT

Evaluating a hotspot region of the cytochrome b gene related to the resistance to quinone oxidase inhibitor (QoI) fungicides in pathogens of Niagara Rosada grapevine

Grapevine is one of the most ancient cultivated plants and its fruit, grape, is notably important in Brazil, since it is the third most produced, only behind banana and citrus. Although it is rentable especially to smallholders, the vineyard is often attacked by several pathogens and the damages induced by them can compromise up to 59% of the producers' expenses in order to keep the diseases under control. In Sao Paulo state there are three important diseases that attack vineyards: anthracnose (caused by *Sphaceloma ampelinum*), downy mildew (caused by *Plasmopara viticola*) and rust (caused by *Phakopsora euvitis*). Pest management practices used by the producers relies on intensive and preventive use of fungicides, in which the culture is sprayed 100 times per vineyard's growth cycle (that last approximately 120 days). One of the most used fungicides are the quinone oxidase inhibitors (QoI), that act by blocking the electron transport chain at the mitochondria binding at the Qo site of the cytochrome b (*cytB*) complex. However, there are several reports of the presence of resistant strains in different countries. Resistance is caused by the aminoacids substitutions F129L, G137R and G143A in the cytochrome b protein sequence, that prevent the fungicide molecule binding to its target site. The mutations in the *cytB* gene that lead to these substitutions are harbored in a region called hotspot for fungicide resistance. Since this type of study was never reported in Brazil, the main purpose of this work was to sequence and characterize the hotspot region of different isolates from anthracnose, downy mildew and rust. Thirty five isolates from eleven different locations were chosen for the study. Eleven of them harbored the mutation that lead to the substitution G143A; these were then considered genetically resistant to the QoI fungicides. On the contrary, four downy mildew and the two rust isolates were considered sensitive to the QoI fungicides, since none of the aminoacids substitutions were observed. Also, by using a technique named Genome Walking it was possible to sequence 65% of *cytB* gene from a Brazilian downy mildew isolate. In this sequence were found few polymorphisms and none intron. These study findings are unique for Brazilian isolates and might be useful to provide reliable support for the pest management decisions regarding the reality that is found at the vineyards in Brazil. Furthermore, the results presented here are important to the comprehension of pathogen's evolution when suffering from a selective pressure caused by the intensive use of fungicides.

Keywords: Fungicide resistance; *cytB* gene mutations; Anthracnose; Downy mildew; Rust; Fungicide's resistance establishment; Sao Paulo viticulture; Genome Walking

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sintomas característicos da antracnose da videira. (a) – lesões de cor marrom nas folhas e buracos (indicados pelos círculos pretos) que surgem após a queda do tecido infectado. (b) – lesões em um ramo da videira. (c) - lesões de borda preta nas bagas, sintoma conhecido como “olho de passarinho”. Fonte: adaptado de Pearson e Goheen (1988).....30
- Figura 2 - Sintomas característicos do míldio da videira. (a) - folha de videira com o sintoma chamado “mancha de óleo” (seta vermelha). (b) - detalhe do sintoma chamado “mancha- mofo” ou “mancha branca” (seta vermelha) formado pelas estruturas de *P. viticola*. (c) necrosamento das áreas atingidas na folha pela doença. (d) - as bagas atacadas pelo patógeno ficam menores, com cor escura e com a casca endurecida. Fonte: (c) e (b) autoria própria (2014); (a) e (d) Garrido e Sônego (2003).....32
- Figura 3 – Sintomas característicos da ferrugem da videira. (a) – pústulas amareladas na superfície abaxial da folha. (b) - manchas necróticas formadas na superfície adaxial das folhas. Fonte: (a) autoria própria (2015); (b) Sônego, Garrido e Gava (2005).....35
- Figura 4 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura - MEV das urédias e urediniósporos de *P. euvitidis* em folha de *V. labrusca*. (a) – urediniósporos (seta). (b) – detalhe do urediniósporo e suas ornamentações de parede (seta). (c) – detalhe das paráfises cilíndricas que formam a urédia. (d) – urédia a partir de onde saem urediniósporos (círculo). (a), (b): fixação por vapor de tetróxido de ósmio; (c), (d): fixação por Karnovsky seguida de criofratura com nitrogênio líquido. Todas as micrografias são de autoria própria (2015) e foram obtidas no Laboratório do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica - NAP/MEP – ESALQ/USP com o microscópio LEO 435 VP.....36
- Figura 5 – Esquema simplificado ilustrando a cadeia transportadora de elétrons e a formação de ATP na célula. I, II, III e IV são complexos proteicos presentes na membrana interna da mitocôndria através dos quais os elétrons - representados pelas setas pretas - são transportados com a ajuda de carregadores. O transporte dos íons H^+ através da ATP sintase promove a síntese de ATP na célula. Os fungicidas do tipo QoI agem ao se ligar ao sítio Qo do complexo proteico III, no qual está o citocromo

b. Q = ubiquinona, C = citocromo c. Fonte: adaptado de Ow et al. (2008) e Fernández-Ortuño et al. (2010).....38

Figura 6 – Impacto da presença ou ausência de um íntron no estabelecimento da substituição G143A. Nas espécies em que não existe o íntron após a trinca para o aminoácido 143 ou ele está mais *downstream* é possível o estabelecimento da mutação que leva à substituição de glicina por alanina, pois a mudança não implica em erro durante o *splicing*. Contrariamente, nas espécies em que o íntron é imediatamente após, não é possível o estabelecimento da mutação, pois ocorreria um erro no *splicing*.....41

Figura 7– Cidades de SP, RS e BA das quais foram coletados os materiais com antracnose, míldio e ferrugem usados no estudo.....49

Figura 8 – Material biológico utilizado no estudo. (a) – disco foliar de videira com sintomas de míldio. (b) – folha destacada de videira com sintomas de ferrugem. (c) – detalhe de *S. ampelinum* crescendo em meio sólido YM após aproximadamente 10 dias.....50

Figura 9 - Esquema representando o alinhamento das CDSs do gene *cytB*. Com base no alinhamento foi possível desenhar três *primers* degenerados (PDSF1, PDSF2 e PDSR1) para amplificar parte do gene *cytB* em *S. ampelinum*.....55

Figura 10 – Esquema resumindo a estratégia de GW utilizada no estudo para sequenciamento de parte do gene *cytB*..... 60

Figura 11 - Mapa de restrição da sequência da mitocôndria de *P. subalpina*. As enzimas *DraI* e *EcoRV* reconhecem muitos sítios na sequência, *StuI* reconhece 4 sítios e *PvuII* apenas dois61

Figura 12 – Gel de eletroforese com amostras de DNA total extraído dos isolados de *S. ampelinum*. Foram carregados 5µL de marcador (M) 1Kb Ladder (Fermentas) e 5µL das amostras de DNA (isolados estão identificados pelos números). Concentração de agarose no gel: 0,8%. Tempo de corrida: 1 hora a 50V. Tampão para corrida: TBE 0,5X.....65

Figura 13 – Posicionamento dos *primers* PDHSF e PHSR desenhados para amplificar a região *hotspot* do gene *cytB* em *S. ampelinum*.....66

Figura 14 – Gel de eletroforese com amostra de DNA total extraído de *P. viticola*. Foram carregados 5µL de marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen) e 3µL da amostra I21 (isolado I21). Concentração de agarose no gel: 0,8%. Tempo de corrida: 1 hora a 50V. Tampão para corrida: TBE 0,5X.....67

- Figura 15 – Gel de eletroforese com amostra amplificada de *P. viticola* (isolado I4). Foram carregados 3µL de marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen) e 4µL da amostra (I4) de *P. viticola* e do controle negativo (-). Concentração de agarose no gel: 1,2%. Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos a 50V. Tampão para corrida: TBE 0,5X.....68
- Figura 16 - Gel de eletroforese com amostra purificada do isolado I4 de *P. viticola*. Foram carregados 4µL de marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen) e 5µL da amostra I4. Concentração de agarose no gel: 1,2%. Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos a 50V. Tampão para corrida: TBE 0,5X.....68
- Figura 17 - Cromatograma da sequência de DNA do isolado I3 de *P. viticola*. A porção mostrada compreende a região da posição 219 a 250 pb do sequenciamento.....69
- Figura 18 – Alinhamento múltiplo das sequências dos isolados de *P. viticola* em estudo mostrando os aminoácidos que ocupam as posições 129, 137 e 143.....71
- Figura 19 - Alinhamento múltiplo das sequências dos isolados de *P. viticola* em estudo mostrando as trincas de bases que ocupam as posições correspondentes aos aminoácidos 129, 137 e 143. É possível verificar na posição 143 a transversão da segunda base da trinca de G para C nos isolados resistentes.....72
- Figura 20 - Gel de eletroforese com amostra de DNA total extraído de *P. euvitis*. Foram carregados 5µL de marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen) e 3µL da amostra de *P. euvitis* (isolados FV1 e FV2). Concentração de agarose no gel: 0,8%. Tempo de corrida: 1 hora a 50V. Tampão para corrida: TBE 0,5X.....74
- Figura 21 – Posicionamento dos *primers* PFFH e PRFH desenhados para amplificar a região *hotspot* do gene *cytB* em *P. euvitis*.....74
- Figura 22 – Gel de eletroforese com amostra amplificada de *P. euvitis*. Foram carregados 3µL de marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen) e 4µL das amostras FV1, FV2 e do controle negativo (-). Concentração de agarose no gel: 1,2%. Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos a 50V. Tampão para corrida: TBE 0,5X.....75
- Figura 23 – Gel de eletroforese com amostra purificada dos isolados FV1 (esquerda) e FV2 (direita) de *P. euvitis*. Foram carregados 4µL de marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen) e 5µL da amostra FV1 e FV2. Concentração de agarose no gel: 1,2%.

Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos a 50V. Tampão para corrida: TBE 0,5X.....75

Figura 24 – Cromatograma da sequência de DNA do isolado FV1 e do isolado FV2 de *P. euvitis*. A parte mostrada para o FV1 compreende a região da posição 201 a 225 pb do sequenciamento, já para o isolado FV2 compreende da posição 172 a 199 pb.....76

Figura 25 - Alinhamento múltiplo com as sequências dos isolados de *P. euvitis* em estudo mostrando os aminoácidos que ocupam as posições 129, 137 e 143.....77

Figura 26 - Alinhamento múltiplo com as sequências dos isolados de *P. euvitis* em estudo mostrando as trincas de bases que ocupam as posições equivalentes aos aminoácidos 129, 137 e 143.....77

Figura 27 - Esquema representando os *primers* utilizados no GW, desenhados com base na sequência parcial do gene *cytB* de *S.ampelinum*.....79

Figura 28 - Gel de eletroforese com a amostra de *S. ampelinum* amplificada pela técnica de GW. Foram carregados 3µL de marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen) e 4µL do produto de PCR (1) e do controle negativo da reação (-). O produto amplificado indicado pela seta foi excisado do gel e purificado. Concentração de agarose no gel: 1,5% Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos a 50V. Tampão de corrida: TBE 0,5X.....79

Figura 29 – Esquema representando os *primers* da estratégia de GW desenhados com base na sequência de parcial do gene *cytB* em *P. viticola*.....80

Figura 30 - Gel de eletroforese com amostra amplificada de *P. viticola* na estratégia de GW. Foram corridos 3µL do marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen), 5µL do controle negativo (-) e das amostras 1 de cada gel. Os *primers* utilizados para as reações estão indicados na figura. Os produtos indicados pelas setas foram purificados e sequenciados. Concentração de agarose no gel: 1,5%. Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos a 40V. Tampão para corrida: TBE 0,5X.....81

Figura 31 - Esquema representando os *primers* da estratégia de GW desenhados com base na sequência de parte do gene *cytB* em *P. euvitis*.....82

Figura 32 - Gel de eletroforese com amostras amplificadas de *P. euvitis* na estratégia de GW (sentido *upstream*). Foram corridos 3µL do marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen), 5µL do controle negativo (-) e das amostras 1 (DNA *template* digerido com *PvuII*)

e 2 (DNA *template* digerido com *StuI*). Concentração de agarose no gel: 1,5%.
 Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos a 40V. Tampão para corrida: TBE
 0,5X.....83

Figura 33 - Gel de eletroforese com amostras amplificadas de *P. euvitis* na estratégia de GW
 (sentido *downstream*). Foram corridos 3µL do marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen),
 5µL do controle negativo (-) e das amostras 1 (DNA *template* digerido com *PvuII*).
 Não é mostrado o gel para o DNA digerido com *StuI*. Concentração de agarose no
 gel: 1,5%. Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos a 40V. Tampão para corrida:
 TBE 0,5X.....84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificador, local de coleta, espécie e de qual órgão foram coletados os materiais biológicos utilizados para o estudo.....	47
Tabela 2 - Número de acesso do <i>GenBank</i> das sequências selecionadas para o alinhamento múltiplo que foram recuperadas do banco de dados MitoFun.....	54
Tabela 3 – <i>Primers</i> degenerados utilizados para amplificação de parte do gene <i>cytB</i> em <i>S.ampelinum</i>	55
Tabela 4 – <i>Primers</i> utilizados para as reações de amplificação da região <i>hotspot</i> em <i>P. viticola</i>	56
Tabela 5 – Posição e os aminoácidos correspondentes buscados nas sequências para determinação do fenótipo dos isolados em estudo.....	59
Tabela 6 - <i>Primers</i> utilizados para a amplificação da região <i>hotspot</i> em <i>S. ampelinum</i>	66
Tabela 7 - Resultados do BLASTN para as sequências obtidas de cada isolado de <i>P. viticola</i> pela amplificação da região <i>hotspot</i>	70
Tabela 8 - Isolado e cidade de origem, a trinca de bases e o aminoácido em cada uma das três posições (considerando a sequência de aminoácidos) e o fenótipo esperado de acordo com a caracterização genética da região <i>hotspot</i>	73
Tabela 9 - <i>Primers</i> utilizados para a amplificação da região <i>hotspot</i> do gene <i>cytB</i> em <i>P. euvitis</i>	74
Tabela 10 – Resultados do BLASTN para as sequências de <i>P. euvitis</i> obtidas na amplificação da região <i>hotspot</i>	76
Tabela 11- Isolado e cidade de origem, a trinca de bases e os aminoácidos em cada uma das três posições (considerando a sequência de aminoácidos) e o fenótipo esperado de acordo com a caracterização genética da região <i>hotspot</i>	78
Tabela 12 - <i>Primers</i> utilizados para amplificação de parte do gene <i>cytB</i> em <i>S. ampelinum</i> através da estratégia de GW.....	78
Tabela 13 - <i>Primers</i> utilizados para amplificação de parte do gene <i>cytB</i> em <i>P. viticola</i> através da estratégia de GW.....	80

Tabela 14 - Polimorfismos observados na sequência de parte do gene <i>cytB</i> de <i>P. viticola</i>	81
Tabela 15 - <i>Primers</i> desenhados para sequenciamento de parte do gene <i>cytB</i> em <i>P. euvitis</i> pela técnica de GW.....	82

1 INTRODUÇÃO

A variedade de uva de mesa Niágara Rosada é muito apreciada pelo mercado consumidor paulista devido ao seu sabor e cor atraentes (CATO et al., 2005; NACHTIGAL, 2003). Além disso, essa variedade de origem americana se caracteriza por ter fácil manejo no campo (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011). No entanto, a ocorrência de doenças como a antracnose, a ferrugem e o míldio durante o seu cultivo é um fator limitante a sua produção, sendo o manejo fitossanitário o maior problema enfrentado na viticultura que é apontado pelos produtores (COSTA; TARSITANO; CONCEIÇÃO, 2012).

A antracnose da videira é uma doença causada pelo ascomiceto *Sphaceloma ampelinum* e se caracteriza pelo aparecimento de lesões marrons com as bordas pretas nos ramos, folhas e frutos da videira (AGRIOS, 2004). A ferrugem é uma doença cujo agente causal também é um fungo, o basidiomiceto *Phakopsora euvitidis*, e que se caracteriza pela presença de pústulas amarelo-alaranjadas na superfície abaxial das folhas; nessas pústulas estão presentes os urediniósporos - esporos assexuados do fungo (PEARSON; GOHEEN, 1988). Já o míldio da videira é uma doença causada pelo oomiceto chamado *Plasmopara viticola*, cujas estruturas reprodutivas de cor branca e aspecto cotonoso surgem na parte inferior da folha, formando os sintomas conhecidos como “mancha-mofo” ou “mancha branca” (HENNING et al., 1997).

Para o controle dessas três doenças os produtores utilizam-se dos fungicidas do tipo inibidores da quinona oxidase (QoI ou IQo) (KUHN et al., 2003). Criados a partir de um metabólito de defesa produzido por algumas espécies de fungos, os fungicidas do tipo QoI agem interrompendo o transporte de elétrons do citocromo b ao citocromo c na cadeia transportadora, pois se ligam ao sítio Qo do complexo proteico III (BARTLETT et al., 2002; FERNANDÉZ-ORTUÑO et al., 2010).

Sabe-se que o uso excessivo dos fungicidas para o controle químico das doenças, que no caso da viticultura chega a 100 aplicações por ciclo (COSTA; TARSITANO; CONCEIÇÃO, 2012), pode acarretar na seleção de patógenos resistentes (BRENT; HOLLOMON, 2007) como já reportado em vários casos, inclusive para isolados europeus de *P. viticola* (CHEN et al., 2007). A resistência a esse tipo de fungicida é causada por mutações pontuais já conhecidas no gene mitocondrial citocromo b (*cytB*) que levam à substituição de alguns aminoácidos em posições específicas na cadeia polipeptídica. Dentre essas, três foram encontradas em fitopatógenos: a substituição de um resíduo de glicina por alanina na posição 143 (G143A), a substituição de um resíduo de fenilalanina por leucina na posição 129

(F129L) e a substituição de um resíduo de glicina por arginina na posição 137 (G137R) (DEGLIESPOSTI et al., 1993, FRAC, 2006). A região do gene *cytB* que abriga as posições que podem ter as mutações é chamada de *hotspot* para resistência aos fungicidas QoI (GRASSO, 2005).

A estrutura do gene *cytB* tem relação com o estabelecimento das mutações que conferem resistência aos fungicidas do tipo QoI. A presença de um íntron do tipo I imediatamente após o códon para glicina na posição 143 inviabiliza o estabelecimento da substituição G143A, pois levaria a um erro no mecanismo de *splicing* e seria, portanto, uma mutação letal (GRASSO et al., 2006). Nem todas as espécies de fungos possuem esse íntron no gene *cytB*, pois essa característica é variável entre espécies, inclusive de um mesmo gênero (YIN et al., 2012).

Apesar da importância desse tipo de estudo que serve de base para a tomada de decisões de manejo, auxiliando dessa maneira os produtores, não existem pesquisas no Brasil que avaliam a possível presença de mutações que conferem resistência aos fungicidas QoI nos isolados de *S. ampelinum*, *P. euvitidis* e *P. viticola*.

Diante da carência de estudos na área e do uso excessivo do controle químico com fungicidas nos vinhedos paulistas, o que aumenta a pressão seletiva para patógenos resistentes, é que se propôs esse estudo com o objetivo principal de se caracterizar geneticamente a região *hotspot* associada à resistência aos fungicidas do tipo QoI nos patógenos *S. ampelinum*, *P. euvitidis* e *P. viticola* em isolados provenientes de vinhedos paulistas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica dessa dissertação foi dividida em tópicos que foram considerados importantes para o embasamento teórico do trabalho. No tópico **2.1 A uva e o panorama mundial do cultivo da videira** é apresentada a origem e a domesticação da uva, sua classificação botânica e características morfológicas, bem como a situação atual do mercado mundial da viticultura; no tópico **2.2 A uva no Brasil e o panorama do cultivo da videira no estado de São Paulo** são apresentadas as características do mercado brasileiro da uva e a situação da viticultura no estado de São Paulo; nos tópicos **2.3 A antracnose da videira**, **2.4 O míldio da videira** e **2.5 A ferrugem da videira** são apresentados os sintomas, epidemiologia e as características biológicas dos patógenos aqui estudados, em **2.6 Controle das doenças antracnose, míldio e ferrugem: os fungicidas do tipo QoI** é apresentada a principal forma de manejo fitossanitário das doenças citadas: o controle químico através dos fungicidas; no tópico **2.7 Resistência dos fitopatógenos aos fungicidas do tipo QoI** é discutido o problema da resistência aos fungicidas que pode surgir nas populações de patógenos e, por fim, no tópico **2.8 O gene *cytB* e o estabelecimento das mutações aos fungicidas do tipo QoI** é tratado sobre as características e estrutura do gene *cytB*, no qual podem existir as mutações para a resistência aos fungicidas.

2.1 A uva e o panorama mundial do cultivo da videira

A uva é o fruto da videira (*Vitis* sp), planta pertencente à família Vitacea e ao gênero *Vitis* L. (HARDING, 2006; WAN et al., 2013). Essa dicotiledônea é um arbusto lenhoso, com comportamento de trepadeira, que se escora por meio de gavinhas. As folhas são palmadas, divididas em lóbulos cujas extremidades formam uma ponta aguda. As flores, agrupadas em inflorescências, são amarelo-esverdeadas e em geral são hermafroditas. Os frutos são do tipo baga, globulares e suculentos, contêm as sementes e são ricos em minerais, vitaminas e açúcares, como glicose e frutose (GIOVANNINI, 1999).

As características das bagas, como cor, aroma, sabor e teor de açúcares e minerais, variam conforme o clima e o local de cultivo da videira e também conforme a espécie e cultivar da uva. A diversidade de espécies de videiras reflete a história dessa planta, sua origem, domesticação e expansão pelo mundo (SOUZA, 1996).

Pelo estudo de evidências arqueobotânicas e mais recentemente de evidências moleculares propõe-se que o ancestral das videiras atuais tenha surgido durante o período

Terciário (época do Paleoceno) onde está atualmente a Groenlândia; deste centro de origem as videiras se espalharam em duas direções principais: Américo-asiática e Euro-asiática (WAN et al., 2013). No período Quaternário, uma era glacial fez com que muitos dos lugares habitados pelas videiras fossem cobertos por gelo. Somente alguns locais - chamados de centros de refúgio - não foram atingidos. No centro de refúgio americano originaram-se as atuais espécies de uva do tipo americana (como *Vitis labrusca* e *Vitis rupestris*), no europeu predominou a espécie *Vitis vinifera sylvestris* e, por fim, no asiático predominou a espécie *Vitis vinifera caucasica* (GIOVANNINI, 1999; SOUZA, 1996;).

A espécie *Vitis vinifera* L. é a principal espécie para elaboração de vinhos e produção de frutos para consumo *in natura*. A domesticação dessa espécie a partir da já citada *Vitis vinifera sylvestris* (também conhecida como *Vitis vinifera* selvagem) é um acontecimento difícil de ser determinado por causa da falta de evidências arqueobotânicas que suportem as teorias (BOUBY et al., 2013). Porém, acredita-se que a domesticação da espécie selvagem ocorreu há cerca de 7 mil anos na região do Cáucaso, a partir de onde a espécie cultivada se espalhou para outras regiões, por hibridação, por exemplo, e originou várias das cultivares que hoje conhecemos (THIS, LACOMBE; THOMAS, 2006). Outras espécies de uva foram domesticadas na América do Norte por volta do século 19, como a *Vitis labrusca* e a *Vitis rotundifolia* (GERÓS et al., 2015).

Cultivada pela humanidade há milênios, a uva foi selecionada para as características de interesse agrônomo, por exemplo, resistência às pragas e ao estresse abiótico, alta produtividade, alto teor de açúcar, eficiência no uso dos insumos agrícolas e resistência ao transporte pós-colheita. Hoje existem mais de 60 espécies de *Vitis* e 5 mil cultivares que são diferentes considerando-se essas características agrônomicas citadas (GERÓS et al., 2015; GIOVANNINI, 1999; LEÃO, 2010; SOUZA, 1996).

Novas cultivares de uva, tanto para mesa quanto para produção de vinho, têm sido obtidas pelos programas de melhoramento genético (SOUZA, 1996). No Brasil a EMBRAPA desenvolve desde o ano de 1977 um programa de melhoramento da uva com o objetivo de obter materiais adaptados às diferentes condições edafoclimáticas das regiões produtoras no país (RITSCHER; MAIA, 2014). O Instituto Agrônomo de Campinas - IAC também coordena um projeto de melhoramento em São Paulo com o intuito de obter novas cultivares de uva para mesa e vinho e a ampliação dos bancos de germoplasma (IAC, 2015b).

A uva tem um amplo mercado comercial e pode ser consumida *in natura*, desidratada (na forma de uva passa), em sucos ou vinhos, em forma de geleias e também compotas (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura - FAO, 2009). Além disso,

a uva é objeto de estudos médicos, pois é uma das frutas mais ricas nos compostos fenólicos do tipo flavonoide (CONDE et al., 2007), um tipo de antioxidante com propriedades anti-inflamatórias e ação protetora nos órgãos dos sistemas nervoso, gastrointestinal e cardiovascular, podendo, desse modo, ser utilizada como matéria-prima para produção de fitoterápicos (GEORGIEV; ANANGA; TSOLOVA, 2014; JAYAPRAKASHA; SELVI; SAKARIAH, 2003; JAYAPRAKASHA; SINGH; SAKARIAH, 2001). Em 2014, 55% da uva colhida no mundo foi para a produção de vinhos, 35% destinada ao consumo da fruta fresca, 8% para o consumo na forma seca/desidratada e o restante (2%) usado na produção de sucos e outros produtos (ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL PARA UVA E VINHO - OIV, 2015). Segundo a FAO (2009, 2015), a uva tem papel marcante na agricultura mundial, pois é a 14ª *commodity* mais produzida no mundo, com aproximadamente 77 milhões de toneladas colhidas segundo os dados mais recentes.

De acordo com o relatório mais atual da OIV (2015), mais de 7,5 milhões de hectares estão plantados com vinhedos pelo mundo, sendo observada uma tendência de redução na área destinada ao cultivo desde o ano 2000, principalmente pelo decréscimo da plantação na Europa. Cinco países se destacam como os principais produtores de uva, somando mais de 50% da área total de vinhedos plantados no mundo: Espanha, China, França, Itália e Turquia. O Brasil figura nessa lista como 15º país, com uma área estimada de 89 mil hectares plantados.

2.2 A uva no Brasil e o panorama do cultivo da videira no estado de São Paulo

O cultivo da uva no Brasil se iniciou com Martim Afonso de Souza que trouxe no ano de 1532 videiras portuguesas para a cidade de São Vicente (nessa época ainda chamada Vila de São Vicente). A produção da uva no país ficou restrita ao estado de São Paulo até que foi expandida ao Nordeste por volta de 1549, nos estados da Bahia e Pernambuco, e ao Sul do Brasil, no Rio Grande do Sul (em meados de 1700) e em Santa Catarina (em meados de 1800) (SOUZA, 1996).

Hoje o cultivo de uva está presente em diversos estados do país, sendo que os maiores produtores são Rio Grande do Sul, Pernambuco, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Bahia e Minas Gerais. Nesses e nos demais locais onde é plantada, a uva tem um papel importante, pois sua produção permite o sustento de pequenas propriedades rurais, gera empregos e ajuda no desenvolvimento econômico da região onde é produzida (MELLO, 2015).

Com relação às espécies e às cultivares plantadas, estima-se que atualmente existem mais de 120 cultivares de origem europeia e 40 cultivares de origem americana nos parreirais do país (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011). Os vinhos de mesa e os sucos de uva são elaborados a partir das uvas americanas, como cultivares das espécies *Vitis labrusca* e *Vitis bourquina*; já os vinhos finos são elaborados a partir de uvas europeias, como *Vitis vinifera* (PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006). Destaca-se por todo o território nacional como uva de mesa a cultivar Niágara Rosada, de origem americana, que tem fácil manejo no campo e grande mercado consumidor (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011).

No ano de 2014, segundo estimativas da União Brasileira de Vitivinicultura - UVIBRA (2015) o Brasil produziu aproximadamente 66 mil toneladas de uvas destinadas à produção de vinho e 540 mil toneladas de uvas de mesa. Nesse mesmo ano, em comparação a 2013, os principais estados produtores de uva no país tiveram redução na área plantada, principalmente por falta de mão de obra, o que vem prejudicando o andamento da safra nas etapas de poda e colheita (MELLO, 2015). Apesar disso, em 2012 a produção de uva contribuiu com 9,58% do total do volume das frutas produzidas no país ficando atrás apenas da laranja e da banana (PARANÁ, 2014).

O estado de São Paulo é o principal produtor de uvas de mesa no país, contribuindo com 20% da área e da produção total nacional (MAIA; MELLO, 2003). Além da produção de uva para o consumo *in natura* e para sucos e vinhos (em menor proporção), a venda da fruta no estado de São Paulo na forma de produtos artesanais (como doces caseiros) permite renda extra aos pequenos agricultores (VERDI et al., 2011).

A produção de uva em São Paulo está localizada em pequenas propriedades rurais, principalmente nas cidades de Indaiatuba, Itupeva, Itatiba, Campinas, Vinhedo, Valinhos, Louveira, Jales, Jarinu, Jundiaí, São Roque e São Miguel Arcanjo (GHILARDI; MAIA, 2014; IAC, 2015a; TONDATO; LIMA FILHO; TARSITANO, 2009; VERDI et al., 2011).

O plantio da uva é muitas vezes a única fonte de renda para essas famílias produtoras, que inclusive se utilizam de mão de obra familiar, o que reforça a importância da vitivinicultura no estado de São Paulo (COSTA; TARSITANO; CONCEIÇÃO, 2012; GHILARDI; MAIA, 2014). Além disso, o plantio de uva promove desenvolvimento econômico e mostra-se economicamente sustentável aos produtores: estima-se que no ano de 2012 o lucro obtido na região de Campinas pela produção da cultivar Niágara Rosada foi superior a R\$12.000,00 por hectare (CAPELLO, 2014).

A uva de mesa que tem destaque nas principais regiões produtoras de São Paulo também é a cultivar Niágara Rosada. Em Jundiaí ela está presente em mais de 98% das

propriedades produtoras de uva, em Jarinu compõe praticamente 100% dos vinhedos. Mesmo em São Miguel Arcanjo, um município cuja tradição é plantar cultivares finas de mesa, a Niágara Rosada representa mais de 60% da produção (VERDI et al., 2011).

A cultivar Niágara Rosada surgiu de uma mutação somática na cultivar Niágara Branca, que por sua vez é originada do cruzamento da espécie de uva americana *V. labrusca* L. com a europeia *V. vinifera* L. Essa mutação, que fez com que as bagas se tornassem rosadas, foi relatada no ano de 1933 na região de Jundiaí e, segundo Sousa (1959), resultou em um apelo comercial muito grande para a nova cultivar Niágara. De maneira geral, os cachos de Niágara Rosada têm tamanho médio, são compactos e com bagas esféricas de tonalidade rosada e de sabor aframboesado (CAMARGO, 2014).

Além do gosto que agradou o mercado consumidor, a Niágara Rosada, se comparada às uvas europeias, é mais resistente às doenças e conseqüentemente demanda menos mão de obra, o que garantiu a sua expansão pelo estado (CAMARGO, 2014; COSTA; TARSITANO; CONCEIÇÃO, 2012).

Apesar da viabilidade econômica que a viticultura traz aos pequenos produtores, muitos problemas são enfrentados no cultivo da videira em São Paulo, como levantado por Costa, Tarsitano, Conceição (2012). Oitenta e quatro por cento dos produtores entrevistados nesse levantamento dizem não contar com nenhum acompanhamento técnico durante o cultivo. Essa falta de instrução pode ser a causa do manejo fitossanitário pouco adequado que é praticado pelos viticultores, que na sua maioria aplicam doses excessivas de fungicidas no campo.

Apesar de ser mais resistente do que outras cultivares, a Niágara Rosada pode estar sujeita a várias doenças que afetam todas as suas partes, principalmente quando cultivada em condições de umidade do ar, temperatura, pluviosidade, nutrientes e pH do solo que favoreçam o desenvolvimento dos patógenos (REIS, 2004). Dentre as principais doenças que afetam essa cultivar estão a antracnose (causada pelo ascomiceto *Sphaceloma ampelinum*), o míldio (causado pelo oomiceto *Plasmopara viticola*), e a ferrugem (causada pelo basidiomiceto *Phakopsora euvtis*) (MAIA; MELLO, 2003).

2.3 A antracnose da videira

A antracnose possivelmente se originou na Europa e depois se espalhou pelos outros continentes através de materiais biológicos contaminados que foram utilizados para propagação vegetativa das videiras (PEARSON; GOHEEN, 1988). Também conhecida como

varíola, negrão, carvão e “olho de passarinho” é uma doença que pode causar grandes perdas principalmente em regiões com alta umidade (HENNING et al., 1997).

A doença é caracterizada pelo aparecimento de pequenas lesões de cor marrom de 1 a 5mm nas folhas, ramos e bagas. Como as lesões podem apresentar margens de cor preta, as bagas ficam com o sintoma conhecido como “olho de passarinho” (Figura 1) (AGRIOS, 2004). O centro das partes lesadas depois de um tempo seca e cai, deixando buracos correspondentes. As lesões nas bagas podem até mesmo atingir a polpa e causar a quebra, ruptura do fruto (PEARSON; GOHEEN, 1988). A antracnose reduz a qualidade e quantidade da colheita em videiras susceptíveis, causando perdas de até 100% na produção (HENNING et al., 1997). A doença pode ocorrer nos estádios de brotação, floração e frutificação da videira (NAVES et al., 2006).

Figura 1 - Sintomas característicos da antracnose da videira. (a) – lesões de cor marrom nas folhas e buracos (indicados pelos círculos pretos) que surgem após a queda do tecido infectado. (b) – lesões em um ramo da videira. (c) - lesões de borda preta nas bagas, sintoma conhecido como “olho de passarinho”
Fonte: adaptado de Pearson e Goheen (1988)

A doença é causada pelo fungo ascomiceto hemibiotrófico *Elsinoë ampelina* (de Bary) Shear, cujo anamorfo – correspondente à fase anamórfica ou imperfeita – é chamado *Sphaceloma ampelinum* (HENNING et al., 1997). A fase teleomórfica (*E. ampelina*) produz os esporos sexuais chamados ascósporos e a fase anamórfica (*S. ampelinum*) produz os esporos assexuais chamados conidiósporos; esses e os ascósporos são responsáveis pela propagação da doença em pequenas distâncias, já em grandes distâncias a disseminação se dá pelo uso de materiais vegetativos contaminados (GRIGOLETTI JR et al., 2003).

No Brasil não foi relatada a presença da fase perfeita do fungo, correspondente à espécie *E. ampelina*, portanto são os conidiósporos de *S. ampelinum* os responsáveis pelo progresso da doença no país (GRIGOLETTI JR et al., 2003; HENNING et al., 1997).

Em condições *in vitro* na temperatura de 28°C *S. ampelinum* cresce na forma de micélio; porém a cor e as outras características morfológicas da colônia diferem conforme o meio utilizado, o tempo decorrido do inóculo da colônia e o local de origem do isolado (POOLSAWAT et al., 2009).

S. ampelinum pertence ao filo Ascomycota, classe Dothideomycetes e família Elsinoaceae, que, apesar de pouco conhecida, é importante para a agricultura, pois abrange muitos fitopatógenos que causam as doenças popularmente conhecidas como sarna ou antracnose (JAYAWARDENA et al., 2014). Alguns desses fitopatógenos pertencem ao já citado gênero *Sphaceloma*/*Elsinoë* que contém 117 espécies (INTERNATIONAL MYCOLOGICAL ASSOCIATION - IMA, 2016), dentre essas a causadora da sarna do abacateiro – *Sphaceloma perseae*, da sarna do amendoim – *Sphaceloma arachidis* e da doença conhecida como superalongamento da mandioca, causada pela espécie *Sphaceloma manihoticola* (HENNING et al., 1997; JAYAWARDENA et al., 2014). No *GenBank*, banco de dados para sequências biológicas do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI, estão depositadas 126 sequências de nucleotídeos referentes a 17 espécies diferentes do gênero *Sphaceloma* e 355 referentes a 25 espécies do gênero *Elsinoë*. A maior parte dessas sequências é de regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossomal. Não há genoma ou gene completamente sequenciado desse gênero depositado nesse banco de dados (NCBI, 2015). Na literatura também não existem estudos que estimam o tamanho do genoma da espécie *S. ampelinum* ou de espécies do mesmo gênero.

2.4 O míldio da videira

A doença conhecida como míldio da videira foi primeiramente reportada nos vinhedos europeus no ano de 1878 após a introdução de uvas americanas para a substituição das uvas europeias destruídas pela praga da filoxera. O patógeno causador da doença teve origem no nordeste dos Estados Unidos e trouxe grandes prejuízos às videiras desde que foi introduzido na Europa (GESSLER; PERTOT; PERAZZOLLI, 2011). É uma doença que afeta a produção e a qualidade dos produtos feitos a partir das uvas colhidas das videiras doentes (ROSSI et al., 2005 apud FRANCESCA et al., 2006). Além da temperatura adequada (na faixa de 9 a 35°C),

a presença de água é um fator indispensável para a infecção da videira pelo patógeno (FRANCESCA et al., 2006; GARRIDO; SÔNEGO, 2003).

O principal sintoma da doença é a chamada “mancha de óleo”: uma mancha pequena resultante do encharcamento do mesofilo da videira, que é facilmente vista contra a luz (Figura 2). Em condições de alta umidade relativa do ar, na superfície abaxial correspondente ao local das manchas surge uma massa branca, de aspecto cotonoso, que corresponde à esporulação do patógeno; esse sintoma é chamado “mancha branca” ou “mancha-mofo”. Depois de um tempo as manchas podem necrosar e levar à queda das folhas que foram severamente atacadas (HENNING et al., 1997). Além de atacar as folhas, o míldio também pode aparecer em todas as outras partes verdes da videira, como nos frutos, que quando infectados no início do seu desenvolvimento podem ficar cobertos por uma massa branca formada pelas estruturas do patógeno, e quando infectados mais tardiamente tornam-se duros e escuros, com a superfície enrugada, sintoma esse chamado de “míldio larvado” (GARRIDO; SÔNEGO, 2003).

Figura 2 – Sintomas característicos do míldio da videira. (a) - folha de videira com o sintoma chamado “mancha de óleo” (seta vermelha). (b) - detalhe do sintoma chamado “mancha-mofo” ou “mancha branca” (seta vermelha) formado pelas estruturas de *P. viticola*. (c) necrosamento das áreas atingidas na folha pela doença. (d) - as bagas atacadas pelo patógeno ficam menores, com cor escura e com a casca endurecida

Fonte: (c) e (b) autoria própria (2014); (a) e (d) Garrido e Sônego (2003)

A doença é causada pelo parasita obrigatório *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) Berl. & de Toni, um oomiceto da ordem Perenosporales (GESSLER; PERTOT; PERAZZOLLI, 2011). Antes classificados como fungos “verdadeiros”, no sistema de classificação mais recente os oomicetos foram realocados no Reino Chromista, filo Oomycota. Esses seres vivos apresentam parede celular sem quitina, formada por glucanos e pequenas quantidades de celulose, micélio com hifas cenocíticas e produzem zoósporos móveis com dois flagelos (ROSSMAN; PALM, 2006).

Dentro dos tecidos parasitados da videira o patógeno se desenvolve na forma de micélio, absorvendo nutrientes através dos haustórios globosos (ASH et al., 2016). A reprodução assexuada se inicia quando o micélio no interior dos tecidos da planta produz esporangióforos tanto nas folhas, quanto nos caules e frutos jovens. Os esporangióforos, que saem pelos estômatos ou pelas lenticelas dos frutos, em condições adequadas de umidade e temperatura produzem esporângios ovalados e hialinos que facilmente se desprendem e se disseminam pelo vento e chuva. Os esporângios germinam e originam zoósporos biflagelados (esporos assexuados) que se movimentam na água e encistam próximos aos estômatos (HENNING et al., 1997). O zoósporo encistado germina e emite um tubo que penetra no hospedeiro, através dos estômatos (ALLONSO-VILLAYERDE et al., 2011). A massa branca de aspecto cotonoso, um dos principais sintomas da doença, é composta pelas estruturas acima citadas: esporângios e esporangióforos (SOUZA, 1996).

A ordem Perenosporales, à qual *P. viticola* pertence, inclui a família Perenosporaceae que contempla outros fitopatógenos de importância agrônômica que são agentes causais das doenças conhecidas por míldio, como *Sclerospora graminicola* (causador do míldio do milho), *Peronospora parasitica* (causador do míldio nas brassicáceas) e *Peronospora manchurica* (causador do míldio da soja), todos parasitas obrigatórios (RAVICHANDRA, 2013).

Apesar da importância agrônômica do míldio, existe somente um genoma completamente sequenciado de um representante desse grupo: o genoma de *Plasmopara halstedii*, causador do míldio do girassol, com tamanho de 75,32 Mb (SHARMA et al., 2015). Essa carência de informações mostra que os estudos de genômica ainda são escassos para esse grupo e ressalta a importância de maior enfoque nesse campo.

Um dos possíveis motivos das pesquisas serem limitadas é a dificuldade na manipulação em laboratório desses organismos, que são biotróficos obrigatórios e não crescem satisfatoriamente em meio de cultura (SIDHU, 2013).

2.5 A ferrugem da videira

A ferrugem da videira é uma doença que se distribui principalmente por regiões tropicais, como em países da América do Sul, da América Central, da Ásia e da Oceania, mas que também já foi encontrada em regiões temperadas, como em alguns estados norte-americanos. Não existem relatos dessa doença em países europeus ou africanos (EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION - EPPO, 2016). O primeiro relato dessa doença foi feito em 1868 em uma videira de *V. vinifera* no estado da Carolina do Sul, nos EUA; o patógeno foi primeiramente classificado como *Uredo vitis* (THÜMEN, 1878 *apud* ONO, 2000). Em 2001 a doença foi reportada pela primeira vez no Brasil em uma videira comercial no município de Jandaia do Sul, no estado do Paraná, e após dois anos já estava presente em cidades produtoras de uva do estado de São Paulo (TESSMANN et al., 2004). Existe a possibilidade, no entanto, do patógeno ter entrado no país muito antes de sua detecção em 2001 e ter sobrevivido em plantas nativas do grupo das vitáceas provocando sintomas pouco visíveis (CHATASIRI; ONO, 2008).

A doença se caracteriza pela formação de pústulas amareladas na superfície abaxial das folhas, podendo surgir também nos pecíolos e em brotos jovens da videira (Figura 3). As pústulas também chamadas de urédias são formadas pela agregação de urediniósporos e podem estar espalhadas ou densamente distribuídas pelo limbo foliar (PEARSON; GOHEEN, 1988; SÔNEGO; GARRIDO; GAVA, 2005). Na superfície adaxial, nos locais correspondentes às pústulas, pode ser observada a necrose da folha; após um tempo, as folhas afetadas pela doença amarelam, secam e caem. As bagas dos frutos também podem ser afetadas tornando-se amolecidas, murchas, com coloração desigual e com menor acúmulo de açúcares (BARBOSA et al., 2010).

Figura 3 – Sintomas característicos da ferrugem da videira. (a) – pústulas amareladas na superfície abaxial da folha. (b) - manchas necróticas formadas na superfície adaxial das folhas
 Fonte: (a) autoria própria (2015); (b) Sônego, Garrido e Gava (2005)

A ferrugem da videira é causada pelo fungo basidiomiceto *Phakopsora euvitidis* Ono que pertence à ordem Pucciniales, família Phakopsoraceae (ONO, 2000). Em 2000 Ono publicou um extensivo estudo comparativo da morfologia e especificidade de hospedeiros dos fungos causadores de ferrugem, que eram classificados até então em uma única espécie chamada *Phakopsora ampelopsidis*. A partir desse estudo, o autor concluiu que existiam diferenças significativas em características morfológicas das estruturas desses fungos (como espessura da parede e número de poros germinativos dos esporos, tamanho e forma das paráfises) e propôs então a separação do complexo em três espécies. O nome *Phakopsora euvitidis* foi dado ao fungo causador de ferrugem nas espécies do gênero *Vitis*, cujo hospedeiro intermediário é a espécie *Meliosma myriantha*.

Assim como muitos dos fungos causadores de ferrugem nas plantas, *P. euvitidis* tem um ciclo de vida complexo e longo, sendo classificado como heteroécio e macrocíclico (WEINERT et al., 2003). Nos seus hospedeiros, *P. euvitidis* forma cinco tipos diferentes de esporos chamados espermácias, eciósporos, urediniósporos (ou uredósporos), teliósporos e basidiósporos; os dois primeiros tipos de esporos ocorrem no hospedeiro *M. myriantha* e os três últimos na videira. As estruturas reprodutivas que produzem as espermácias - chamadas espermogônios - e as que produzem os eciósporos - chamadas écio - só foram observadas até agora no Japão; nos outros locais onde a doença ocorre, inclusive no Brasil, foram encontrados somente o uredínio e télio, que formam respectivamente os urediniósporos e os teliósporos (ONO, 2000; SCHEFFER, 1997). Apesar de precisar de dois hospedeiros para completar seu ciclo, o fungo pode sobreviver em um único hospedeiro, no caso a videira, por

meio de reprodução clonal através dos urediniósporos, que formam as pústulas amareladas que ficam na superfície foliar (Figura 4) (FIGUEIREDO; PASSADOR, 2008).

Figura 4 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura - MEV das urédias e urediniósporos de *P. euvitidis* em folha de *V. labrusca*. (a) – urediniósporos (seta). (b) – detalhe do urediniósporo e suas ornamentações de parede (seta). (c) – detalhe das paráfises cilíndricas que formam a urédia. (d) – urédia a partir de onde saem urediniósporos (círculo). (a), (b): fixação por vapor de tetróxido de ósmio; (c), (d): fixação por Karnovsky seguida de criofratura com nitrogênio líquido. Todas as micrografias são de autoria própria (2015) e foram obtidas no Laboratório do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica - NAP/MEP – ESALQ/USP com o microscópio LEO 435 VP

Estima-se que existam pelo menos 7 mil espécies de fungos causadores de ferrugens em plantas cultiváveis de distribuição mundial; acredita-se que não exista outro grupo de fitopatógenos que seja capaz de infectar um número tão grande de hospedeiros. Alguns exemplos de fungos que causam ferrugem em outras plantas além da videira são: *Hemileia vastatrix* (causador da ferrugem no café), *Puccinia graminis* f. sp *tritici* (causador da ferrugem no trigo e na cevada), *Phakopsora pachyrhizi* e *Phakopsora meibomia* (causadores das ferrugens asiática e americana na soja) e *Puccinia melanocephala* (causador da ferrugem na cana-de-açúcar) (FIGUEIREDO; PASSADOR, 2008; KOLMER et al., 2009).

Devido ao fato de ser um patógeno biotrófico obrigatório e por não poder ser cultivado em um meio de cultura axênico (separado de seu hospedeiro), as pesquisas relacionadas aos fungos causadores de ferrugem se tornam muito trabalhosas (SILVA et al., 2015). Em 1984, Williams conseguiu cultivar urediniósporos, micélio e teliósporos de *P. graminis tritici* em meio de cultura, porém a reprodutibilidade do seu método foi contestada e os resultados não foram consistentes (WILLIAMS, 1984 apud KOLMER et al., 2009).

Apesar dessa limitação técnica ainda persistente nos dias atuais, em 2011 foram publicados os dois primeiros genomas de fungos causadores de ferrugem: *Melampsora larici-populina* (causador da ferrugem do álamo) e *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (DUPLESSIS et al., 2011). Hoje estudos recentes apontam que o tamanho do genoma das espécies de ferrugem é, em média, maior que o de outros basidiomicetos, variando de 56 Mb (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) a 733,5 Mb (*Hemileia vastatrix*) (LOEHRER et al., 2014). Com relação às espécies do gênero *Phakopsora*, apesar de não existir ainda um genoma completamente sequenciado disponível, existem 85 entradas para genes mitocondriais sequenciados no *GenBank* (NCBI, 2015).

2.6 Controle das doenças antracnose, míldio e ferrugem: os fungicidas do tipo QoI

Embora existam outras maneiras de se controlar as doenças de uma plantação, tais como rotação de cultura, controle biológico e seleção de materiais biológicos resistentes, o emprego dos compostos químicos chamados fungicidas mostra-se importante para o manejo, pois eles conseguem controlar uma doença de maneira satisfatória, inclusive quando as práticas culturais não são tão eficientes ou quando não existem cultivares resistentes à determinada doença (COSTA; TARSITANO; CONCEIÇÃO, 2012; McGRATH, 2004). Por isso, para se combater às doenças anteriormente citadas os produtores se utilizam intensamente dos fungicidas (COSTA; TARSITANO; CONCEIÇÃO, 2012).

No caso da antracnose, da ferrugem e do míldio, um dos grupos de fungicidas recomendados é o dos inibidores da quinona oxidase (QoI ou IQo) (KUHN et al., 2003). Estima-se que os produtores de uva fina de mesa apliquem fungicidas por até 100 vezes em um ciclo (COSTA; TARSITANO; CONCEIÇÃO, 2012), sendo que os gastos com a compra desses produtos representam até 59% do gasto total com defensivos agrícolas usados em uma safra (CAPELLO, 2014).

Os fungicidas inibidores da quinona oxidase, popularmente conhecidos como estrobilurinas, foram criados a partir de um grupo natural de fungicidas produzidos por várias espécies de fungos basidiomicetos tais como *Oudemansiella mucida* e *Strobilurus tenacellus* (BARTLETT et al., 2002). Esses compostos são naturalmente produzidos por esses fungos para ajudá-los na defesa contra outros micro-organismos (VINCELLI, 2015) e têm um amplo espectro de ação contra diversas espécies (SAUTER; STEGLICH; ANKE, 1999). Apesar disso, eles são inapropriados para serem usados na forma *in natura* na agricultura, pois são

instáveis quimicamente e, portanto, comercialmente inviáveis (SAUTER; STEGLICH; ANKE, 1999).

Por causa da sua instabilidade, muitas indústrias passaram a ter interesse na produção de substâncias análogas às estrobilurinas naturais, com variações na estrutura química que as tornassem mais estáveis (SAUTER; STEGLICH; ANKE, 1999). Com os resultados positivos obtidos em testes *in vitro* e *in vivo*, no ano de 1996 foram lançadas no mercado as primeiras estrobilurinas comerciais denominadas *kresoximmethyl* e *azoxistrobina* (CLOUGH; GODFREY, 1998 apud SAUTER; STEGLICH; ANKE, 1999).

Vinte anos após a venda do primeiro produto comercial, atualmente existem no mercado diferentes fungicidas do grupo químico das estrobilurinas, desenvolvidos por várias empresas, que são usados em mais de 70 países e em 80 culturas (GRASSO, 2005).

Os fungicidas do tipo QoI têm um único sítio de ação e agem inibindo a cadeia transportadora de elétrons, pois se ligam ao sítio Qo do citocromo b interrompendo o transporte de elétrons do citocromo b ao citocromo c1, conseqüentemente bloqueando a produção de ATP na célula (BARTLETT et al., 2002; FERNANDÉZ-ORTUÑO et al., 2010) (Figura 5). O citocromo b é uma proteína integral presente na membrana interna da mitocôndria e que faz parte do complexo proteico citocromo bc1, que tem 11 subunidades com massa total de 240 KD (BARTLETT et al., 2002; DEGLIESPOSTI et al., 1993).

Figura 5 - Esquema simplificado ilustrando a cadeia transportadora de elétrons e a formação de ATP na célula. I, II, III e IV são complexos proteicos presentes na membrana interna da mitocôndria através dos quais os elétrons - representados pelas setas pretas - são transportados com a ajuda de carregadores. O transporte dos íons H^+ através da ATP sintase promove a síntese de ATP na célula. Os fungicidas do tipo QoI agem ao se ligar ao sítio Qo do complexo proteico III, no qual está o citocromo b. Q = ubiquinona, C = citocromo c. Fonte: adaptado de Ow et al. (2008) e Fernández-Ortuño et al. (2010)

Existem pelo menos 18 diferentes nomes comerciais para os fungicidas do tipo QoI disponíveis no mercado; todos esses têm o mesmo modo de ação e, apesar das diferentes fórmulas, a estrutura química que é importante para a ligação ao sítio Qo é conservada (THIND, 2012). As várias moléculas comerciais existentes possuem propriedades químicas

que as conferem comportamentos distintos na planta, agindo, por exemplo, sistemicamente ou não e sendo mais ou menos absorvidas depois da aplicação (GRASSO, 2005; THIND, 2012). Os fungicidas QoI são usados para o controle de várias doenças causadas por fungos e oomicetos, como as ferrugens, míldios, oídios e as manchas foliares (VINCELLI, 2015).

O controle das doenças com esses fungicidas deve ser preventivo, pois estes são mais eficientes em controlar o patógeno no início da infecção, ou seja, durante a germinação dos esporos e do tubo germinativo e também durante a fase de movimentação dos zoósporos nas folhas. A ação mais eficiente no início do processo infeccioso está associada à alta demanda de energia por parte do patógeno e, como já mencionado, há inibição da produção de ATP nas células quando são usados fungicidas do tipo QoI. Dessa forma, seu uso recomendado deve ser preventivo e não remediativo, garantindo sua eficiência no controle das doenças (FERNANDÉZ-ORTUÑO et al., 2010; THIND, 2012).

2.7 Resistência dos fitopatógenos aos fungicidas do tipo QoI

Por serem fungicidas sítios específicos, ou seja, terem como alvo um sítio único, a ocorrência de apenas uma mutação já pode resultar em um indivíduo resistente ao mecanismo de ação dos fungicidas do tipo QoI. Com aplicações sucessivas dos fungicidas no campo pode ocorrer a seleção dos indivíduos resistentes em uma população de patógenos e como consequência tornar inviável o uso de qualquer um dos fungicidas desse grupo no controle das doenças (VINCELLI, 2015).

Apenas dois anos após o início da venda dos fungicidas QoI no mercado foi reportada na Alemanha a ocorrência de isolados de *Erysiphe graminis* resistentes (BARTLETT et al., 2002). Desde então, a resistência já foi relatada em outros lugares, como nos EUA em isolados de *Cercospora beticola* (patógeno da beterraba) (BOLTON; RIVERA; SECOR, 2013), no Brasil em *Magnaporthe oryzae* (patógeno do trigo e do arroz) (CASTROAGUDIN et al., 2015) e em vários países europeus em isolados de *Plasmopara viticola* (CHEN et al., 2007). O Comitê de Ação para Resistência a Fungicidas - FRAC (do inglês *Fungicide Resistance Action Committee*), que mantém um grupo formado por especialistas de várias empresas que comercializam os fungicidas, mantém uma lista atualizada dos patógenos nos quais já foi reportada resistência. Na sua mais recente lista, divulgada em 2013, existem mais de 50 espécies diferentes para as quais já foram descritos isolados resistentes aos fungicidas do tipo QoI (FRAC, 2014).

Desde que foram reportados tais casos, vários estudos para se entender os mecanismos envolvidos na resistência foram realizados (GISI et al., 2002). Existem pelo menos 15 mutações já conhecidas, todas na sequência do gene mitocondrial citocromo b (*cytB*), que conferem resistência aos fungicidas QoI (DEGLIESPOSTI et al., 1993). Dessas, três foram detectadas na sequência do gene *cytB* em fitopatógenos: a que acarreta a substituição de uma glicina por alanina na posição 143 da cadeia polipeptídica (G143A), a que provoca a substituição de uma fenilalanina por leucina na posição 129 (F129L) e a que leva à substituição de uma glicina por arginina na posição 137 (G137R) (FRAC, 2015). A mudança de uma única base (mutação pontual) na sequência do gene *cytB* provoca a substituição de um aminoácido no peptídeo final, o que impede a ligação da molécula de fungicida ao seu sítio alvo, tornando o indivíduo resistente à ação do produto químico. Isso ocorre pois os resíduos de aminoácidos substituídos estão em posições importantes que fazem parte dos domínios proteicos envolvidos na ligação com as moléculas do fungicida (FERNANDÉZ-ORTUÑO et al., 2010). A região do gene *cytB* que abriga as posições que podem ter as mutações é chamada de *hotspot* para resistência aos fungicidas do tipo QoI (GRASSO, 2005).

A substituição G143A foi detectada em vários fitopatógenos, dentre esses *Botrytis cinerea* (BANNO et al., 2009), *Cercospora beticola* (BOLTON; RIVERA; SECOR, 2013) e *Plasmopara viticola* (CHEN et al., 2007). A resistência conferida por essa substituição é dita qualitativa, pois o mutante é consideravelmente menos sensível ao fungicida quando comparado ao isolado selvagem e dificilmente é controlado pelas aplicações recomendadas (VINCELLI, 2015).

2.8 O gene *cytB* e o estabelecimento das mutações aos fungicidas do tipo QoI

O gene citocromo b (*cytB*) é provavelmente o gene mitocondrial mais estudado com respeito a sua estrutura e função (DEGLIESPOSTI et al., 1993). Apesar de ter sua função mantida ao longo da evolução, *cytB* possui regiões com sequências mais conservadas e regiões com sequências menos conservadas entre as espécies (FARIAS et al., 2001). As porções N-terminal e C-terminal da proteína são menos conservadas entre os organismos, enquanto que a porção central é mais conservada. No caso de espécies de animais a porcentagem de similaridade média entre as sequências chega aos 50%, enquanto que em protozoários essa porcentagem não chega aos 25%. Em plantas, além da baixa similaridade entre as sequências, existem também diferenças na organização do gene *cytB* (ZHANG et al., 2012). Nas porções conservadas os resíduos comuns entre as espécies são aqueles necessários

para manter a estrutura e função da proteína; dentre esses estão os relacionados ao sítio heme do citocromo b: uma glicina na posição 33 e duas histidinas, uma na posição 96 e outra na posição 183 (DEGLIESPOSTI et al., 1993).

Com relação a sua localização no genoma mitocondrial dos fungos, o gene *cytB* pode ocupar várias posições e ter diferentes genes vizinhos *upstream* (a montante) e *downstream* (a jusante), isso ocorre devido à grande variação na organização dos genes, tanto entre quanto dentre os principais grupos de fungos (AGUILETA et al., 2014).

Ao longo dos anos, com o aumento no acesso às técnicas de sequenciamento de DNA, o número de espécies com o gene *cytB* sequenciado cresceu significativamente. Um estudo de 2012, conseguiu através de mineração de dados recuperar mais de 3.200 sequências de nucleotídeos do gene *cytB* de espécies de eucariotos que estavam disponíveis nos bancos de dados públicos como o *GenBank* e *GOBASE* (YIN et al., 2012). Para *S. ampelinum* e *P. euvitis* não existem sequências do gene *cytB* depositadas nos bancos de dados, já para *P. viticola* existem apenas sequências de alguns isolados europeus.

A presença de um íntron do tipo I no gene *cytB*, além de estar relacionada à diferença no tamanho desse gene entre as espécies, tem papel importante no estabelecimento ou não da mutação que leva à substituição G143A. Grasso et al. (2006) propôs que a presença de um íntron do tipo I imediatamente após o códon para o aminoácido 143 não permitiria o estabelecimento dessa mutação, pois a mudança de bases levaria a um erro no mecanismo de *splicing* e por consequência seria uma mutação letal (Figura 6).

Figura 6 - Impacto da presença ou ausência de um íntron no estabelecimento da substituição G143A. Nas espécies em que não existe o íntron após a trinca para o aminoácido 143 ou ele está mais *downstream* é possível o estabelecimento da mutação que leva à substituição de glicina por alanina, pois a mudança não implica em erro durante o *splicing*. Contrariamente, nas espécies em que o íntron é imediatamente após, não é possível o estabelecimento da mutação, pois ocorreria um erro no *splicing*.

Os íntrons do tipo I e do tipo II são comuns nos genes mitocondriais de plantas e de fungos, especialmente nos genes *coxI*, *cytB* e *rnl*, porém raros nos representantes dos grupos Animalia, Protozoa e Chromista (LANG; LAFOREST; BURGER, 2007; YIN et al., 2012). Esses íntrons são enzimas de RNA (também chamadas ribozimas) que possuem capacidade de realizar *auto-splicing* do mRNA primário e de se mover e se propagar no genoma de um hospedeiro, como elementos genéticos móveis (GESTELAND; CECH; ATKINS, 2000; HAUGEN; SIMON; BHATTACHARYA, 2005; LANG; LAFOREST; BURGER, 2007).

Os íntrons do tipo I de grupos/famílias diferentes possuem baixa identidade na sequência, porém conservam alguns motivos em comum que são importantes para o *splicing*. Esses íntrons podem conter ORFs (*open reading frames*) dentro de suas sequências, mas que não implicam em mudança estrutural que impeça o mecanismo de *splicing* (SALDANHA et al., 1993). Algumas dessas ORFs podem codificar proteínas auxiliares que ajudam no processo de *splicing* dos íntrons, como as endonucleases, que estão envolvidas no processo chamado *homing* no qual um íntron se move para uma nova região sem nenhum elemento genético móvel (LANG; LAFOREST; BURGER, 2007).

Para que aconteça o correto *splicing* do íntron do mRNA é necessário que haja uma compatibilidade entre os nucleotídeos presentes na porção 3' do éxon *upstream* ao íntron e na porção 5' do íntron, de modo que a estrutura de alça necessária ao *splicing* seja mantida. A integridade dessa estrutura é tão importante que mutações nos nucleotídeos da junção éxon-íntron reduzem ou impedem o *splicing* (DOUDNA; CORMACK; SZOSTAK, 1989). Dessa forma, a mutação na trinca que codificada para o aminoácido 143 – que levaria à resistência aos fungicidas QoI – não é mantida nos organismos que possuem um íntron imediatamente após essa posição, como descrito por Grasso et al. (2006).

O número e o posicionamento dos íntrons em genes mitocondriais varia entre e dentre espécies de um mesmo gênero: espécies próximas podem não ter íntrons em comum e espécies distantes podem compartilhar íntrons com identidade próxima. Em fungos, o gene *cytB* pode apresentar de zero a sete íntrons (YIN et al., 2012).

Em *P. meibomiae* e *P. pachyrhizi*, espécies do mesmo gênero do patógeno da ferrugem da videira, foi descrita a presença de um íntron do tipo I de 1.493 pares de base (pb) em *P. meibomiae* e 1.337 pb em *P. pachyrhizi* (STONE et al., 2010). Já para *P. viticola* não foi encontrado íntron nas sequências disponíveis (CHEN et al., 2007).

Além das mutações no gene *cytB* descritas anteriormente, que impedem que a molécula de fungicida se ligue ao seu alvo, existem outras formas de um indivíduo ser

resistente. Em algumas espécies de fungos existe a presença de proteínas que formam uma bomba de efluxo na membrana da célula que garante que o fungicida não se acumule dentro da mesma (THIND, 2012); esse é o caso, por exemplo, do fitopatógeno *Mycosphaerella graminicola* que possui uma bomba multitransportadora de substâncias que é importante para a resistência aos fungicidas e às toxinas de outros fungos (ROOHPARVAR et al., 2007).

Alguns organismos geram ATP através do transporte de elétrons por uma rota alternativa na cadeia mitocondrial, que permite a passagem de elétrons mesmo com o sítio Qo ocupado pela ligação com a molécula do fungicida. Essa via que utiliza uma enzima chamada oxidase alternativa (AOX), apesar de menos eficiente, pode ser induzida pela inibição da via principal como uma forma de compensar a falta de produção de ATP (WOOD; HOLLOMON, 2003).

Além de aumentar a pressão seletiva para os indivíduos resistentes na população de patógenos, o uso excessivo de fungicidas, mesmo os ditos mais seguros, pode acarretar em problemas ambientais importantes e problemas à saúde humana (WIGHTWICK, 2010). Dessa forma, a realização de estudos que sirvam de base para a tomada de decisões adequadas ao manejo de doenças torna-se importante. Nesse contexto, pesquisas para acessar mutações que conferem resistência aos fungicidas são imprescindíveis, ainda mais em um cenário em que mais de 80% dos produtores alegam não ter acompanhamento e suporte para a tomada de decisões durante a safra.

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Levando-se em consideração o que foi exposto anteriormente:

- a uva de mesa Niágara Rosada (*Vitis labrusca*) é uma cultura economicamente importante para o estado de São Paulo;
- o uso indiscriminado de fungicidas para o controle das doenças da videira aumenta a pressão de seleção para indivíduos resistentes em uma população;
- a ocorrência de populações resistentes aos fungicidas do tipo QoI já foi reportada em vários outros fitopatógenos e é uma preocupação entre os produtores de uva no Brasil;
- o entendimento desse fenômeno é importante para a tomada de decisões estratégicas para o manejo de doenças;
- não existem estudos desse tipo para os patógenos *S. ampelinum*, *P. viticola* e *P. euvitis* em isolados de São Paulo e do Brasil;

O objetivo geral desse trabalho foi sequenciar a região *hotspot* para as mutações que conferem resistência aos fungicidas do tipo QoI no gene citocromo b (nas posições equivalentes aos aminoácidos 129, 137 e 143) em isolados de *S. ampelinum*, *P. viticola* e *P. euvitis* provenientes das cidades consideradas importantes na produção de uva no estado de São Paulo, verificando assim a presença ou ausência de isolados geneticamente resistentes. Os objetivos específicos desse trabalho foram:

- (1) Isolar e, se possível, manter os indivíduos obtidos a partir de plantas contaminadas com as espécies de patógenos em estudo;
- (2) Adaptar uma técnica de extração de DNA para as três espécies considerando-se as características peculiares de cada uma;
- (3) Desenhar *primers* para amplificar a região de interesse (*hotspot*) no gene *cytb* com base em sequências disponíveis nos bancos de dados biológicos;
- (4) Obter e sequenciar os produtos amplificados conseguidos no item 3 para todos os isolados em estudo;
- (5) Analisar e caracterizar geneticamente a região *hotspot* dos isolados de acordo com o que é descrito na literatura (geneticamente resistentes ou sensíveis aos fungicidas do tipo QoI);
- (6) Promover o sequenciamento do gene *cytB* com a estratégia de *Genome Walking*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de desenvolvimento dos experimentos

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo” - Grupo de Genômica, no Departamento de Genética - LGN, ESALQ/USP. A coleta dos materiais biológicos do campo e o isolamento dos patógenos foram feitos pelos alunos da Prof^a Lilian Amorim, do Departamento de Fitopatologia - LFN, ESALQ/USP, integrantes de um projeto temático financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP intitulado “Epidemiologia, avaliação de danos e controle de doenças da videira” (2013/24003-9) ao qual esse trabalho é parte integrante.

4.2 Coleta e isolamento do material biológico

Durante os anos de 2014, 2015 e 2016 foram coletados diferentes órgãos (folhas, frutos e ramos) de videiras da cultivar Niágara Rosada apresentando os sintomas típicos de antracnose, ferrugem e míldio, de parreirais de diversas cidades consideradas importantes produtoras de uva no estado de São Paulo e também de campos experimentais. Além disso, em algumas oportunidades foram coletados materiais de outras variedades e em cidades de outros estados do país. Todos esses materiais coletados haviam sido pulverizados em maior ou menor grau com fungicidas do tipo QoI. Destes, foram selecionados 35 isolados das três espécies de patógenos estudadas. Na Tabela 1 são informados os identificadores dos isolados, o local de coleta, a espécie a qual pertencem e, quando consta, de qual órgão foi feita a coleta; a Figura 7 mostra a localização das cidades nas quais foram realizadas as coletas dos isolados selecionados para o estudo.

Tabela 1 – Identificador, local de coleta, espécie e de qual órgão foram coletados os materiais biológicos utilizados para o estudo

(continua)

Identificador do isolado	Local de coleta	Espécie	Órgão
AV20 (a)	Piracicaba/SP	<i>S. ampelinum</i>	Folha (limbo)
AV21 (a)	Piracicaba/SP	<i>S. ampelinum</i>	Folha (limbo)
AV25	Jundiaí/SP	<i>S. ampelinum</i>	Folha (limbo)
AV27	Jundiaí/SP	<i>S. ampelinum</i>	Folha (limbo)

Tabela 1 - Identificador, local de coleta, espécie e de qual órgão foram coletados os materiais biológicos utilizados para o estudo

(continuação)

Identificador do isolado	Local de coleta	Espécie	Órgão
AV29	Jundiaí/SP	<i>S. ampelinum</i>	Folha (limbo)
AV34	Jundiaí/SP	<i>S. ampelinum</i>	Folha (limbo)
AV35 (a)	Piracicaba/SP	<i>S. ampelinum</i>	Folha (limbo)
AV37	Jundiaí/SP	<i>S. ampelinum</i>	Folha (limbo)
AV38 (a)	Piracicaba/SP	<i>S. ampelinum</i>	Folha (limbo)
AV67	Indaiatuba/SP	<i>S. ampelinum</i>	Fruto
AV68	Indaiatuba/SP	<i>S. ampelinum</i>	Folha (limbo)
AV71 (b)	Indaiatuba/SP	<i>S. ampelinum</i>	Folha (limbo)
AV74	Indaiatuba/SP	<i>S. ampelinum</i>	Fruto
AV81 (b)	São Roque/SP	<i>S. ampelinum</i>	Folha (limbo)
AV82 (b)	São Roque/SP	<i>S. ampelinum</i>	Caule
AV83 (b)	São Roque/SP	<i>S. ampelinum</i>	Folha (pecíolo)
AV85 (b)	São Roque/SP	<i>S. ampelinum</i>	Folha (limbo)
AV86	São Roque/SP	<i>S. ampelinum</i>	Folha (limbo)
I1	Jarinu/SP	<i>P. viticola</i>	N/C
I2	São Miguel Arcanjo/SP	<i>P. viticola</i>	N/C
I3	São Miguel Arcanjo/SP	<i>P. viticola</i>	N/C
I4	Flores da Cunha/RS	<i>P. viticola</i>	N/C
I5	Garibaldi/RS	<i>P. viticola</i>	N/C
I7	São Miguel Arcanjo/SP	<i>P. viticola</i>	N/C
I8	Bento Gonçalves/RS	<i>P. viticola</i>	N/C
I9	Cotiporã/RS	<i>P. viticola</i>	N/C

Tabela 1 - Identificador, local de coleta, espécie e de qual órgão foram coletados os materiais biológicos utilizados para o estudo

(conclusão)

Identificador do isolado	Local de coleta	Espécie	Órgão
I10 (a)	Piracicaba/SP	<i>P. vitcola</i>	N/C
I11	Jundiaí/SP	<i>P. vitcola</i>	N/C
I14	Juazeiro/BA	<i>P. vitcola</i>	N/C
I16	Juazeiro/BA	<i>P. vitcola</i>	N/C
I19	São Roque/SP	<i>P. viticola</i>	N/C
I20 (a)	Piracicaba/SP	<i>P. vitcola</i>	N/C
I21	Jundiaí/SP	<i>P. vitcola</i>	N/C
FV1	Piracicaba/SP	<i>P. euvitis</i>	N/C
FV2	Piracicaba/SP	<i>P. euvitis</i>	N/C

Nota: N/C: não constam dados de qual órgão foram feitas as coletas.

^(a) isolados coletados em Piracicaba/SP são provenientes do campo experimental da ESALQ/USP.

^(b) isolados coletados de outras cultivares que não a Niágara Rosada.

Figura 7 - Cidades de SP, RS e BA das quais foram coletados os materiais com antracnose, míldio e ferrugem usados no estudo

4.3 Cultivo e manutenção dos isolados

Para os patógenos biotróficos obrigatórios (*P. viticola* e *P. euvtis*) os isolados acima descritos foram mantidos em folhas destacadas, ou em videiras plantadas em vasos nas condições adequadas de temperatura (25°C), umidade relativa do ar (70%) e fotoperíodo (12 horas) ou em videiras no campo experimental. Alguns isolados de míldio também foram mantidos em folhas destacadas à temperatura de -20°C dentro de caixas plásticas do tipo *gerbox* fechadas com filme plástico.

Para *S. ampelinum*, o único dos três patógenos em estudo que pode ser mantido em condições *in vitro*, os isolados foram cultivados em meio de cultura YM sólido (3g/L de extrato de levedura, 3g/L de extrato de malte, 5g/L de peptona de soja, 10g/L de glicose, 15g/L de ágar) por 10-15 dias a 28°C com fotoperíodo de 12 horas. A partir desses materiais foram feitas todas as análises subsequentes (Figura 8).

Figura 8 - Material biológico utilizado no estudo. (a) – disco foliar de videira com sintomas de míldio. (b) – folha destacada de videira com sintomas de ferrugem. (c) – detalhe de *S. ampelinum* crescendo em meio sólido YM após aproximadamente 10 dias

Os isolados de *S. ampelinum* utilizados no trabalho foram mantidos em estoque a longo prazo por duas maneiras diferentes: pelo método de Castellani (discos do micélio crescido por aproximadamente 10 dias foram colocados em microtubos autoclavados, cobertos com água destilada estéril, vedados com filme plástico e mantidos à temperatura de 4°C) (RODRIGUES; LÍRIO; LACAZ, 1992) e pelo método de glicerol 10% (discos do micélio crescido por aproximadamente 10 dias foram colocados em tubos criogênicos, cobertos com 166µL de glicerol 60% mais 833µL de água destilada estéril, fechados e estocados à temperatura de -80°C).

4.4 Extração de DNA total

4.4.1 Extração de DNA total de *S. ampelinum*

A extração de DNA total (genômico e mitocondrial) de *S. ampelinum* foi feita utilizando-se o micélio crescido por 10-15 dias em meio de cultura YM sólido seguindo o protocolo adaptado descrito por Lee e Taylor (1990).

Aproximadamente 200mg de micélio fresco de cada isolado foram coletados usando-se um bisturi estéril e colocados em microtubos de 2mL contendo 600µL de tampão de extração (0,15M NaCl, 50nM Tris-HCl pH 8, 50mM ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA, 1% - dodecil sulfato de sódio - SDS). O micélio foi macerado junto ao tampão de extração com o auxílio de um bastão de vidro autoclavado. Depois, o microtubo com a amostra macerada foi colocado em banho-maria a 65°C por 60 minutos e invertido gentilmente por quatro vezes nesse período. Após os 60 minutos de incubação, foram adicionados ao tubo 600µL de uma solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (Sigma) e esse foi centrifugado por 10 minutos na velocidade de 10.000 rotações por minuto - rpm a 4°C. O sobrenadante foi retirado, colocado em um novo microtubo e nesse foram adicionados 600µL de uma solução de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 24:1; o tubo foi centrifugado por 10 minutos na velocidade de 10.000 rpm a 4°C; essa etapa foi repetida por 3 vezes. Depois, o sobrenadante foi retirado e a esse foi adicionado 0,1 volume (considerando-se o volume recuperado do sobrenadante) de acetato de sódio 3M e 1,8 volumes de etanol 100% gelado (-20°C). O tubo foi mantido por 30 minutos a -20°C e em seguida centrifugado por 10 minutos na velocidade de 10.000 rpm a 4°C. O precipitado de DNA formado após a centrifugação foi lavado 3 vezes com 1,8 volumes de etanol 70% gelado (-20°C), centrifugado por 5 minutos, 10.000 rpm a 4°C. Finalmente, o precipitado de DNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 50-70µL de T₁₀E₁ (10mM Tris-HCl pH 8; 1mM EDTA). Em seguida foi realizado o tratamento da amostra de DNA com RNase (Fermentas), por 30 minutos a 37°C no banho-maria, utilizando-se 1µL da solução 10mg/mL. A amostra foi armazenada a -20°C. As adaptações feitas no protocolo original foram aumentar para três vezes o número de centrifugações após a adição de clorofórmio-álcool isoamílico na amostra (com o objetivo de se retirar o excesso de fenol) e também aumentar para três vezes o número de lavagens do precipitado de DNA com etanol 70% gelado (com o objetivo de se retirar o excesso de sal do DNA).

Para se verificar a integridade do DNA extraído, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,8%) feita em TBE 0,5X (solução 5X – 54g de Tris-base,

27,5g de ácido bórico, 20mL de EDTA 0,5M pH 8,0 – diluída em água deionizada). As amostras de DNA e o marcador de peso molecular foram corados com SYBR Gold (Applied Biosystems). O gel foi fotografado pelo fotodocumentador Kodak EDAS 20 (Kodak). Para quantificação do DNA e também verificação da sua pureza as amostras foram medidas seguindo-se as instruções do fabricante no aparelho NanoCell (Thermo Scientific).

4.4.2 Extração de DNA total de *P. viticola* e *P. euvitis*

A extração de DNA total dos isolados de *P. viticola* e *P. euvitis* foi feita a partir de folhas de videira com sintomas de míldio e ferrugem seguindo-se o protocolo adaptado de Lo Piccolo et al. (2012).

As folhas foram maceradas com nitrogênio líquido em almofariz com ajuda de um pistilo. O material triturado foi guardado a -80°C para ser utilizado para as extrações de DNA total. Para isso, 200mg do macerado foram transferidos para um microtubo contendo 700µL de tampão de extração (2% brometo de cetil-trimetil-amônio - CTAB, 100mM Tris-HCl pH 8, 25mM EDTA pH 8, 1M NaCl, 2% polivinilpirrolidona - PVP, 1% β-mercaptoetanol) previamente aquecido à temperatura de 65°C.

O tubo foi agitado vigorosamente, incubado por 60 minutos a 65°C em banho-maria e misturado ocasionalmente por 4 vezes nesse período. A amostra foi centrifugada por 10 minutos na velocidade de 10.000 rpm à temperatura de 4°C e o sobrenadante foi retirado e transferido para um novo microtubo. Foram adicionados 700µL da solução clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 24:1 ao sobrenadante que depois foi centrifugado por 10 minutos na velocidade de 10.000 rpm à temperatura de 4°C. Novamente o sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual foram adicionados 700µL de isopropanol gelado (-20°C) e, em seguida, o tubo foi incubado por 30 minutos a -20°C para precipitação do DNA. A amostra foi centrifugada por 10 minutos na velocidade de 14.000 rpm à temperatura de 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de DNA formado foi lavado por três vezes com 500µL de etanol 70% gelado (-20°C), centrifugado por 5 minutos na velocidade de 14.000 rpm à temperatura de 4°C. Por fim, o precipitado de DNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 70µL de T₁₀E₁. A mudança feita nesse protocolo de extração de DNA foi de aumentar para três vezes o número de lavagens do precipitado de DNA com etanol 70% gelado com o objetivo de se retirar o excesso de sal da amostra.

Da mesma forma como foi procedido para o DNA extraído de *S. ampelinum*, as amostras de *P. viticola* e *P. euvitis* foram tratadas com RNase e submetidas à eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no item 4.4.1.

4.5 Desenho de *primers* para amplificação da região *hotspot*

Nesse estudo foi necessário usar três estratégias distintas no desenho de *primers* para a amplificação da região *hotspot* nos patógenos em estudo. Cada uma será abordada nos três itens a seguir.

4.5.1 Desenho de *primers* para amplificação da região *hotspot* em *S. ampelinum*

Para *S. ampelinum* não existe uma sequência do gene *cytB* disponível nos bancos de dados que pudesse ser utilizada como base para o desenho de *primers* para amplificar a região *hotspot*. Por isso, foi primeiramente necessário obter uma sequência específica do gene *cytB* nessa espécie.

Para obter essa sequência foram desenhados *primers* degenerados a partir de um alinhamento de sequências codantes (CDSs) do gene *cytB* de espécies pertencentes à classe Dothideomycetes (mesma classe de *S. ampelinum*). No total foram 22 CDSs completas ou parciais do gene *cytB* selecionadas do banco de dados MitoFun (UNIVERSITY OF ATHENS, 2015). A Tabela 2 apresenta o número de acesso do *GenBank* das sequências selecionadas para o alinhamento e também à quais espécies pertencem.

Tabela 2 – Número de acesso do *GenBank* das sequências selecionadas para o alinhamento múltiplo que foram recuperadas do banco de dados MitoFun

Número de acesso do <i>GenBank</i>	Espécie
AF343069.1	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>
AF343070.1	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>
JQ360628.1	<i>Cercospora beticola</i> (a)
JQ360627.1	<i>Cercospora beticola</i> (a)
JQ360626.1	<i>Cercospora beticola</i> (a)
JQ360625.1	<i>Cercospora beticola</i> (a)
EF176921.1	<i>Cercospora beticola</i> (a)
KP825078.1	<i>Cercospora kikuchii</i> (a)
KP82507.1	<i>Cercospora kikuchii</i> (a)
KP825025.1	<i>Cercospora kikuchii</i> (a)
KP825089.1	<i>Cercospora kikuchii</i> (a)
KP825087.1	<i>Cercospora kikuchii</i> (a)
KP825086.1	<i>Cercospora kikuchii</i> (a)
NC_016955	<i>Peltigera malacea</i>
EF599949.1	<i>Pyrenophora teres</i>
JQ856019.1	<i>Ascochyta rabiei</i>
AF047029.1	<i>Venturia inaequalis</i>
XM_007720362.1	<i>Bipolaris zeicola</i>
XM_007695817.1	<i>Bipolaris oryzae</i>
XM_014217448.1	<i>Bipolaris maydis</i>
JQ856018.1	<i>Ascochyta rabiei</i>
GU952819.1	<i>Monilinia vaccinii-corymbosi</i>

Nota: ^(a) sequências da mesma espécie, mas de diferentes isolados.

Com as CDSs selecionadas apresentadas pela Tabela 2 foi feito um alinhamento múltiplo de sequências no programa Clustal Ômega (SIEVERS et al., 2011) utilizando-se os parâmetros padrões da ferramenta e esse alinhamento foi visualizado no programa Jalview v.2.9.0b2 (WATERHOUSE et al., 2009). Através da verificação manual do alinhamento foi determinada a região mais conservada entre as sequências e nessa foram desenhados três *primers* degenerados (Figura 9, Tabela 3) para amplificação de parte do gene *cytB*. O *primer* PDSF1 se anela da posição 1.008 a 1.026 pb do alinhamento, o *primer* PDSF2 se anela da

posição 1.001 a 1.020 do alinhamento e o *primer* PDSR1 da posição 1.225 a 1.242 pb. O programa Gene Runner (GENE RUNNER, 2014) foi usado para verificar a qualidade de todos os *primers* construídos. Todos os *primers* desse trabalho foram sintetizados pela Exxtend (Campinas, SP).

Figura 9 - Esquema representando o alinhamento das CDSs do gene *cytB*. Com base no alinhamento foi possível desenhar três *primers* degenerados (PDSF1, PDSF2 e PDSR1) para amplificar parte do gene *cytB* em *S. ampelinum*

Tabela 3 – *Primers* degenerados utilizados para amplificação de parte do gene *cytB* em *S. ampelinum*

<i>Primer</i>	Sequência 5' – 3'	Temperatura de <i>melting</i>
PDSF1 (direto)	T(Y)GTATTAGCTGC(W)TTAGC	56°C
PDSF2 (direto)	TT(W)CCTTT(Y)GTATTAGCTGC	58°C
PDSR1 (reverso)	GTTTGCAT(W)GG(R)TT(W)GCC	58°C

Nota: (Y) representa os nucleotídeos C ou T.

(W) representa os nucleotídeos A ou T.

(R) representa os nucleotídeos A ou G.

Na reação de amplificação utilizando-se os *primers* desenhados foi usado 1µL de DNA *template* (isolado AV27 - na concentração 30 - 50ng/µL) com 200µM de dNTPs, 0,4µM dos *primers* direto e reverso, 2mM MgCl₂ e 1,25 unidades de Taq polimerase (GeneDirex), em um volume final de 25µL. As reações foram incubadas a 94°C por 1 minuto,

seguidamente de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com uma etapa final de extensão de 72°C por 8 minutos. O termociclador utilizado em todas as reações de PCR do estudo foi o Veriti Thermal Cyclers (Applied Biosystems).

A verificação da amplificação foi feita utilizando-se eletroforese em gel de agarose (concentração 1,2%). Os produtos de PCR e o marcador de peso molecular foram corados com SYBR Gold (Applied Biosystems) e o gel fotografado com o fotodocumentador Kodak EDAS 120 (Kodak). Os produtos amplificados de interesse (Apêndice) foram purificados, sequenciados pelo método dideoxi (Sanger) e a identidade das sequências obtidas foi confirmada pelo BLASTN conforme o método que será descrito no item 4.6.4.

As sequências obtidas a partir dos produtos de PCR foram alinhadas às sequências da Tabela 2 pelo programa Clustal Ômega (SIEVERS et al., 2011) utilizando-se os parâmetros padrões da ferramenta e esse alinhamento foi visualizado no programa Jalview v.2.9.0b2 (WATERHOUSE et al., 2009). Com base nesse alinhamento foram determinadas as regiões mais conservadas entre as sequências e nessas regiões foram desenhados *primers* para amplificação da região *hotspot* em *S. ampelinum*. O programa Gene Runner (GENE RUNNER, 2014) foi usado para verificar a qualidade dos *primers* construídos.

4.5.2 *Primers* para amplificação da região *hotspot* em *P. viticola*

Os *primers* utilizados para amplificar e sequenciar a região *hotspot* nos isolados de *P. viticola* do estudo foram COB279_F (CHEN et al., 2004 *apud* MATASCI et al., 2008) e StrobiR (SYNGENTA LTD, 2003) (Tabela 4). O *primer* direto (COB_279F) anela na sequência do gene *cytb* na posição de 6 a 27 pb e o *primer* reverso (StrobiR) na posição de 520 a 543 pb. Esse par de *primers* é descrito na literatura como uma ferramenta de detecção da resistência em isolados de míldio e por isso foi usado nesse estudo também.

Tabela 4 – *Primers* utilizados para as reações de amplificação da região *hotspot* em *P. viticola*

<i>Primer</i>	Sequência 5' - 3'	Temperatura <i>melting</i>	Produto esperado
COB279_F	TATACATATTTTATAGGGGTTTG	58°C	537 pb
StrobiR	CCACTCAGGAACAATATGTAAAGG	54°C	

4.5.3 Desenho de *primers* para amplificação da região *hotspot* em *P. euvitis*

Para a amplificação e o sequenciamento da região *hotspot* em *P. euvitis* foram desenhados *primers* com base em um alinhamento múltiplo de sequências de nucleotídeos do gene *cytB* de duas espécies filogeneticamente próximas: *Phakopsora meibomia* (número de acesso *GenBank* NC_014352.1) e *Phakopsora pachyrhizi* (número de acesso *GenBank* NC_014344.1).

As sequências recuperadas do *GenBank* foram alinhadas pelo programa Clustal Ômega (SIEVERS et al., 2011) utilizando-se os parâmetros padrões da ferramenta e o alinhamento foi visualizado no programa Jalview v.2.9.0b2 (WATERHOUSE et al., 2009). Pela verificação manual do alinhamento foi escolhida uma região conservada entre as sequências, onde foram desenhados os *primers* direto e reverso. Para avaliar a qualidade dos *primers* construídos foi utilizado o programa Gene Runner (GENE RUNNER, 2014).

4.6 Amplificação e sequenciamento da região *hotspot* do gene *cytB*

4.6.1 Amplificação da região *hotspot* do gene *cytB* em *S. ampelinum*

Na reação de amplificação por PCR foi usado 1µL de DNA *template* (na concentração de até 30ng/µL) com 200µM de dNTPs, 0,4 a 0,8µM dos *primers* direto e reverso, 2 a 4mM MgCl₂ e 1,25 unidades de Taq polimerase (GeneDirex), em um volume final de 25µL. As reações foram incubadas a 94°C por 1 minuto, seguidamente por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 48°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com uma etapa final de extensão de 72°C por 8 minutos. A verificação da reação de amplificação foi feita conforme descrito no item 4.5.1.

4.6.2 Amplificação da região *hotspot* do gene *cytB* em *P. viticola*

Na reação de amplificação por PCR de cada isolado de míldio foi usado 1µL de DNA *template* (na concentração de até 30ng/µL) com 200µM de dNTPs, 0,4µM dos *primers* direto e reverso, 2mM MgCl₂ e 1,25 unidades de Taq polimerase (GeneDirex), em um volume final de 25µL. As reações foram incubadas a 94°C por 1 minuto, seguidamente por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com uma etapa final de extensão

de 72°C por 8 minutos. A verificação da reação de amplificação foi feita conforme descrito no item 4.5.1.

4.6.3 Amplificação da região *hotspot* do gene *cytB* em *P. euvitis*

Para a reação de PCR de cada isolado de ferrugem foi usado 1µL de DNA *template* (na concentração de até 30ng/µL) com 200µM de dNTPs, 0,4µM dos *primers* direto e reverso, 2mM MgCl₂ e 1,25 unidades de Taq polimerase (GeneDirex), em um volume final de 25µL. As reações foram incubadas a 94°C por 1 minuto, seguidamente por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com uma etapa final de extensão de 72°C por 8 minutos. A verificação da reação de amplificação foi feita conforme descrito no item 4.5.1.

4.6.4 Sequenciamento da região *hotspot* do gene *cytB*

Os produtos amplificados com tamanho esperado foram purificados pelo kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante e sequenciados pelo método dideoxi (Sanger) no Laboratório Genomics and Transposable Elements Laboratory - GaTE Lab sob coordenação da Prof.^a Marie-Anne Van Sluys, na USP/São Paulo. Para se verificar a qualidade das sequências obtidas foi feita a inspeção manual dos picos do cromatograma no programa Ugene (OKONECHNIKOV et al., 2012). A especificidade dos produtos de PCR sequenciados foi confirmada pelo BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990) e o banco de dados nr (não-redundante) (*GenBank*) do NCBI (BENSON et al., 2005), usando-se os parâmetros padrões da ferramenta.

4.7 Caracterização da região *hotspot* do gene *cytB*

4.7.1 Caracterização da região *hotspot* do gene *cytB* em *P. viticola*

As sequências de nucleotídeos dos isolados em estudo foram transformadas para FASTA, traduzidas para aminoácidos nos seis *frames* de leitura (tabela de códons: *Yeast mitochondrial*) usando-se o programa ExPASy Translate (GASTEIGER et al., 2003) e alinhadas às sequências de aminoácidos do gene *cytB* de dois isolados de *P. viticola* usados como referência, um considerado sensível (número de acesso *GenBank* DQ459468.1) e um

considerado resistente (número de acesso *GenBank* DQ459469.1) O alinhamento múltiplo foi feito pelo programa Clustal Ômega (SIEVERS et al., 2011) utilizando-se os parâmetros padrões da ferramenta e foi visualizado no programa Jalview v.2.9.0b2 (WATERHOUSE et al., 2009). Através da inspeção manual do alinhamento foram verificados quais aminoácidos ocupavam as posições 129, 137 e 143. Foram considerados isolados geneticamente resistentes aqueles que apresentaram pelo menos uma das substituições de aminoácidos descritas na literatura (Tabela 5) e foram considerados isolados geneticamente sensíveis aqueles que não apresentaram substituições nas posições citadas.

Tabela 5 – Posição e os aminoácidos correspondentes buscados nas sequências para determinação do fenótipo dos isolados em estudo

Posição na sequência de aminoácidos	Aminoácido	Fenótipo/Substituição
129	Fenilalanina (F)	Sensível
	Leucina (L)	Resistente/ (F129L)
137	Glicina (G)	Sensível
	Arginina (R)	Resistente/ (G137R)
143	Glicina (G)	Sensível
	Alanina (A)	Resistente/ (G143A)

Para se identificar quais mutações pontuais estavam presentes nas trincas correspondentes aos aminoácidos 129, 137 e 143 nos isolados resistentes foi feito um alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos dos isolados em estudo e das sequências referências de *P. viticola* (depositadas no *GenBank*) pelo programa Clustal Ômega (SIEVERS et al., 2011) utilizando-se os parâmetros padrões da ferramenta. O alinhamento foi visualizado no programa Jalview v.2.9.0b2 (WATERHOUSE et al., 2009) e por inspeção manual foram buscados e anotados os polimorfismos nas trincas citadas.

4.7.2 Caracterização da região *hotspot* do gene *cytB* em *P. euvitis*

A caracterização da região *hotspot* em *P. euvitis* para determinação do fenótipo dos isolados em estudo seguiu as mesmas etapas do item 4.7.1. Foram usadas como referência as sequências do gene *cytB* da mitocôndria sequenciada de um isolado de *P. meibomia* (número de acesso *GenBank* NC_014352.1 – posição 15.531 a 18.183 pb) e de um isolado de *P. pachyrhizi* (número de acesso *GenBank* NC_014344.1 – posição 15.086 a 17.609 pb). Assim como procedido para *P. viticola*, foram considerados isolados geneticamente resistentes

aqueles que apresentaram pelo menos uma das substituições de aminoácidos descritas (Tabela 5) e foram considerados isolados geneticamente sensíveis aqueles que não apresentaram substituições nas posições citadas. A busca pelas mutações pontuais nas trincas correspondentes às posições 129, 137 e 143 também foi feita de acordo com o procedido para *P. viticola*.

4.8 O sequenciamento do gene *cytB*

4.8.1 O sequenciamento do gene *cytB* em *S. ampelinum*

Com o objetivo de sequenciar parte do gene *cytB* de *S. ampelinum* para caracterizar sua estrutura, como presença ou ausência de íntrons, foi empregada a técnica chamada *Genome Walking* - GW, que tem por objetivo a amplificação e sequenciamento de uma região desconhecida que esteja flanqueada por uma sequência já caracterizada (LEONI et al., 2011). Existem várias técnicas de GW e nesse estudo utilizou-se a estratégia baseada na digestão do DNA total, seguida de ligação dos fragmentos digeridos aos adaptadores e, por fim, amplificação da sequência de interesse em duas reações de PCR subsequentes com *primers* específicos do gene (*gene specific primers* – GSP - desenhados com base na sequência conhecida flanqueadora) e *primers* dos adaptadores (*adaptor primers* – AP). O kit utilizado para as reações de GW nas três espécies em estudo foi o Genome Walker Universal (Clontech). A Figura 10 resume os passos da estratégia seguida para o sequenciamento do gene *cytB* no caso de *S. ampelinum*.

Figura 10 – Esquema resumindo a estratégia de GW utilizada no estudo para sequenciamento de parte do gene *cytB*

A sequência conhecida que foi usada como base para o desenho de *primers* específicos do gene (GSP) foi a obtida no item 4.5.1, pela amplificação de parte do DNA de *S. ampelinum* usando-se os *primers* degenerados (Apêndice). A construção dos *primers* seguiu as instruções descritas no manual do fabricante do kit (como número de bases, temperatura de *melting*, porcentagem de bases CG necessárias). Novamente foi utilizado o programa Gene Runner (GENE RUNNER, 2014) para verificar a qualidade dos *primers* desenhados.

Todas as etapas de purificação, digestão de DNA, ligação dos fragmentos aos adaptadores e amplificação tiveram como base as instruções do fabricante. A digestão do DNA total foi feita com a enzima de restrição *PvuII*, pois dentre as enzimas disponíveis no kit essa possui apenas dois sítios de restrição na sequência de nucleotídeos da mitocôndria da espécie filogeneticamente próxima *Phialocephala subalpina* (número de acesso no *GenBank* NC_015789.1), conforme verificado pelo mapa de restrição feito pelo programa CLC Sequence Viewer v. 7.6 (Figura 11). O isolado escolhido para as reações de GW foi o AV86 (São Roque/SP).

Figura 11 - Mapa de restrição da sequência da mitocôndria de *P. subalpina*. As enzimas *DraI* e *EcoRV* reconhecem muitos sítios na sequência, *StuI* reconhece 4 sítios e *PvuII* apenas dois

A verificação da reação de amplificação (eletroforese em gel de agarose 1,5%), a purificação do amplificado, o sequenciamento e a confirmação da identidade do produto de PCR foram feitos conforme descrito anteriormente nos itens 4.5.1 e 4.6.4.

4.8.2 O sequenciamento do gene *cytB* em *P. viticola*

A região conhecida do gene *cytB* utilizada como base para o desenho dos *primers* específicos em *P. viticola* foi a obtida pelo sequenciamento da região *hotspot* do isolado I21 (Jundiaí/SP) utilizando-se os *primers* COB279_F (CHEN et al., 2004 *apud* MATASCI et al., 2008) e StrobiR (SYNGENTA LTD, 2003). A construção dos *primers* seguiu as instruções do manual do fabricante do kit. O programa Gene Runner (GENE RUNNER, 2014) foi usado para verificar a qualidade dos *primers* desenhados.

A digestão do DNA total foi feita com as enzimas *DraI* e *PvuII*. As reações de purificação, ligação dos fragmentos aos adaptadores e amplificação por PCR foram feitas de acordo com as instruções do fabricante. O isolado escolhido para o sequenciamento do gene foi o I21 (Jundiaí/SP).

Assim como foi procedido para *S.ampelinum*, a verificação da amplificação (eletroforese em gel de agarose 1,5%), a purificação do produto amplificado, o sequenciamento e confirmação da especificidade das sequências obtidas foi feita de acordo com o descrito anteriormente nos itens 4.5.1 e 4.6.4.

As sequências de *P. viticola* obtidas pelo GW foram convertidas para FASTQ (biopython) e alinhadas contra a referência de *P. viticola* (número de acesso *GenBank* DQ459469.1) utilizando-se o programa BWA (LI; DURBIN, 2009) e o IGV (THORVALDSDÓTTIR; ROBINSON; MESIROV, 2013) para visualização. Em seguida, via inspeção gráfica do alinhamento, foram identificadas quais porções do gene *cytB* foram representadas pelo sequenciamento. Também foi incluída nesse alinhamento a sequência correspondente à região *hotspot* do mesmo isolado (isolado I21).

4.8.3 O sequenciamento do gene *cytB* em *P. euvitis*

A sequência que serviu como base para o desenho dos *primers* específicos para o GW foi a obtida pelo sequenciamento da região *hotspot* do isolado FV1 (Piracicaba/SP). A construção dos *primers* seguiu as instruções do manual do fabricante do kit e o programa Gene Runner (GENE RUNNER, 2014) foi usado para verificar a qualidade dos *primers* desenhados.

A digestão do DNA total foi feita com as enzimas de restrição *StuI* e *PvuII*. As reações de purificação, ligação dos fragmentos aos adaptadores e amplificação por PCR foram feitas

de acordo com as instruções do fabricante. O isolado escolhido para o sequenciamento do gene *cytB* em *P. euvitis* foi o FV1 (Piracicaba/SP).

A verificação da amplificação (eletroforese em gel de agarose 1,5%), a purificação do amplificado, o sequenciamento e confirmação da especificidade das sequências obtidas foi feita de acordo com o descrito anteriormente nos itens 4.5.1 e 4.6.4.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da região *hotspot* do gene *cytB*

A seguir são descritos os resultados obtidos para cada espécie nas etapas seguidas para a caracterização da região *hotspot* do gene *cytB*.

5.1.1 *S. ampelinum*

5.1.1.1 Extração de DNA total

Foi possível extrair de maneira eficiente o DNA total dos isolados de *S. ampelinum* utilizando-se o protocolo adaptado como descrito na metodologia de Lee e Taylor (1990). A Figura 12 mostra um gel de eletroforese com algumas amostras de DNA total extraído. É possível observar a presença de uma banda única, de alto peso molecular e sem sinal de degradação. Pelo resultado das medições no espectrofotômetro verificou-se que as amostras de DNA estavam sem contaminantes como proteínas e fenol e que o rendimento variou de 0,8 a 1,5µg de DNA extraído por amostra.

Figura 12 – Gel de eletroforese com amostras de DNA total extraído dos isolados de *S. ampelinum*. Foram carregados 5µL de marcador (M) 1Kb Ladder (Fermentas) e 5µL das amostras de DNA (isolados estão identificados pelos números). Concentração de agarose no gel: 0,8%. Tempo de corrida: 1 hora a 50V. Tampão para corrida: TBE 0,5X

5.1.1.2 Primers para amplificar a região *hotspot*

Com base na porção conservada do alinhamento da sequência obtida pelos *primers* degenerados (Apêndice) com as CDSs do gene *cytB* dos Dothideomycetes foi desenhado o *primer* PHSR, que atua como *primer* reverso na amplificação da região *hotspot* (Tabela 6). Já na porção compreendida pelas posições 814 a 833 pb do alinhamento foi desenhado o *primer*

degenerado PDHSF que atua como *primer* direto na reação de amplificação da região *hotspot* (Tabela 6). A Figura 13 mostra o posicionamento dos *primers* PHSR e PDHSF em relação ao alinhamento das CDS dos Dothideomycetes com a sequência parcial do gene *cytB* de *S. ampelinum*.

Tabela 6 – *Primers* utilizados para a amplificação da região *hotspot* em *S. ampelinum*

<i>Primer</i>	Sequência 5' - 3'	Temperatura <i>melting</i>	Produto esperado (a)
PDHSF	GAT(R)G(H)TACAGCCTTC(Y)TGC	60°C	258 pb
PHSR	TCCTACTGTATCGTGTAATGC	54°C	

Nota: ^(a) com base no posicionamento dos *primers* no alinhamento das CDSs dos Dothideomycetes.

^(R) representa os nucleotídeos A ou G.

^(H) representa os nucleotídeos C, T ou A.

^(Y) representa os nucleotídeos C ou T.

Figura 13 – Posicionamento dos *primers* PDHSF e PHSR desenhados para amplificar a região *hotspot* do gene *cytB* em *S. ampelinum*

5.1.1.3 Amplificação e sequenciamento da região *hotspot* do gene *cytB*

Foram feitas várias reações de amplificação usando-se os *primers* PDHSF e PHSR modificando-se a temperatura de anelamento (de 48°C a 53°C), a quantidade de magnésio usada (de 2 a 4mM de MgCl₂ por reação) e a quantidade de *primers* por reação (de 0,4 a 0,8μM), mas não se obteve nenhum produto dos PCRs (resultado não mostrado). Dessa forma, não foi possível amplificar e sequenciar a região *hotspot* nos isolados de *S. ampelinum*.

5.1.2 *P. viticola*

5.1.2.1 Extração de DNA total

O protocolo adaptado como descrito na metodologia de Lo Piccolo et al. (2012) foi eficiente para a extração de DNA total dos isolados de míldio, como pode ser visto pelo gel de eletroforese em agarose da Figura 14. O rendimento do processo foi de 1 a 2,0µg de DNA extraído sem contaminantes por amostra. Visto que a extração foi feita a partir de folhas de videira, a amostra extraída corresponde ao DNA genômico e mitocondrial dos patógenos e ao DNA genômico, mitocondrial e cloroplastidial da videira.

Figura 14 – Gel de eletroforese com amostra de DNA total extraído de *P. viticola*. Foram carregados 5µL de marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen) e 3µL da amostra I21 (isolado I21). Concentração de agarose no gel: 0,8%. Tempo de corrida: 1 hora a 50V. Tampão para corrida: TBE 0,5X

5.1.2.2 Amplificação e sequenciamento da região *hotspot* do gene *cytB*

Por meio da eletroforese em gel de agarose das reações de PCR de *P. viticola* foi possível verificar que os *primers* COB279_F e StrobiR amplificaram um único produto de aproximadamente 500 pb em cada isolado, como é mostrado pela Figura 15, que mostra o produto de PCR obtido para o isolado I4 de *P. viticola*.

Figura 15 - Gel de eletroforese com amostra amplificada de *P. viticola* (isolado I4). Foram carregados 3 μ L de marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen) e 4 μ L da amostra (I4) de *P. viticola* e do controle negativo (-). Concentração de agarose no gel: 1,2%. Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos a 50V. Tampão para corrida: TBE 0,5X

O produto de 500 pb amplificado em todos os isolados foi purificado satisfatoriamente pelo kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) como pode ser visto pela Figura 16. Por inspeção manual do cromatograma das sequências obtidas a partir das amostras purificadas foi possível verificar a presença de picos altos, bem definidos, pouco espaçados e com pouco ruído (picos menores), indicando boa qualidade do sequenciamento. A Figura 17 representa o padrão observado nos cromatogramas das sequências de *P. viticola* do estudo.

Figura 16 - Gel de eletroforese com amostra purificada do isolado I4 de *P. viticola*. Foram carregados 4 μ L de marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen) e 5 μ L da amostra I4. Concentração de agarose no gel: 1,2%. Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos a 50V. Tampão para corrida: TBE 0,5X

Figura 17 - Cromatograma da sequência de DNA do isolado I3 de *P. viticola*. A porção mostrada compreende a região da posição 219 a 250 pb do sequenciamento

O resultado do BLASTN das sequências obtidas mostrou alta porcentagem de identidade (variando de 97 a 99%) e de cobertura (variando de 96 a 99%) com *hits* do gene *cytB* de *P. viticola* depositados no *GenBank*, o que confirma a especificidade dos produtos amplificados e sequenciados pelos *primers* COB279_F e StrobiR (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados do BLASTN para as sequências obtidas de cada isolado de *P. viticola* pela amplificação da região *hotspot*

Sequência (<i>query</i>)	<i>Hit</i> com melhor resultado	Identidade	Cobertura	<i>E</i> - <i>value</i>
509 pb - isolado I1	<i>Plasmopara viticola</i> - haplótipo Eu IS' apocitocromo b (COB)	99%	99%	0,0
513 pb - isolado I2	<i>Plasmopara viticola</i> haplótipo Eu IR' apocitocromo b (COB)	99%	98%	0,0
506 pb - isolado I3	<i>Plasmopara viticola</i> haplótipo Eu IR apocitocromo b (COB)	99%	99%	0,0
512 pb - isolado I4	<i>Plasmopara viticola</i> haplótipo Eu IR apocitocromo b (COB)	99%	96%	0,0
515 pb - isolado I5	<i>Plasmopara viticola</i> haplótipo Eu IR apocitocromo b (COB)	99%	99%	0,0
514 pb - isolado I7	<i>Plasmopara viticola</i> haplótipo Eu IR apocitocromo b (COB)	99%	98%	0,0
513 pb - isolado I8	<i>Plasmopara viticola</i> haplótipo Eu IIS' apocitocromo b (COB)	98%	97%	0,0
513 pb - isolado I9	<i>Plasmopara viticola</i> haplótipo Eu IR apocitocromo b (COB)	99%	97%	0,0
514 pb - isolado I10	<i>Plasmopara viticola</i> haplótipo Eu IR apocitocromo b (COB)	99%	99%	0,0
515 pb - isolado I11	<i>Plasmopara viticola</i> haplótipo Eu IR apocitocromo e b (COB)	99%	98%	0,0
513 pb - isolado I14	<i>Plasmopara viticola</i> haplótipo Eu IR apocitocromo b (COB)	99%	97%	0,0
511 pb - isolado I16	<i>Plasmopara viticola</i> haplótipo Eu IR apocitocromo b (COB)	99%	96%	0,0
512 pb - isolado I19	<i>Plasmopara viticola</i> haplótipo Eu IR apocitocromo b (COB)	97%	99%	0,0
514 pb - isolado I20	<i>Plasmopara viticola</i> haplótipo Eu IS' apocitocromo b (COB)	99%	98%	0,0
510 pb - isolado I21	<i>Plasmopara viticola</i> haplótipo Eu IS' apocitocromo b (COB)	99%	97%	0,0

5.1.2.3 Caracterização da região *hotspot* do gene *cytB*

Pela inspeção manual do alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos dos isolados em estudo com as sequências referências do *GenBank* foi possível verificar que 11 isolados de *P. viticola* possuem o aminoácido alanina na posição 143 da cadeia polipeptídica (Figura 18), sendo, portanto, considerados geneticamente resistentes aos fungicidas do tipo QoI. De acordo com o que é descrito na literatura a substituição G143A os confere resistência total (ou qualitativa). A mutação observada que confere essa substituição de resíduos é a transverso de uma guanina para citosina, na segunda base da trinca de DNA que codifica para o aminoácido 143 (Figura 19).

Dos isolados em estudo apenas 4 não abrigam substituições nas posições 129, 137 e 143, o que sugere que, com base nas informações de sequenciamento, esses isolados sejam sensíveis aos fungicidas do tipo QoI. A Tabela 8 apresenta de forma resumida o que é mostrado pelas Figuras 18 e 19, com os identificadores dos isolados e o fenótipo esperado de acordo com o sequenciamento.

Figura 18 – Alinhamento múltiplo das sequências dos isolados de *P. viticola* em estudo mostrando os aminoácidos que ocupam as posições 129, 137 e 143

Figura 19 – Alinhamento múltiplo das sequências dos isolados de *P. viticola* em estudo mostrando as trincas de bases que ocupam as posições correspondentes aos aminoácidos 129, 137 e 143. É possível verificar na posição 143 a transversão da segunda base da trinca de G para C nos isolados resistentes

Tabela 8 – Isolado e cidade de origem, a trinca de bases e o aminoácido em cada uma das três posições (considerando a sequência de aminoácidos) e o fenótipo esperado de acordo com a caracterização genética da região *hotspot*

Isolado	Cidade de origem	Bases/aminoácido na posição			Fenótipo esperado
		129	137	143	
I1	Jarinu/SP	TTT/F	GGA/G	GGT/G	SENSÍVEL
I2	São Miguel Arcanjo/SP	TTT/F	GGA/G	GCT/A	RESISTENTE
I3	São Miguel Arcanjo/SP	TTT/F	GGA/G	GCT/A	RESISTENTE
I4	Flores da Cunha/RS	TTT/F	GGA/G	GCT/A	RESISTENTE
I5	Garibaldi/RS	TTT/F	GGA/G	GCT/A	RESISTENTE
I7	São Miguel Arcanjo/SP	TTT/F	GGA/G	GCT/A	RESISTENTE
I8	Bento Gonçalves/RS	TTT/F	GGA/G	GGT/G	SENSÍVEL
I9	Cotiporã/RS	TTT/F	GGA/G	GCT/A	RESISTENTE
I10	Piracicaba/SP	TTT/F	GGA/G	GCT/A	RESISTENTE
I11	Jundiaí/SP	TTT/F	GGA/G	GCT/A	RESISTENTE
I14	Juazeiro/BA	TTT/F	GGA/G	GCT/A	RESISTENTE
I16	Juazeiro/BA	TTT/F	GGA/G	GCT/A	RESISTENTE
I19	São Roque/SP	TTT/F	GGA/G	GCT/A	RESISTENTE
I20	Piracicaba/SP	TTT/F	GGA/G	GGT/G	SENSÍVEL
I21	Jundiaí/SP	TTT/F	GGA/G	GGT/G	SENSÍVEL

5.1.3 *P. euvitis*

5.1.3.1 Extração de DNA total

O protocolo adaptado como descrito na metodologia de Lo Piccolo et al. (2012) foi eficiente para a extração de DNA total dos dois isolados de ferrugem, como pode ser visto pelo gel de eletroforese em agarose da Figura 20. Assim como para *P. viticola*, o rendimento do processo foi de 1 a 2,0µg de DNA extraído sem contaminantes por amostra. Visto que a

extração foi feita a partir de folhas de videira, a amostra extraída corresponde ao DNA genômico e mitocondrial do patógeno e ao DNA genômico, mitocondrial e cloroplastidial da videira.

Figura 20 – Gel de eletroforese com amostra de DNA total extraído de *P. euvitis*. Foram carregados 5µL de marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen) e 3µL da amostra de *P. euvitis* (isolados FV1 e FV2). Concentração de agarose no gel: 0,8%. Tempo de corrida: 1 hora a 50V. Tampão para corrida: TBE 0,5X

5.1.3.2 *Primers para amplificar a região hotspot*

Na região mais conservada do alinhamento das sequências de *P. pachyrhizi* e *P. meibomiae* foi desenhado o *primer* PFFH (*upstream* à região *hotspot*) que atua como *primer* direto e o *primer* PRFH (*downstream* à região *hotspot*) que atua como reverso (Tabela 9, Figura 21).

Tabela 9 - *Primers* utilizados para a amplificação da região *hotspot* do gene *cytB* em *P. euvitis*

<i>Primer</i>	Sequência 5'- 3'	Temperatura <i>melting</i>	Produto esperado
PFFH	TATAAGAGATGTAGAGTACGG	58°C	226 pb
PRFH	ACCTCATAGTGATATCTGTCC	60°C

Figura 21 – Posicionamento dos *primers* PFFH e PRFH desenhados para amplificar a região *hotspot* do gene *cytB* em *P. euvitis*

5.1.3.3 Amplificação e sequenciamento da região *hotspot* do gene *cytB*

Os *primers* PFFH e PRFH foram eficientes na amplificação de um único fragmento de tamanho aproximado de 400 pb, como pode ser visto pela Figura 22, que mostra o gel de eletroforese em agarose de amostras amplificadas dos isolados FV1 e FV2. Apesar do tamanho dos fragmentos amplificados ter sido maior que o esperado, tendo-se em vista o posicionamento dos *primers* construídos, os produtos de PCR foram purificados (Figura 23) e sequenciados.

Figura 22 - Gel de eletroforese com amostra amplificada de *P. euvitis*. Foram carregados 3µL de marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen) e 4µL das amostras FV1, FV2 e do controle negativo (-). Concentração de agarose no gel: 1,2%. Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos a 50V. Tampão para corrida: TBE 0,5X

Figura 23 - Gel de eletroforese com amostra purificada dos isolados FV1 (esquerda) e FV2 (direita) de *P. euvitis*. Foram carregados 4µL de marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen) e 5µL da amostra FV1 e FV2. Concentração de agarose no gel: 1,2%. Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos a 50V. Tampão para corrida: TBE 0,5X

No cromatograma das amostras sequenciadas de *P. euvitis* foi possível verificar picos altos, bem definidos, pouco espaçados e com pouco ruído (picos menores), indicando boa qualidade do sequenciamento, como mostra a Figura 24, com parte do cromatograma das sequências de FV1 e FV2.

24 – Cromatograma da sequência de DNA do isolado FV1 e do isolado FV2 de *P. euvitis*. A parte mostrada para o FV1 compreende a região da posição 201 a 225 pb do sequenciamento, já para o isolado FV2 compreende da posição 172 a 199 pb

O resultado do BLASTN para as sequências obtidas mostrou alta porcentagem de identidade (variando de 81 a 89%) e de cobertura (variando de 81 a 96%) com *hits* da sequência da mitocôndria de *P. meibomiae* e de *P. pachyrhizi*, o que sugere que as sequências sejam de *P. evitis* (Tabela 10).

Figura 10 - Resultados do BLASTN para as sequências de *P. euvitis* obtidas na amplificação da região *hotspot*

Sequência (<i>query</i>)	<i>Hit</i> com melhor resultado	Identidade	Cobertura	<i>E-value</i>
193 pb - isolado FV1	<i>Phakopsora meibomia</i> genoma mitocondrial completo	89%	96%	8e-64
215 pb - isolado FV2	<i>Phakopsora pachyrhizi</i> genoma mitocondrial completo	81%	81%	6e-34

5.1.3.4 Caracterização da região *hotspot* do gene *cytB*

Pela inspeção manual do alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos dos isolados de *P. euvitis* com as sequências referência do *GenBank* foi possível verificar que os dois isolados em estudo não possuem as substituições de aminoácidos nas posições 129, 137 e 143, sendo, portanto, considerados geneticamente sensíveis aos fungicidas do tipo QoI (Figuras 25, 26 e Tabela 11).

Figura 25 – Alinhamento múltiplo com as sequências dos isolados de *P. euvitis* em estudo mostrando os aminoácidos que ocupam as posições 129, 137 e 143

Figura 26 – Alinhamento múltiplo com as sequências dos isolados de *P. euvitis* em estudo mostrando as trincas de bases que ocupam as posições equivalentes aos aminoácidos 129, 137 e 143

Tabela 11 - Isolado e cidade de origem, a trinca de bases e os aminoácidos em cada uma das três posições (considerando a sequência de aminoácidos) e o fenótipo esperado de acordo com a caracterização genética da região *hotspot*

Isolado	Cidade de origem	Bases/aminoácido na posição			Fenótipo esperado
		129	137	143	
FV1	Piracicaba/SP	TTT/F	GGA/G	GGT/G	Sensível
FV2	Piracicaba/SP	TTT/F	GGA/G	GGT/G	Sensível

5.2 O sequenciamento do gene *cytB*

5.2.1 *S. ampelinum*

Com base na sequência parcial do gene *cytB* de *S.ampelinum* obtida pela amplificação com os *primers* degenerados (Apêndice) foram desenhados dois *primers* específicos para o GW nessa espécie (Tabela 12). O *primer* GSP1S foi utilizado em conjunto com o *primer* AP1 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3') na reação de PCR primário e o *primer* GSP21S em conjunto com o *primer* AP2 (5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3') na reação de PCR secundário. Ambos os *primers* amplificam uma região desconhecida *upstream* à sequência usada como base para o desenho (Figura 27).

Tabela 12 - *Primers* utilizados para amplificação de parte do gene *cytB* em *S. ampelinum* através da estratégia de GW

<i>Primer</i>	Sequência 5' – 3'	Temperatura de <i>melting</i>
GSP1S (PCR primário)	GGTGCGAATGGTAAT CTATCATAGTTTCC	59,6°C
GSP21S (PCR secundário)	TCCTGATATACCTAA AGGGTTATTAGCTCC	59,6°C

Figura 27 – Esquema representando os *primers* utilizados no GW, desenhados com base na sequência parcial do gene *cytB* de *S.ampelinum*

Apesar dos esforços, os *primers* desenhados não apresentaram a temperatura de anelamento e porcentagem de bases GC de acordo com o indicado pelo manual do fabricante do kit, pois a sequência usada para o desenho dos *primers* tinha muitas repetições das bases A e T, em blocos, o que dificultou o desenho adequado dos mesmos.

Após as reações de PCR primário e secundário foi possível verificar pela eletroforese a presença de um produto amplificado com tamanho entre 2 e 3 kb, que apareceu com maior intensidade no gel (Figura 28). Além desse, outros produtos com vários tamanhos foram amplificados, porém apareceram como bandas menos intensas.

Figura 28 - Gel de eletroforese com a amostra de *S. ampelinum* amplificada pela técnica de GW. Foram carregados 3µL de marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen) e 4µL do produto de PCR (1) e do controle negativo da reação (-). O produto amplificado indicado pela seta foi excisado do gel e purificado. Concentração de agarose no gel: 1,5% Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos a 50V. Tampão de corrida: TBE 0,5X

O cromatograma da sequência da banda que foi excisada do gel (indicada pela seta na Figura 28) apresentou picos muito baixos e pouco definidos e, às vezes, com sobreposições em uma só posição, sendo que não foi possível confirmar a especificidade do produto de PCR pois o BLASTN não mostrou resultados confiáveis (*E-value* muito alto).

5.2.2. *P. viticola*

Com base na sequência parcial do gene *cytB* obtida pela amplificação da região *hotspot* foi possível desenhar dois *primers* para o sequenciamento desse gene em *P. viticola* (Tabela 13). O *primer* GSP1_PV1 foi utilizado na reação de PCR primário (junto ao *primer* AP1) e o *primer* GSP2_PV1 foi utilizado na reação de PCR secundário (junto ao *primer* AP2). Ambos os *primers* amplificam uma região desconhecida *upstream* à sequência usada como base para o desenho (Figura 29).

Tabela 13 - Primers utilizados para amplificação de parte do gene *cytB* em *P. viticola* através da estratégia de GW

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'	Temperatura de <i>melting</i>
GSP1_PV1	AGGCAAAACATAACCCATAAATGCAG	57°C
GSP2_PV1	CCTGAACACCATAAAGCTTCTCTAGGTG	59°C

Figura 29 - Esquema representando os *primers* da estratégia de GW desenhados com base na sequência de parcial do gene *cytB* em *P. viticola*

Através do PCR primário e secundário utilizando-se os *primers* GSP1_PV1 e GSP2_PV foi possível obter produtos amplificados de diferentes tamanhos, dependendo da enzima que foi utilizada na digestão do DNA *template*, anterior às reações de PCR. Na reação que usou como *template* o DNA digerido com *DraI* foi possível verificar pelo gel de eletroforese a presença de um único produto de PCR de aproximadamente 300 pb; já na reação que usou como *template* o DNA digerido com a enzima *PvuII* foi obtido um produto amplificado de pouco menos de 1650 pb (Figura 30).

Figura 30 - Gel de eletroforese com amostra amplificada de *P. viticola* na estratégia de GW. Foram corridos 3µL do marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen), 5µL do controle negativo (-) e das amostras 1 de cada gel. Os *primers* utilizados para as reações estão indicados na figura. Os produtos indicados pelas setas foram purificados e sequenciados. Concentração de agarose no gel: 1,5%. Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos a 40V. Tampão para corrida: TBE 0,5X

As bandas indicadas na figura pelas setas pretas foram purificadas e sequenciadas e foram obtidas sequências variando de 280 a 900 pb das amostras.

O resultado do BLASTN para as sequências obtidas mostrou alta porcentagem de identidade (variando de 96 a 99%) e de cobertura (variando de 96 a 99%) com *hits* do gene *cytB* de *P. viticola* que estão depositados no *GenBank*, o que confirma a especificidade dos produtos amplificados pela estratégia de GW.

Essas sequências junto às aquelas obtidas pelo sequenciamento da região *hotspot* representam 750 pb do gene *cytB* de *P. viticola*, ou seja, cobrem 65% da referência usada para a montagem, abrangendo da posição 68 à posição 818 da sequência de nucleotídeos. Não foi verificada a presença de íntrons.

Através da inspeção manual do alinhamento múltiplo das sequências foi possível observar a presença de três polimorfismos (Tabela 14) que não provocam substituição no aminoácido codificado pelo respectivo códon (mutação sinônima). Além disso, não foram detectadas inserções ou deleções.

Tabela 14 - Polimorfismos observados na sequência de parte do gene *cytB* de *P. viticola*

Posição (pb)	Mutação	Aminoácido codificado
245	CAC -> CAT	Histidina -> Histidina
452	TTT -> TTC	Fenilalanina -> Fenilalanina
779	GCG -> GCA	Alanina -> Alanina

5.2.3 *P. euvitis*

A partir da sequência parcial do gene *cytB* obtida pela amplificação da região *hotspot* foi possível desenhar quatro *primers* para o sequenciamento do gene *cytB* em *P. euvitis* (Tabela 15). Os *primers* GSP1_Pe e GSP3F_Pe foram usados nas reações de PCR primário (junto ao *primer* AP1) e os *primers* GSP2_Pe e GSP4F_Pe foram utilizados nas reações de PCR secundário (junto ao *primer* AP2) (Figura 31).

Tabela 15 - *Primers* desenhados para sequenciamento de parte do gene *cytB* em *P. euvitis* pela técnica de GW

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'	Temperatura de <i>melting</i>
GSP1_Pe	TCCGTACTCTACATCTCTTATAATATGC	66°C
GSP2_Pe	GGTGTATAATGCATCGCCAGAGTTACC	74°C
GSP3F_Pe	AGCATATTATAAGAGATGTAGAGTACGG	66°C
GSP4F_Pe	TTACAAGGCACCAAGGACACTTGTATGG	76°C

Figura 31 - Esquema representando os *primers* da estratégia de GW desenhados com base na sequência de parte do gene *cytB* em *P. euvitis*

Pelas reações do PCR primário no sentido *upstream* foi possível amplificar fragmentos de tamanhos distintos a partir do DNA digerido com as enzimas *PvuII* e *StuI*. Alguns fragmentos foram preferencialmente amplificados, aparecendo com maior intensidade no gel de eletroforese (Figura 32). A reação que usou como *template* o DNA digerido com a enzima

StuI produziu produtos amplificados em maior número e tamanho, já o PCR que usou como *template* o DNA digerido com a enzima *PvuII* produziu produtos menores e em menor quantidade. O PCR secundário feito a partir do produto diluído da reação primária, do qual se esperaria a amplificação preferencial de algumas bandas, resultou em inúmeros fragmentos amplificados de tamanhos distintos, variando de 500 pb à 12 Kpb (Figura 32).

Figura 32 - Gel de eletroforese com amostras amplificadas de *P. euvitis* na estratégia de GW (sentido *upstream*). Foram corridos 3μL do marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen), 5μL do controle negativo (-) e das amostras 1 (DNA *template* digerido com *PvuII*) e 2 (DNA *template* digerido com *StuI*). Concentração de agarose no gel: 1,5%. Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos a 40V. Tampão para corrida: TBE 0,5X

Pelo resultado observado do PCR secundário pode-se deduzir que os *primers* utilizados para a estratégia de GW não foram específicos o suficiente e se anelaram em muitos locais do genoma, o que causou a amplificação de inúmeros fragmentos que não puderam ser distinguidos e, por consequência, sequenciados.

As reações de PCR primário no sentido *downstream* possibilitaram a amplificação de fragmentos de diferentes tamanhos e com diferentes intensidades a partir do DNA digerido com as enzimas *PvuII* e *StuI*, como pode ser visto pela Figura 33. Porém, assim como no caso das reações de PCR no sentido *upstream*, o gel de eletroforese do PCR secundário mostrou a amplificação de inúmeros fragmentos pouco distinguíveis no gel, formando um rastro (Figura 33).

Esses produtos de PCR também não puderam ser aproveitados para a purificação e o sequenciamento e, por isso, não foi feita a extensão do sequenciamento do gene *cytB* no sentido *downstream*, o que possibilitaria o sequenciamento do íntron após a região *hotspot*.

Figura 33 - Gel de eletroforese com amostras amplificadas de *P. euvitis* na estratégia de GW (sentido *downstream*). Foram corridos 3 μ L do marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen), 5 μ L do controle negativo (-) e das amostras 1 (DNA *template* digerido com *PvuII*). Não é mostrado o gel para o DNA digerido com *StuI*. Concentração de agarose no gel: 1,5%. Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos a 40V. Tampão para corrida: TBE 0,5X

6 DISCUSSÃO

A caracterização da região *hotspot* do gene *cytB* revelou a presença de isolados geneticamente resistentes aos fungicidas QoI

No presente estudo foi investigada a estrutura do gene *cytB* e a ocorrência de mutações associadas à resistência aos fungicidas do tipo QoI em três espécies de patógenos da videira: *S. ampelinum*, *P. viticola* e *P. euvitis*. Até o momento, não existiam trabalhos com tal objetivo para essas espécies no Brasil.

A ocorrência de indivíduos resistentes à ação dos fungicidas é um dos motivos de preocupação no manejo fitossanitário desde a década de 60, quando foram observados os primeiros casos em patógenos de citros, maçã e cereais (ECKERT, 1982 *apud* BRENT; HOLLOMON, 2007).

A resistência aos fungicidas do tipo QoI foi primeiramente observada no ano de 1998 e a partir de então os estudos moleculares feitos apontaram três mutações na sequência do gene *cytB* como possíveis causas para a resistência mostrada pelos patógenos: as mutações que provocam as substituições F129L e G137R, que conferem resistência quantitativa ou parcial, e a que leva à substituição G143A, que confere resistência qualitativa ou completa (FRAC, 2015).

A utilização da técnica de PCR é uma forma rápida, viável e muito usada para a detecção dessas mutações em uma população de patógeno na qual há interesse (MA; FELTS; MICHAILIDES, 2003); nesse estudo essa técnica se mostrou eficiente na triagem dos isolados de *P. viticola* e *P. euvitis*.

A eficiência de uma reação de PCR depende, dentre outros fatores, do correto anelamento entre os *primers* e a sequência *template* e essa etapa da reação é relacionada a especificidade da sequência de um *primer*. A baixa especificidade pode ter sido a causa das reações de amplificação da região *hotspot* não terem funcionado no caso de *S. ampelinum*. Para essa espécie não existem sequências disponíveis do gene *cytB* e os *primers* aqui usados foram feitos com base em sequências de espécies da mesma classe taxonômica de *S. ampelinum*, o que não indica que as sequências sejam conservadas o suficiente para o desenho dos *primers*.

Para *P. viticola* e *P. euvitis* os *primers* utilizados nesse estudo foram eficientes na amplificação da região *hotspot* dos isolados; cabe ressaltar que os construídos para *P. euvitis*

são *primers* inéditos e permitiram a caracterização de uma região antes desconhecida para essa espécie.

A caracterização da região *hotspot* nos isolados de *P. viticola* mostrou a presença da mutação que leva à substituição G143A em 11 dos 15 isolados em estudo, que foram considerados geneticamente resistentes aos fungicidas do tipo QoI. As substituições F129L e G137R não foram observadas nos isolados desse estudo e esse resultado corrobora com o que é descrito na literatura (CHEN et al., 2007).

A resistência genética encontrada nos isolados brasileiros de míldio provenientes de vários locais é esperada dado o fato de *P. viticola* ter um ciclo de vida rápido, esporulação abundante, alta dispersão dos esporos e de seu controle basear-se majoritariamente no uso dos fungicidas do tipo QoI (BRENT; HOLLOMON, 2007; EPPO, 2015). A descoberta de indivíduos resistentes é condizente com o cenário visto no campo: a presença de videiras apresentando os sintomas da doença mesmo após a aplicação intensa dos fungicidas. Em um estudo realizado com isolados europeus de *P. viticola* também foram detectados indivíduos geneticamente resistentes aos fungicidas QoI até mesmo em populações que foram aspergidas com apenas 0,05% da dose recomendada pelo fabricante do fungicida, o que é consideravelmente menor que a quantidade aplicada por muitos viticultores no Brasil.

A substituição G143A faz com que o patógeno apresente resistência qualitativa ao fungicida, isto é, seja consideravelmente menos sensível ao controle químico do que os isolados selvagens. No trabalho de Chen et al. (2007) os isolados de *P. viticola* considerados resistentes aos fungicidas QoI apresentaram IC₅₀ (concentração necessária para reduzir em 50% o crescimento) maior que 100mg/L enquanto que isolados sensíveis apresentaram IC₅₀ menor que 10mg/L. Nesse estudo, porém, não foram feitos os ensaios de monitoramento *in vitro* ou *in vivo* da sensibilidade dos isolados aos fungicidas. Uma das perspectivas futuras é que esses testes sejam realizados e que seus resultados sejam comparados aos obtidos com as análises genéticas *in silico*.

A existência de isolados de míldio geneticamente sensíveis mesmo em parreirais com aplicação dos fungicidas, o que resulta no aumento da pressão seletiva, pode ser explicada quando se leva em consideração a forma como o fenômeno da resistência evolui em uma população. A primeira fase da evolução consiste no surgimento de indivíduos mutantes e a sua invasão na população selvagem; neste período o número de indivíduos resistentes ainda é muito pequeno, sendo que esses tendem a aumentar após sucessivas aplicações do fungicida, o que ocorre na segunda fase (HOBBELEN et al., 2014). Como a amostragem nesse estudo foi pequena, existe a possibilidade dos isolados considerados sensíveis pertencerem a uma

população que ainda está na primeira fase da evolução da resistência, ou seja, a frequência dos indivíduos com mutação é baixa quando comparada à frequência dos indivíduos selvagens. É provável que com o tempo, após mais ciclos da cultura e uso contínuo dos fungicidas, a mutação se estabeleça na população, como já foi reportado para outros patógenos nos quais a resistência só foi detectada após algum tempo decorrido do início do uso do controle químico (MATASCI et al., 2008).

Os dois isolados brasileiros de ferrugem foram considerados geneticamente sensíveis aos fungicidas do tipo QoI, pois não possuem nenhuma das mutações descritas na literatura relacionadas à resistência. Em isolados brasileiros de *P. pachyrhizi* já foi detectada a substituição F129L, que confere resistência quantitativa (KLOSOWSKI et al., 2015), já em *P. meibomiae* e em outras espécies de ferrugem estudadas nunca foi reportada a presença de mutações relacionadas à resistência aos fungicidas QoI (SCHMITZ et al., 2013).

A ausência da mutação que leva à substituição G143A pode ser explicada, pois considerando-se que as espécies filogeneticamente próximas à *P. euvtis* possuem um íntron do tipo I após o códon para glicina na posição 143, é esperado que essa espécie também o tenha, inviabilizando assim o estabelecimento dessa mutação (STONE et al., 2010). No entanto, é esperada a presença das substituições F129L e G137R, pois a ferrugem, assim como o míldio, possui ciclo de vida rápido e produz muitos esporos que são facilmente dispersos pelo ambiente (BRENT; HOLLOMON, 2007); além disso, as substituições dos aminoácidos não conferem redução no custo adaptativo (*fitness*) desse patógeno (KARAOGLANIDIS et al., 2011; VELOUKAS et al., 2014).

Dessa forma, existem duas hipóteses que podem explicar a presença dos dois isolados sensíveis. A primeira hipótese é de que os isolados aqui estudados também pertençam a uma população que está na primeira fase da evolução da resistência, assim como proposto para os isolados sensíveis de *P. viticola*. É provável que, após sucessivas aplicações de fungicida para o controle da ferrugem, sejam encontrados isolados resistentes na população. A segunda hipótese é que a ineficiência no controle da ferrugem possa ser causada pela mudança na sensibilidade do patógeno a outros tipos de fungicidas usados pelos produtores, como foi observado no caso de alguns isolados da ferrugem de soja, que apesar de sensíveis aos fungicidas do tipo QoI, são resistentes aos fungicidas do grupo dos inibidores da demetilação - DMI ou IDM (REIS et al., 2015; SCHMITZ et al., 2013).

A ausência de isolados resistentes de míldio e de ferrugem em alguns locais não implica em se abusar do uso do controle químico no campo, principalmente porque tais compostos podem trazer problemas à saúde e ao meio ambiente (WIGHTWICK et al., 2010).

Para *S. ampelinum*, que desse estudo é a espécie com menos informações disponíveis, é interessante a realização de trabalhos de mutagênese que mostrem se a presença de mutações no gene *cytB* pode trazer prejuízos ao *fitness* do patógeno, principalmente caso nenhuma seja encontrada, sugerindo que a resistência aos fungicidas QoI em *S. ampelinum* não se estabelece dado seu custo para a adaptação; esse tipo de estudo já foi realizado para vários fitopatógenos, dentre esses *Botrytis cinerea* (LALLEVE et al., 2014).

A estratégia de GW permitiu o sequenciamento de parte do gene *cytB* em um isolado brasileiro de *P. viticola*

Além da importância da região *hotspot*, como mencionado anteriormente a estrutura do gene *cytB* acarreta em consequências para o estabelecimento das mutações que conferem resistência aos fungicidas. Nesse estudo, através da técnica de GW foi possível sequenciar 65% do gene *cytB* de um isolado brasileiro de *P. viticola*, não sendo observada a presença de íntrons; esse resultado é condizente com o que é descrito na literatura para essa espécie (GIRESSE et al., 2010; GRASSO et al., 2006). Apesar do gene *cytB* já ter sido sequenciado na espécie *P. viticola*, esse tipo de estudo ainda é importante pois já foi relatado que isolados de uma mesma espécie podem apresentar diferentes números e tamanhos de íntron, como descrito para *Botrytis cinerea* (LEROUX et al., 2010) e *Saccharomyces cerevisiae* (FOURY et al., 1998).

Apesar da estratégia de GW ter funcionado para *P. viticola*, não foi possível sequenciar o gene *cytB* em *S. ampelinum* e *P. euvitis*, visto que os resultados obtidos não foram satisfatórios. No caso de *S. ampelinum*, após as duas reações de PCR foram obtidos produtos amplificados que puderam ser purificados do gel, porém o sequenciamento não foi realizado com sucesso, possivelmente porque os *primers* desenhados para o GW não se anelaram corretamente à sequência *template* durante a reação.

Durante o andamento do estudo foram cogitadas outras abordagens para a amplificação do gene *cytB* em *S. ampelinum*. Uma dessas foi o desenho de *primers* nos genes vizinhos, porém a escassez de informação com relação ao arranjo dos genes mitocondriais, que é altamente variável entre espécies de um mesmo grupo (AGUILETA et al., 2014), inviabilizou a realização dessa estratégia.

Já no caso de *P. euvitis* o problema pode ter sido a baixa especificidade dos *primers* desenhados, pois após a segunda reação de PCR, da qual se espera a obtenção de produtos específicos, o que se observou no gel foi a formação de um rastro de fragmentos de diversos

tamanhos, que não puderam ser purificados; isso pode ser um indicativo de que os *primers* se anelaram em muitas regiões durante o PCR secundário. A formação de produtos inespecíficos durante as reações de amplificação é apontada como uma das principais desvantagens da estratégia de GW, o que tem levantado questionamentos quanto a sua eficiência e reprodutibilidade principalmente para o emprego no estudo de espécies que são pouco conhecidas (JI; BRAAM, 2010; TONOOKA; FUJISHIMA, 2009). Além disso, as estratégias de GW baseadas na restrição do DNA têm sido trocadas por outras por se tratarem de técnicas laboriosas, caras e que requerem muitas reações antes da amplificação das sequências de interesse propriamente ditas (TAN et al., 2005; XU et al., 2013).

Apesar de ser um estudo inicial, com pouca amostragem, os resultados aqui obtidos podem servir como base para outros trabalhos. As melhorias nos protocolos de extração de DNA, nas reações de amplificação da região *hotspot* e nas reações de GW podem servir de ponto de partida para outros estudos. Os *primers* inéditos feitos para *P. euvitis* podem ser úteis para a triagem de outros isolados de ferrugem da videira. Da mesma forma, a parte do gene *cytB* sequenciada de um isolado de *S. ampelinum* pode ser usada em outros trabalhos e não apenas de investigação da região *hotspot*, pois essa sequência é inédita e pertence a uma espécie pouco conhecida e estudada.

Além disso, os resultados aqui mostrados para os isolados de *P. viticola* mostraram que é necessário se repensar nas estratégias atuais de manejo, que hoje dependem majoritariamente de aplicações dos fungicidas do tipo QoI, uma vez que já existem isolados considerados geneticamente resistentes nos parreirais de várias localidades do Brasil.

Uma das maneiras de se retardar o estabelecimento de indivíduos resistentes na população é utilizar de forma alternada dois ou mais fungicidas com diferentes modos de ação; embora essa estratégia não impeça o aparecimento da resistência, já que o potencial genético para o surgimento da mutação sempre existe em uma população de patógenos, ela é amplamente recomendada no manejo com fungicidas (BRENT; HOLLOMON, 2007).

Por fim, unindo-se os resultados das análises *in silico* com resultados do monitoramento *in vitro/in vivo* da sensibilidade dos isolados aos fungicidas, será possível dar bases científicas confiáveis às decisões de manejo das doenças em estudo, de forma condizente com a realidade dos isolados brasileiros dos patógenos de uva.

7 CONCLUSÃO

Esse estudo trata-se da primeira investigação sobre a presença de mutações relacionadas à resistência aos fungicidas do tipo QoI em isolados brasileiros de patógenos da videira. Pela amplificação da região *hotspot* por PCR seguida do sequenciamento Sanger foi possível verificar a presença da substituição G143A, que confere resistência qualitativa, em 11 dos 15 isolados de *P. viticola* estudados; os outros quatro isolados não apresentaram as substituições relacionadas a resistência, assim como os dois isolados de ferrugem do estudo. Os *primers* construídos para a amplificação da região *hotspot* em *P. euvitis* são inéditos e podem servir para o estudo em outros isolados.

A detecção de isolados considerados geneticamente resistentes é um motivo para que se passe a considerar outras formas para o controle dessas doenças em campo e principalmente aquelas formas que sejam menos perigosas ao meio ambiente e à saúde humana e de outros animais. A presença de isolados que não apresentam as mutações pode indicar que a resistência ainda esteja na sua fase de emergência, não significando, no entanto, que isso seja razão para o abuso contínuo das aplicações de fungicidas.

Através da estratégia de GW foi possível sequenciar parte do gene *cytB* de um isolado brasileiro da espécie *P. viticola*, no qual foram encontrados poucos polimorfismos e nenhum íntron, o que está de acordo com o que é descrito na literatura. Infelizmente, não foi possível sequenciar totalmente com sucesso esse gene nos isolados de *S. ampelinum* e *P. euvitis*, no entanto foram feitos avanços significativos no entendimento e realização de boa parte das sucessivas etapas da abordagem GW.

Os resultados aqui apresentados podem servir de base para as estratégias de manejo da resistência aos fungicidas, que tem como objetivo retardar a sua emergência e propagação em uma população de patógenos. Sabe-se que uma vez estabelecida na população, a mutação que confere resistência se propagará e os indivíduos mutantes se fixarão; portanto a melhor medida é o atraso no surgimento e estabelecimento dessas mutações, através, por exemplo, da combinação de fungicidas com modos de ação distintos (HOBBELEN et al., 2014).

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. 952p.
- AGUILETA, G.; DE VIENNE, D.M.; ROSS, O.N.; HOOD, M.E.; PETIT, E.; GIRAUD, T.; GABALDÓN, T. High variability of mitochondrial gene order among Fungi. **Genome Biology and Evolution**, London, v. 6, n. 2, p. 451-465, Feb. 2014.
- ALONSO-VILLAVERDE, V.; VOINESCO, F.; VIRET, O.; SPRING, J.-L.; GINDRO, K. The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: Ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 49, p. 265-274, Jan. 2011.
- ALTSHULT, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct. 1990.
- ASH, G.; STURT, C.; WAGGA, W. **Downy mildew of grape**. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/oomycetes/pages/downymildewgrape.aspx>>. Acesso em: 12 fev. 2016.
- BANNO, S.; YAMASHITA, K.; FUKUMORI, F.; OKADA, K.; UEKUSA, H.; TAKAGAKI, M.; KIMURA, M.; FUJIMURA, M. Characterization of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome b gene. **Plant Pathology**, River Street, v. 58, p. 120-129, Feb. 2009.
- BARBOSA, M.A.G.; CASTRO, J.M.C.; TERAPO, D.; LIMA, M.F.; BATISTA, D.C.; TAVARES, S. C. C. H. Cultivo da Videira. **Sistemas de Produção**, Petrolina, v. 1, p. 1-5, jul. 2010.
- BARTLETT, D.W.; CLOUGH, J.M.; GODWIN, J.R.; HALL, A.A.; HAMER, M.; PARR-DOBRZANSKI, B. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, London, v. 58, n. 7, p. 649-662, Jul. 2002.
- BENSON, D.A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; WHEELER, D.L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, UK, v. 33, p. 34-48, Jan. 2005.
- BOLTON, M.D.; RIVERA, V.; SECOR, G. Identification of the G143A mutation associated with QoI resistance in *Cercospora beticola* field isolates from Michigan, United States. **Pest Management Science**, London, v. 69, n. 1, p. 35-39, Jan. 2013.
- BOUBY, L.; FIGUEIRAL, I.; BOUCHETTE, A.; ROVIRA, N.; IVORRA, S.; LACOMBE, T.; PASTOR, T.; PICQ, S.; MARINVAL, P.; TERRAL, J-F. Bioarchaeological Insights into the Process of Domestication of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) during Roman Times in Southern France. **PLoS One**, San Francisco, v.8, n. 5, p. e63195, May. 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0063195>>. Acesso em: 5 dez. 2015.
- BRENT, K.J.; HOLLOMON, D.W. **Fungicides resistance in crop pathogens: how can it be managed**. 2nd ed. Brussels: NewLine Graphics, 2007. 60p.

CAMARGO, U.A. **Porta-enxertos e cultivares de videira**. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/portaenx.html> Acesso em: 20 abr. 2014.

CAMARGO, U.A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Advances in grape culture in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 144-149, out. 2011

CAPELLO, F.P. **Análise comparativa do custo de produção e rentabilidade da uva 'Niágara Rosada' cultivada em diferentes regiões do Estado de São Paulo**. 2014. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

CASTROAGUDIN, V.L.; CERESINI, P.C.; de OLIVEIRA, S.C.; REGES, J.T.; MACIEL, J.L.; BONATO, A.L.; DORIGAN, A.F.; McDONALD, B.A. Resistance to QoI fungicides is widespread in brazilian populations of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.105, n. 3, p. 284-294, Mar. 2015.

CATO, S.C.; TERRA, M.M.; BOTELHO, R.V.; TECCHIO, M.A.; PAIOLI-PIRES, E.J.; CARVALHO, C.R.L.; PIEDADE, S.M.S. Características morfológicas dos cachos e bagas de uva “Niagara Rosada” (*Vitis labrusca* L.) tratadas com o ácido giberélico e anelamento. **Acta Scientiarum (Agronomy)**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 177-181, jan. 2005.

CHATASIRI, S.; ONO, Y. Phylogeny and taxonomy of the Asian grapevine leaf rust fungus, *Phakopsora euvitis*, and its allies (Uredinales). **Mycoscience**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 66-74, Feb. 2008.

CHEN, W-J.; DELMOTTE, F.; RICHARDE-CERVERA, S.; DOUENCE, L.; GREIF, C.; CORIO-COSTET, M-F. At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.73, n.16, p. 5162-5172, Aug. 2007.

CONDE, C. ; SILVA, P. ; FONTES, N. ; DIAS, A.C.P. ; TAVARES, R.M. ; SOUSA, M.J. ; AGASSE, A.; DELROT, S. ; GERÓS, H. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. **Food**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 1-22, Apr. 2007.

COSTA, T.V.; TARSITANO, M.A.A.; CONCEIÇÃO, M.A.F. Caracterização social e tecnológica da produção de uvas para mesa em pequenas propriedades rurais da região de Jales-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 3, p. 766-773, set. 2012.

DEGLIESPOSTI, M.; DEVRIES, S.; CRIMI, M.; GHELLI, A.; PATARNELLO, T.; MEYER, A. Mitochondrial cytochrome-b - evolution and structure of the protein. **Biochimica Et Biophysica Acta**, New York, v. 1143, n. 3, p. 243-271, Jul.1993.

DOUDNA, J.A.; CORMACK, B.P.; SZOSTAK, J.A. RNA structure, not sequence, determines the 5' splice-site specificity of a group I intron. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 86, n. 1, p. 7402-7406, Oct. 1989.

DUPLESSIS, S.; CUOMO, C.A.; LIN, Y.-C.; AERTS, A.; TISSERANT, E.; VENEAL-
FORREY, C.; JOLY, D.L.; HACQUARD, S.; AMSELEM, J.; CANTAREL, B.L.; CHIU, R.;
COUTINHO, P.M.; FEANU, N.; FIELD, M.; FREY, P.; GELHAYE, E.; GOLDBERG, J.;
GRABHERR, M.G.; KODIRA, C.D.; KOHLER, A.; KÜES, U.; LINDQUIST, E.A.; LUCAS,
S.M.; MAGO, R.; MAUCELI, E.; MORIN, E.; MURAT, C.; PANGILINAN, J.L.; PARK, R.;
PEARSON, M.; QUESNEVILLE, H.; ROUHIER, N.; SAKTHIKUMAR, S.; SALAMOV,
A.A.; SCHMUTZ, J.; SELLES, B.; SHAPIRO, H.; TANGAUAY, P.; TUSKAN, G.A.;
HENRISSAT, B.; DE PEER, Y.V.; ROUZÉ, P.; ELLIS, J.G.; DODDS, P.N.; SCHEUN, J.E.;
ZHONG, S.; HAMELIN, R.C.; GRIGORIEV, I.V.; SZABO, L.J.; MARTIN, F. Obligate
biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. **Proceedings of the
National Academy of Sciences**, Washington, v. 108, n. 22, p. 9166-9171, Jan. 2011.

EPPO. Efficacy evaluation of plant protection products: PP 1/213 (4) - Resistance risk
analysis. **EPPO Bulletin**, River Street, v. 45, n. 3, p. 371-387, Jul. 2015.

_____. *Phakopsora euvitidis*: grapevine rust. Disponível em: <
http://www.eppo.int/QUARANTINE/Alert_List/fungi/PHLLAM.htm?utm_source=www>.
Acesso em: 12 mar. 2016.

FAO. **Grapes Wine**: agribusiness handbook. Rome, FAO, 2009. 38p.

_____. **FAO Statistics Division**: crops production. Disponível em:
<<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 14 Dec. 2015

FARIAS, I.P.; ORTI, G.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H.; MEYER, A. The cytochrome b
gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among
cichlid fishes. **Journal of Molecular Evolution**, Amsterdam, v. 53, n. 2, p. 89-103, Aug.
2001.

FERNANDÉZ-ORTUÑO, D.; TORÉS, J.A.; DEVICENTE, A.; PERÉZ-GARCÍA, A.
Fungicides, the rise and fall of a successful class of agricultural fungicides. In: CARISSE, O.
(Ed). **Fungicides**. Shangai: InTech, 2010. chap. 10, p. 203-220.

FIGUEIREDO, M.B.; PASSADOR, M.M. Morfologia, funções dos soros e variações dos
ciclos vitais das ferrugens. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 117-
134, jan. 2008.

FOURY, F. ; ROGANTI, T. ; LECRENIER, N. ; PURNELLE, B. The complete sequence of
the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, River Street, v. 440,
n. 3, p. 325-331, Dec. 1998.

FRAC. **Mutations associated with QoI-resistance**. Disponível em:
<<http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-quick-references/mutations-associated-with-qo-resistance.pdf?sfvrsn=4>>. Acesso em: 3 jul. 2015.

_____. **Frac list of plant pathogenic organisms resistant to diseasecontrol agents**. 2013.
Disponível em: <<http://www.frac.info/docs/default-source/publications/list-of-resistant-plant-pathogens/list-of-resistant-plant-pathogenic-organisms---february-2013.pdf>>. Acesso em: 04
abr. 2014.

FRANCESCA, S.; SIMONA, G.; NICOLA, T. F.; ANDREA, R.; VITTORIO, R.; FEDERICO, S.; CYNTHIA, R.; LODOVICA, G. M. Downy mildew (*Plasmopara viticola*) epidemics on grapevine under climate change. **Global Change Biology**, Malde, v. 12, n. 7, p. 1299-1307, Jul. 2006.

GARRIDO, L.R.; SÔNEGO, O.R. Uvas viníferas para processamento em regiões de clima temperado. **Sistemas de Produção**, Bento Gonçalves, v. 4, n. 1, p. 1-15, jul. 2003.

GASTEIGER, E.; GATTIKER, A.; HOOGLAND, C.; IVANYI, I.; APPEL, R.D. ; BAIROCH, A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Resource**, Oxford, UK, v. 31, n. 13, p. 3784-3788, Jul. 2003.

GENE RUNNER. GeneRunner 4.0.9.68 Beta. United States, 2014. Disponível em: <www.generunner.net/> Acesso em: 15 mar 2014.

GEORGIEV, V.; ANANGA, A.; TSOLOVA, V. Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. **Nutrients**, Basel, v. 6, n. 1, p. 391-415, Jan. 2014.

GERÓS, H.A.; CHAVES, M.M.; GIL, M.H.; SERGE, D. **Grapevine in a Changing Environment: A Molecular and Ecophysiological Perspective**. New York: John Wiley, 2015. 400p.

GESSLER, C.; PERTOT, I.; PERAZZOLLI, M. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 50, n. 1, p. 3-44, Apr. 2011.

GESTELAND, L.F.; CECH, T.R.; ATKINS, J.F. **The RNA World**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000. 709p.

GHILARDI, A.A.; MAIA, M.L. **Uva Niagara no Estado de São Paulo: Aspectos da Produção, da Comercialização e de Mudanças na Tecnologia Adotada**. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=233>>. Acesso em: 16 dez. 2014.

GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. Porto Alegre: Renascença, 1999. 364p.

GIRESE, X. ; AHMED, S. ; RICHARD-CERVERA, S. ; DELMOTTE, F. Development of new oomycete taxon-specific mitochondrial cytochrome b region primers for use in phylogenetic and phylogeographic studies. **Journal of Phytopathology**, River Street, v. 158, p. 321-327, Jan. 2010.

GISI, U.; SIEROTZKI, H.; COOK, A.; McCAFFERY, A. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. **Pest Management Science**, London, v.58, n. 9, p. 859-867, Sep. 2002.

GRASSO, V. **Characterization of the cytochrome b gene in plant pathogenic basidiomycetes and consequences for QoI resistance**. 2005. 122p. Tese (Doutorado em Ciências Agrícolas, Silvicultura e Alimentos) - Departamento de Agricultura, Universidade de Turim, Basel, 2005.

GRASSO, V.; PALERMO, S.; SIEROTZKI, H.; GARIBALDI, A.; GISI, U. Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. **Pest Management Science**, London, v. 62, n. 6, p. 465-472, Jun. 2006.

GRIGOLETTI JR, A.; MAXIMINIANO, C.; HICKEL, E.R.; FERREIRA, E.A.; KUHN, G.B.; FRÁGUAS, J.C.; GARRIDO, L.R. ; BOTTON, M.; LIMA, M.F. **Uva para processamento**: fitossanidade. Brasília: EMBRAPA, 2003. 131p.

HAUGEN, P.; SIMON, D.M.; BHATTACHARYA, D. The natural history of group I introns. **Trends in Genetics**, Riverport, v. 21, n. 2, p.111-119, Feb. 2005.

HARDING, J. **The Oxford companion to wine**. 3rd.ed. Oxford, US: Oxford University Press, 2006. 840p.

HENNING, A.A.; BERGAMIN FILHO, A.; BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; GOES, A.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; LOPEZ, A.M.Q.; ALMEIDA, A.M.R.; FORCELINI, C. A.; AUER, C.G.; KUROZAWA, C.; SALGADO, C.L.; GODOY, C.V.; TRINDADE, D.L.; CIA, E.; FEICHTENBERGER, E.; FURTADO, E.L.; REIS, E.M.; PICCINM, E.; ORTIZ, E.R.N.; ASSIS FILHO, F.M.; PIO-RIBEIRO, G.; MÜLER, G.W.; KIMATI, H. ; KUNIYUKI, H. ; TOKESHI, H. ; RIBEIRO, I.J.A. ; BEDENDO, I.P.; BETTI, J.A.; SOUZA DIAS, J.A.C.; REZENDE, J.A.M.; BLEICHER, J.; FREITAS, J.C.; SILVA, J.F.V.; STANGARLIN, J.R.; YORINORI, J.T.; AMORIM, L.; CAMARGO, L.E.A.; GASPAROTTO, L.; FERREIRA, L.P.; POLTRONIERI, L.S.; PAVAN, M.A.; TANAKA, M.A.S.; BARRETO, M.; DALLA PRIA, M.; NUNES, M.E.T.; FANCELLI, M.I.; LIMA, M.I.P.M.; SANTOS, M.M.F.B.; MENEZES, M.; IMAUTI, M.T.; WULFF, N.A.; FERNANDES, N.G.; GUIRADO, N.; NAZARENO, N.R.X.; MASSOLA JR, N.S.; PEREIRA, O.A.P.; CERESINI, P.C.; CALDARI JR, P.; BASSANEZI, R.B.; PANIZZI, R.C.; MARIANO, R.L.R.; MOURA, R.M.; LEITE, R.M.V.B.C.; COELHO, R.S.B.; CASA, R.T.; PASCHOLATI, S.F.; CARNEIRO, S.M.T.P.G.; VÉRAS, S.M.; GALLETTI, S.R.; KRUGNER, T.L.; CORDEIRO, Z.J.M. **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. Piracicaba: Editora Ceres LTDA, 1997. 705p.

HOBBELEN, P.H.F.; PAVELEY, N.D.; VAN DEN BOSH, F. The emergence of resistance to fungicides. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e91910, Mar. 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0091910>> Acesso em 7 mar. 2016.

IAC. **Área e Produção dos Principais Produtos da Agropecuária do Estado de São Paulo**: uva. Disponível em: <http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/subjetiva.aspx?cod_sis=1&idioma=1> Acesso em: 15 dez. 2015. 2015a.

_____. **Centro de frutas**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/frutas/atuacao.php>>. Acesso em: 12 dez. 2015. 2015b.

IMA. **MycoBank**: fungal databases, Nomenclature & Species Banks. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/defaultinfo.aspx?Page=Home>> Acesso em: 10 jan. 2016.

JAYAPRAKASHA, G.K.; SELVI, T.; SAKARIAH, K.K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Research International**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 117-122, Apr. 2003.

JAYAPRAKASHA, G.K.; SINGH, R.P.; SAKARIAH, K.K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.73, n. 3, p. 285-290, May. 2001.

JAYAWARDENA, R.S.; ARIYAWANSA, H.A.; SINGTRIPOP, C.; MEI LI, Y. ; YAN, J.; LI, X.; NILTHONG, S.; HYDE, K.D. A re-assessment of *Elsinoaceae* (Myriangiales, Dothideomycetes). **Phytotaxa**, Auckland, v. 176, p. 120-138, Aug. 2014.

JI, J. ; BRAAM, J. Restriction site extension PCR: a novel method for high-throughput characterization of tagged DNA fragments and Genome Walking. **PLoS One**, San Francisco, v.5, n. 5, p. e10577, May. 2010. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0010577>> Acesso em: 19 jun. 2016.

KARAOGLANIDIS, G.S.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T.J. Competitive ability and fitness of *Alternaria alternata* isolates resistant to QoI fungicides. **Plant Disease**, New York, v. 95, n. 2, p. 178-182, Oct. 2011.

KLOSOWSKI, A.C.; MAY DE MIO, L.L.; MIESSNER, S.; RODRIGUES, R.; STAMMLER, G. Detection of the F129L mutation in the cytochrome b gene in *Phakopsora pachyrhizi*. **Pest Management Science**, London, v. 72, n. 6, p. 1211-1215, Jun. 2015.

KOLMER, J.A.; ORDONEZ, M.E.; GROTH, J.V. **The rust Fungi**. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). Chichester: John Wiley, 2009. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/person/3094/rust_fungi.pdf> Acesso em: 29 dez. 2015.

KUHN, G.B.; MAIA, J.D.G.; NAVES, R.L.; GARRIDO, L.R.; SÔNEGO, O.R. **Cultivo da Videira Niágara Rosada em Regiões Tropicais do Brasil**. Sistemas de Produção, Bento Gonçalves, v.5, n. 1, nov. 2003. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaNiagaraRosadaRegioesTropicais/index.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

LALEVE, A.; GAMET, S.; WALKER, A.-N.; DEBIEU, D.; TOQUIN, V.; FILLINGER, S. Site-directed mutagenesis of the P225, N230 and H272 residues of succinate dehydrogenase subunit B from *Botrytis cinerea* highlights different roles in enzyme activity and inhibitor binding. **Environmental Microbiology**, River Street, v. 16, n. 7, p. 2253-2266, Jul. 2014.

LANG, B.F.; LAFOREST, M.-J.; BURGER, G. Mitochondrial introns: a critical view. **Trends in Genetics**, Riverport, v. 23, n. 3, p. 119-125, Mar. 2007.

LEÃO, P.C.S. Breve histórico da vitivinicultura e a sua evolução na região semiárida brasileira. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 7, n. 1, p. 81-85, 2010.

LEE, S.B.; TAYLOR, J.W. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols: A guide to methods and applications**. London: Academic Press, 1990. chap. 34, p. 282-287.

LEONI, C.; VOLPICELLA, M.; DE FEO, F.; GALLERANI, R.; CECI, L.R. Genome walking in eukaryotes. **Febs Journal**, Cambridge, v. 278, n. 21, p. 3953-3977, Nov. 2011.

- LEROUX, P.; GREDT, M.; LEROCH, M.; WALKER, A-S. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 19, p. 6615-6630, Oct. 2010.
- LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. **Bioinformatics**, Oxford, UK, v. 25, n. 14, p. 1754-1760, Jul. 2009.
- LOEHRER, M.; VOGEL, A.; HUETTEL, B.; REINHARDT, R.; BENES, V.; DUPLESSIS, S.; USADEL, B.; SCHAFFRATH, U. On the current status of *Phakopsora pachyrhizi* genome sequencing. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 1-5, Aug. 2014.
- LO PICCOLO, S.; ALFONZO, A.; CONIGLIARO, G.; MOSCHETTI, G.; BURRUANO, S.; BARONE, A. A simple and rapid DNA extraction method from leaves of grapevine suitable for polymerase chain reaction analysis. **African Journal of Biotechnology**, Kenia, v. 11, n. 45, p. 10305-10309, Jun. 2012.
- MA, Z.; FELTS, D.; MICHAILIDES, T. J. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v. 77, p. 66-74, Aug. 2003.
- MAIA, J.D.G.; MELLO, L.M.R. Cultivo da videira Niágara Rosada em regiões tropicais do Brasil. **Sistemas de Produção**, Bento Gonçalves, v. 5, n.1,p. 1-13, nov. 2003. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaNiagaraRosadaRegioesTropicais/custo.htm>> Acesso em: 13 dez. 2015.
- MATASCI, C.L.; GOBBIN, D.; SCHÄRER, H-J.; TAM, L.; GESSLER, C. Selection for fungicide resistance throughout a growing season in populations of *Plasmopara viticola*. **European Journal of Plant Pathology**, Gewerbestrasse, v. 120, p. 79-83, Jan. 2008.
- McGRATH, M.T. **What are Fungicides**. New York: The Plant Health Instructor Index, 2004. [s.p.]. Disponível em: <<http://www.plantpath.cornell.edu/labs/mcgrath/www.apsnet.org/education/IntroPlantPath/Tpics/fungicides/default.htm>> Acesso em: 2 fev. 2016.
- MELLO, L.M.R. Panorama da vitivinicultura brasileira 2014. **Campo & Negócio**, Uberlândia, 14 abr. 2015. Hortifrúti, [s.p.].
- NACHTIGAL, J.C. Avanços tecnológicos na produção de uvas de mesa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 2003, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p.167-170.
- NAVES, R.L.; GARRIDO, L.R.; SÔNEGO, O.R.; FOCESATO, M. Antracnose da videira: sintomatologia, epidemiologia e controle. **Circular Técnica**, Bento Gonçalves, v. 69, n. 1, p. 1-8, dez. 2006.
- NCBI. **GenBank**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> Acesso em: 22 dez. 2015.
- OIV. **World vitiviniculture situation**. Disponível em:<<http://www.oiv.int/oiv/info/enpublicationsstatistiques?lang=en>>. Acesso em: 17 Dec. 2015.

OKONECHNIKOV, K.; GOLOSOVA, K.; FURSOV, M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. **Bioinformatics**, Oxford, UK, v. 28, n. 1, p. 1166-1167, Feb. 2012.

ONO, Y. Taxonomy of the *Phakopsora ampelopsidis* species complex on Vitaceous hosts in Asia including a new species, *P. euvitis*. **Mycologia**, Washington, v. 92, p. 154-173, Jan. 2000.

OW, Y.-L.P.; GREEN, D.R.; HAO, Z.; MAK, T.W. Cytochrome c: functions beyond respiration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, New York, v.9, n. 7, p. 532-542, Jul. 2008.

PARANÁ. **Secretaria do Abastecimento**: Fruticultura. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2012_13.pdf> Acesso em: 20 mar. 2014.

PEARSON, R.C.; GOHEEN, A.C. **Compendium of grape diseases**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1988. 121p.

POOLSAWAT, O.; THARAPREUKSAPONG, A.; WONGKAEW, S.; TANTASAWA, P. Cultural characteristics of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grape anthracnose on different media. **Suranaree Journal of Science and Technology**, Nakhon, v. 16, n. 2, p. 149-157, May. 2009.

PROTAS, J.F.D.S.; CAMARGO, U.A.; MELLO, L.M.R. Vitivinicultura brasileira: regiões tradicionais e pólos emergentes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 234, p. 7-15, set. 2006.

RAVICHANDRA, N. G. **Fundamentals of plant pathology**. New Delhi: PHI Learning, 2013. 652 p.

REIS, E.M. **Previsão de doenças de plantas**. Passo Fundo, 2004. 316 p.

REIS, E.M.; DEUNER, E.; ZANATTA, M. *In vivo* sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* to DMI and QoI fungicides. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, n. 1, p. 1-4, Jan. 2015.

RITSCHER, P.S. ; MAIA, J.D.G. **Uvas do Brasil**: programa de melhoramento genético. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/pesquisa/pmu/index.php?opcao=opt_02>. Acesso em: 23 dez. 2014.

RODRIGUES, E.G.; LÍRIO, V.S.; LACAZ, C.D.S. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 34, n. 1, p.159-165, mar. 1992.

ROOHPARVAR, R.; DE WAARD, M.A.; KEMA, G.H.; ZWIERS, L.H. MgMfs1, a major facilitator superfamily transporter from the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*, is a strong protectant against natural toxic compounds and fungicides. **Fungal Genetics and Biology**, Amsterdam, v. 44, n. 5, p. 378-388, May. 2007.

ROSSMAN, A.Y.; PALM, M.E. Why are Phytophthora and other Oomycota not true Fungi? **Outlooks on Pest Management**, Essex, v. 17, n. 5, p. 217-219, Oct. 2006.

SALDANHA, R.; MOHR, G.; BELFORT, M.; LAMBOWITZ, A.M. Group I and group II introns. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 7, n. 1, p. 15-24, Jan. 1993.

SAUTER, H.; STEGLICH, W.; ANKE, T. Strobilurins: evolution of a new class of active substances. **Angewandte Chemie-International**, Amsterdam, v. 38, n. 10, p. 1329-1349, May.1999.

SCHEFFER, R.P. **The Nature of Disease in Plants**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1997. 336p.

SCHMITZ, H.K.; MEDEIROS, C-A.; CRAIG, I.R.; STAMMLER, S. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-outside-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. **Pest Management Science**, London, v. 70, n. 3, p. 378-388, Mar. 2013.

SHARMA, R.; XIA, X.; CANO, L.M.; EVANGELISTI, E.; KEMEN, E.; JUDELSON, H.; OOME, S.; SAMBLES, C.; VAN DEN HOOGEN, J.; KITNER, M.; KLEIN, J.; MEIJER, H. J. G.; SPRING, O.; WIN, J.; ZIPPER, R.; BODE, H. B.; GOVERS, F.; KAMOUN, S.; SCHORNACK, S.; STUDHOLME, D.J.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.; THINES, M. Genome analyses of the sunflower pathogen *Plasmopara halstedii* provide insights into effector evolution in downy mildews and *Phytophthora*. **BMC Genomics**, London, v. 16, n. 1, p. 741-754, Oct. 2015.

SIDHU, G. S. **Genetics of Plant Pathogenic Fungi**. Amsterdam: Elsevier Science, 2013. 566 p.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T.J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; McWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, Heidelberg, v. 11, n. 7, p. 1-6, Oct. 2011.

SILVA, D.N.; DUPLESSIS, S.; TALHINHAS, P.; AZINHEIRA, H.; PAULO, O.S.; BATISTA, D. Genomic Patterns of Positive Selection at the Origin of Rust Fungi. **PLoS One**, San Francisco, v.10, n. 12, p. e0143959, Dec. 2015. Disponível em:<<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0143959>> Acesso em: 11 jan. 2016.

SÔNEGO, O.R.; GARRIDO, L.R.; GAVA, R. Ferrugem da videira no Brasil. **Comunicado Técnico**, Bento Gonçalves, v. 62, n.1, p.1-3, dez. 2005.

SOUZA, J.S.I. **Uvas para o Brasil**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1996. 791p.

_____. Mutações somáticas na videira Niagara. **Bragantia**, Campinas, v.18, n. 1, p. 387-415, dez. 1959.

STONE, C.L.; BUITRAGO, M.L.; BOORE, J.L.; FREDERICK, R.D. Analysis of the complete mitochondrial genome sequences of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. **Mycologia**, Washington, v. 102, n. 4, p. 887-897, Jul. 2010.

SYNGENTA LTD (United States). Judith Mary Burbidge; Sally Michele Cleere; Carole Patricia Stanger; John David Windass. **Method for the detection of cytochrome b mutations in fungi WO 2002081742-A3**. 25 mar. 2002. 3 abr. 2003.

TAN, G.; GAO, Y.; SHI, M.; ZHANG, X.; HE, S.; CHEN, Z.; AN, C. Site-finding PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking. **Nucleic Acids Research**, Oxford, UK, v. 33, n. 13, p. 1- 7, Aug. 2005.

TESSMANN, D.J.; DIANESE, J.C.; GENTA, W.; VIDA, J.B.; MAY-DE-MIO, L.L. Grape rust caused by *Phakopsora euvitis*, a new disease for Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 338-338, mai. 2004.

THIND, T.S. **Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management**. New Delhi: CABI, 2012. 296p.

THIS, P.; LACOMBE, T.; THOMAS, M.R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. **Trends in Genetics**, Riverport, v. 22, n. 9, p. 511-519, Sept. 2006.

THORVALDSDÓTTIR, H.; ROBINSON, J.T.; MESIROV, J.P. Integrative genomics viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, UK, v. 14, p. 178-192, Apr. 2013.

TONDATO, C.; LIMA FILHO, D.D.O.; TARSITANO, M.A.A. Caracterização dos canais de comercialização de uvas de mesa: um estudo da região de Jales, Estado de São Paulo. **Informações Econômicas SP**, Campinas, v. 39, n.1, p. 41-52, jan. 2009.

TONOOKA, Y. ; FUJISHIMA, M. Comparison and critical evaluation of PCR-mediated methods to walk along the sequence of genomic DNA. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heildelberg, v. 85, p. 37-43, Aug. 2009.

UNIVERSITY OF ATHENS. **MitoFun**: a curated resource of complete fungal mitochondrial genomes. Disponível em: <<http://mitofun.biol.uoa.gr/>> Acesso em: 12 jul. 2015.

UVIBRA. **Produção de uva, elaboração de vinhos e derivados entre os anos de 2003 e 2014**. Disponível em: <http://www.uvibra.com.br/pdf/safra_uva2003-2014.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2015.

VELOUKAS, T.; KALOGEROPOULOU, P.; MARKOGLOU, A. N.; KARAOGLANIDIS, G.S. Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* field isolates with dual resistance to SDHI and QoI fungicides, associated with several *sdhB* and the *cytb* G143A mutations. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 104, n. 4, p. 347-356, Apr. 2014.

VERDI, A.R.; OTANI, M.N.; MAIA, M.L.; FREDO, C.E.; OLIVEIRA, A.L.; HERNANDES, J.L. **Panorama da vitivinicultura paulista: censo 2009**, Campinas, v. 41, n. 11, p. 5-20, nov. 2011

VINCELLI, P. **QoI (strobilurin) fungicides: benefits and risks**.2002. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Pages/StrobilurinFungicides.aspx>> Acesso em: 29 set. 2015.

WAN, Y.; SCHWANINGER, H.R.; BALDO, A.M.; LABATE, J.A., ZHONG, G-Y.; SIMON, C.J. A phylogenetic analysis of the grape genus (*Vitis* L.) reveals broad reticulation and concurrent diversification during neogene and quaternary climate change. **BMC Evolutionary Biology**, London, v.13, n.141, p. 1-15, jul. 2013. Disponível em:<<http://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-13-141>> Acesso em: 15 dez. 2015.

WATERHOUSE, A.M.; PROCTER, J.B. ; MARTIN, D.M.; CLAMP, M.; BARTON, G.J. Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, Oxford, v.25, n. 9, p. 1189-1191, May. 2009.

WEINERT, M.P.; SHIVAS, R.G. ; PITKENTHLEY, R.N. ; DALY, A.M. First record of grapevine leaf rust in the Northern Territory, Australia. **Australasian Plant Pathology**, Sidney, v. 32, p. 117-118, Jan. 2003.

WIGHTWICK, A. **Fungicides**. Rijeka: Intech, 2010. 548p.

WOOD, P.M. ; HOLLOMON, D.W. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Q(o) site of Complex III. **Pest Management Science**, London, v. 59, n. 5, p. 499-511, May. 2003.

XU, W.; SHANG, Y.; ZHU, P.; ZHAI, Z.; HE, J.; HUANG, K.; LUO, Y. Randomly broken fragment PCR with 5' end-directed adaptor for genome walking. **Scientific Reports**, New York, v. 3, n. 3465, p. 1-7, Dec. 2013.

YIN, L.-F.; HU, M.J.; WANG, F.; KUANG, H.; ZHANG, Y.; SCHNABEL, G.; LI, G-Q.; LUO, C-X. Frequent gain and loss of introns in fungal cytochrome b genes. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 11, p. e49096, Nov. 2012. Disponível em:<<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0049096>> Acesso em: 13 fev 2016.

ZHANG, T.; FANG, Y.; WANG, X.; DENG, X.; ZHANG, X.; HU, S. ; YU, J. The Complete Chloroplast and Mitochondrial Genome Sequences of *Boea hygrometrica*: Insights into the Evolution of Plant Organellar Genomes. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. e30531, Jan. 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0030531>> Acesso em 20 fev 2016.

APÊNDICE

APÊNDICE

Figura 34 - Gel de eletroforese com amostras amplificadas pelos *primers* degenerados construídos para *S. ampelinum*. Foram carregados 3µL de marcador (M) 1Kb Plus (Invitrogen) e 5µL dos produtos de PCR (1 e 2). (-) é o controle negativo da reação. É possível verificar que nas duas reações de PCR feitas foi obtido um produto de 400 pb. Concentração de agarose no gel: 1,2%. Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos a 50V. Tampão para corrida: TBE 0,5X

O cromatograma das sequências obtidas dos produtos amplificados no gel acima apresentou picos altos, bem definidos e com pouco ruído (picos menores), indicando boa qualidade do sequenciamento (resultado não mostrado). Pelo resultado do BLASTN essas sequências mostraram identidade e cobertura com sequências de outras espécies de Dothideomycetes, o que sugere que as sequências amplificadas sejam inéditas e pertencentes à espécie *S. ampelinum*. Essas sequências (apresentadas abaixo) se alinham a porção compreendida pelas posições 1.010 a 1.215 pb do alinhamento das CDSs dos Dothideomycetes mostrado no item 4.5.1.

> sequencia parcial citocromo b |Sphaceloma ampelinum|PDSF1

CATGTAAAAAAGTTGGGGAAGAAGCTTATAGGTTGAAGAAAAAGAAACCCCAA
TTTACCTTTTCCCTTAAAAAAAATTTTAGGGAGTATTTAGTTTCCTTCTGTGCC
CAGTGATGTACATAAAAAATGCAGAAAATTAAAGTGGCGACACTCCAAAGGAAA
ACAC

> sequencia parcial citocromo b |Sphaceloma ampelinum|PDSR1

TTTTCCTTTTGTATTAGCTGCATTAGCTTTGATGCATTTAATTGCATTACACGATAC
AGTAGGAGCTAATAACCCCTTAGGTATATCAGGAAACTATGATAGATTACCATTC
GCACCATATTTTATATTTAAAGATTTAATTACTATTTTCTTATTTATATTAGTATTA
AGTGTATTTGTATTTTTTATGCCTAAGTTTAGAGATTATTT

> sequencia parcial citocromo b |Sphaceloma ampelinum|PDSF2

TTTGGTTTATTGCTTACACGATACAGTAGGAGCTAATAACCCCTTAGGTATATC
AGGAACTATGATAGATTACCATTCGCACCATATTTTATATTTAAAGATTTAATTA
CTATTTTCTTATTTATATTAGTATTAAGTGTATTTGTATTTTTTATGCCTAATGTTTT
AGGAGATAGTGAAAATTATGTAATGGCAAATCCCAATGCAAACA

> sequencia parcial citocromo b |Sphaceloma ampelinum|PDSR1

TTTTCCTTTTGTATTAGCTGCATTAGCTTTGATGCATTTAATTGCATTACACGATAC
AGTAGGAGCTAATAACCCCTTAGGTATATCAGGAAACTATGATAGATTACCATTC
GCACCATATTTTATATTTAAAGATTTAATTACTATTTTCTTATTTATATTAGTATTA
AGTGTATTTGTATTTTTTATGCCTAAGTTTAGAGATTATTT