

Bento Gonçalves, RS / Maio, 2024

Estudos filogenéticos e padrões de restrição em *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. associados a podridões de tronco da videira no Rio Grande do Sul

Fabio Rossi Cavalcanti⁽¹⁾, Jessica Tascheto Berlatto⁽²⁾, Marcus André Kurtz Almança⁽³⁾ e Bruna Gabriele Loeser⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. ⁽²⁾ Tecnóloga em Viticultura e Enologia, Vinícola Aurora, Bento Gonçalves, RS. ⁽³⁾ Professor, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, RS. ⁽⁴⁾ Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, RS.

Resumo – Este estudo investiga os aspectos moleculares dos fungos fitopatogênicos *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp., causadores de “chocolate” e doença de Petri em vinhedos no Rio Grande do Sul, Brasil. Foram desenvolvidos métodos moleculares para analisar a filogenia desses fungos e técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram adaptadas para detectá-los. Os fungos foram isolados de partes sintomáticas do tronco e cultivados em meio batata-dextrose líquido. O DNA total foi extraído da biomassa micelial usando o protocolo de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. O sequenciamento de DNA *Sanger* das amostras de PCR foi utilizado para estudos filogenéticos. A identidade dos patógenos foi confirmada por BLASTN das sequências obtidas nas regiões ITS1/2, β -tubulina (BTUB) e fator de alongação (EF-1 α), por PCR com iniciadores específicos e padrões de fragmentação enzimática (*CfoI* e *HaeIII*) por PCR-RFLP. As sequências da região ITS1/2 foram depositadas no GenBank. A análise de PCR-RFLP revelou polimorfismo intraespecíficos mínimos para os patógenos com as enzimas *CfoI* e *HaeIII*. As sequências apresentaram 90 a 99% de identidade ao BLASTN. Árvores filogenéticas foram geradas utilizando métodos *Neighbor-Joining* (NJ), *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) e Máxima Parcimônia (MP), revelando alta similaridade nas sequências da região ITS, mas variações nas regiões β -tubulina e EF-1a, ajudando a diferenciar os patógenos isolados no Rio Grande do Sul de outros isolados globais.

Termos para indexação: *Vitis vinifera*, chocolate, doença de Petri, filogenia.

Phylogenetic studies and restriction patterns in *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. associated with grapevine trunk diseases in Rio Grande do Sul

Abstract—This study investigates the molecular aspects of the phytopathogenic fungi *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp., which

Embrapa Uva e Vinho

Rua Livramento, nº 515
Caixa Postal 130
95701-008 Bento Gonçalves, RS
www.embrapa.br/uva-e-vinho
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente
Henrique Pessoa dos Santos
Secretária-executiva
Renata Gava
Membros
Edgardo Aquiles Prado Perez,
Fernando José Hawerth,
Mauro Celso Zanus, Joelsio
José Lazzarotto, Jorge Tonietto,
Rochelle Martins Alvorcem, Thor
Vinicius Martins Fajardo

Revisão de texto
Renata Gava

Normalização bibliográfica
Rochelle Martins Alvorcem
(CRB-10/1810)

Projeto gráfico
Leandro Sousa Fazio

Diagramação
Renata Gava

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

cause “black goo” and Petri disease in vineyards in Rio Grande do Sul, Brazil. Molecular methods were developed to analyze the phylogeny of these fungi, and PCR techniques were adapted for their detection. Fungi were isolated from symptomatic trunk parts and cultivated in potato dextrose liquid medium. Total DNA was extracted from the mycelial biomass using the phenol:chloroform:isoamyl alcohol protocol. Sanger DNA sequencing of PCR samples was used for phylogenetic studies. The identity of the pathogens was confirmed by BLASTN of sequences from the ITS1/2, β -tubulin (BTUB), and elongation factor (EF-1a) regions, by PCR with specific primers, and by enzymatic fragmentation patterns (CfoI and HaeIII) through PCR-RFLP. The ITS1/2 region sequences were deposited in GenBank. PCR-RFLP analysis revealed minimal intraspecific polymorphism for the pathogens with CfoI and HaeIII enzymes. Sequences showed 90 to 99% identity to BLASTN. Phylogenetic trees were generated using Neighbor-Joining (NJ), UPGMA, and Maximum Parsimony (MP) methods, revealing high similarity in ITS region sequences but variations in the β -tubulin and EF-1a regions, helping to differentiate the pathogens isolated in Rio Grande do Sul from other global isolates.

Index terms: *Vitis vinifera*, black goo decline, Petri disease, phylogeny.

Introdução

O declínio e a morte de plantas de videira podem estar associados aos fungos fitopatogênicos que, ao parasitarem o tecido lenhoso da videira, causam infecções severas e podridões em tecidos vasculares e lenhosos da raiz ou do caule, comprometendo ou até mesmo impedindo a sobrevivência da planta (Cavalcanti et al., 2013; Ji et al., 2023). Segundo Ji et al. (2023), os sintomas de declínio começam a aparecer no início do ciclo vegetativo, caracterizando-se por brotações pouco vigorosas e folhas cloróticas, com posterior enfraquecimento progressivo da planta, podendo ocasionar sua morte.

A Serra Gaúcha é a principal região produtora de uva do Brasil. Está situada no nordeste do Rio Grande do Sul. É uma região que possui solo e clima propícios para a produção de uvas com alta acidez, usadas principalmente para a elaboração de vinho base para espumantes (Jackson, 2020). No entanto, o clima subtropical e solo argiloso trazem dificuldades de drenagem, atrapalhando a

condução dos parreirais por favorecer podridões radiculares como a fusariose e o pé-preto (Cavalcanti et al., 2013). Os maiores empecilhos para a produção da videira encontrados nessa região são os elevados índices pluviométricos e a alta umidade relativa do ar, o que favorece a suscetibilidade às doenças (Cavalcanti, 2021).

Existem várias espécies de fungos fitopatogênicos que causam doenças de tronco da videira, tais como linhagens da família Botryosphaeriaceae, causadores de podridões descendentes; o fungo *Eutypa lata* causador da eutipiose, fungos causadores da podridão de *Phomopsis* e o pé-preto (*black foot disease*), que é causado por apenas um fungo dos gêneros *Cylindrocarpon*, *Campylocarpon* ou *Ilyonectria*.

Em outras situações biológicas, fungos podem atuar num tipo de parasitismo em consórcio atacando conjuntamente os tecidos do tronco da videira causando uma interação complexa de doença (Cavalcanti et al., 2013). Dois exemplos importantes na cultura da videira são a doença de Petri (infecção simultânea entre *Phaeoconiella chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp.) e a esca, um complexo infeccioso causado por *P. chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp. e fungos do gênero *Fomitiporia*, ainda não evidenciado no Brasil.

Dos dois complexos de parasitismo (esca e Petri), apenas a doença de Petri foi evidenciada em vinhedos da Serra Gaúcha (Almança et al., 2013). Adicionalmente, *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. podem causar, de modo individualizado, podridões conhecidas por “chocolate” no tronco da videira (Cavalcanti et al., 2013; Berlatto et al., 2017).

Os métodos de identificação dos patógenos associados a doenças de tronco da videira partem dos estudos de sintomatologia e dos postulados de Koch. Ou seja, a identificação de estruturas da morfologia do patógeno é imprescindível para a identificação de indivíduos a partir do seu isolamento, e isso requer técnicos treinados para efetuar tais análises (Tronsmo et al., 2020).

No caso dos patógenos da videira, as semelhanças dos padrões sintomatológicos das amostras de tronco e das características de colônias obtidas do isolamento dos fungos associados podem dificultar a definição da etiologia. Também, dimensões dos esporos e/ou a falta de esporulação na cultura podem levar a falsos positivos, além de problemas com contaminações (Lawrence et al., 2017). A partir da década de

1980, outras técnicas têm sido adaptadas para fundamentar os trabalhos de diagnose de fitopatógenos, tornando mais precisa a caracterização de agentes causadores de doenças. Como comentaram Brioso et al. (2001), o progresso das técnicas de biologia molecular fez com que as mesmas fossem adaptadas à Fitopatologia.

No caso do diagnóstico de doenças, técnicas de biologia molecular podem ser adaptadas e aplicadas para detecção de patógenos presentes em tecidos de plantas hospedeiras, para a confirmação da patogenicidade, e em trabalhos abordando análise filogenética, da variabilidade e diversidade genética em populações de patógenos, encontrados em uma determinada região (Lobato; Cavalcanti, 2021).

Trabalhos envolvendo técnicas moleculares na caracterização de fungos relacionados às doenças de tronco de videira já foram desenvolvidos, como, por exemplo, os que descrevem estudos realizados sobre as regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*), β -tubulina e Fator de Elongação (Sofia et al., 2015; Ferreira et al., 2017; Kraus et al., 2020; Lobato; Cavalcanti, 2021; Aigoun-Mouhous et al., 2021; Ye et al., 2021), e os que relatam a utilização de iniciadores espécie-específicos para a detecção de patógenos (Tegli et al., 2000; Overton et al., 2004).

Diante dessa abordagem, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver ferramentas moleculares visando à identificação e caracterização filogenética de fungos das espécies *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. encontrados em vinhedos de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul, associados a podridões do tronco. Para isso, foram empregadas técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a amplificação de regiões conservadas do DNA fúngico (ITS, β -tubulina e EF-1 α) e posterior utilização desses DNAs em alta concentração para gerar padrões de PCR-RFLP em ensaios *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences* (CAPS).

Os produtos de PCR também foram usados para obtenção de sequências de nucleotídeos do DNA das regiões abordadas, com subsequente uso dessas informações para confirmação da identidade do microrganismo. Adicionalmente, os dados foram utilizados para a condução de análises filogenéticas das regiões, concatenadas ou não. Dados levantados foram comparados com informações de isolados de outras regiões do Brasil e do mundo.

Material e métodos

Amostragem de material vegetal, isolamento e identificação morfológica dos fitopatógenos

A coleta das amostras de videira com sintomas de doença de tronco foi realizada em vinhedos do estado do Rio Grande do Sul, pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS/BG), e também são provenientes da Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial (CMIA) da Embrapa Uva e Vinho. A Tabela 1 apresenta todos os isolados utilizados neste trabalho, seus respectivos sintomas, partes da planta em que foram isolados, localidade e data de coleta.

Após a coleta, tecidos sintomáticos do material vegetal amostrado foram cortados em tamanhos menores com bisturi esterilizado e lavados em água corrente. A desinfestação ocorreu em câmara de fluxo laminar pela sequência de soluções de etanol 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 3,5% por dois minutos e novamente etanol 70% por 30 segundos. Em seguida, com o auxílio de um bisturi foram retirados fragmentos da região com sintomas para inoculação em placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) comercial. Em cada placa de Petri foram colocados quatro fragmentos. A inoculação foi realizada em triplicata. As placas foram incubadas em câmara BOD, a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro. As placas foram observadas diariamente até o crescimento das colônias, que demorou de 15 a 30 dias para os isolados de *P. chlamydospora*. A caracterização morfológica foi realizada a partir das colônias cultivadas em meio BDA, com o preparo de lâminas que foram visualizadas em microscópio óptico, conforme Almança et al. (2013).

Neste trabalho, também foram utilizados cultivos axênicos de linhagens de *Phaeoacremonium* spp. da CMIA da Embrapa Uva e Vinho, os quais foram previamente isolados a partir de videiras sintomáticas do Rio Grande do Sul. Os isolados foram repicados em placas de Petri, em três replicatas contendo meio BDA.

Obtenção da biomassa micelial

As placas com cultivos do isolamento foram usadas para a obtenção da biomassa micelial e extração de DNA. Inicialmente, aos frascos de Erlenmeyer de 50 mL esterilizados, foram adicionados aproximadamente 30 mL de meio líquido batata-dextrose (BD) e um disco de cultivo em meio BDA. Esses frascos

Tabela 1. Linhagens de fitopatógenos utilizadas no trabalho

Código	Identificação morfológica	Variedade de videira/genótipo	Sintomas	Partes da planta	Localidade de coleta	Data de coleta	Código GenBank
TD 114	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Isabel/híbrido <i>Vitis labrusca</i> x <i>Vitis vinifera</i>	Pontuações escuras	Final basal do porta-enxerto	Farroupilha, RS	Out./14	KY984086.1
TD 15b	<i>P. chlamydospora</i>	Moscato Branco/ <i>Vitis vinifera</i>	Pontuações escuras	Parte superior do tronco	Farroupilha, RS	Dez./14	KY984087.1
TD157	<i>P. chlamydospora</i>	Moscato/ <i>Vitis vinifera</i>	Picnídio	Casca	Pinto Bandeira, RS	Jan./14	KY984071.1
TD 541	<i>P. chlamydospora</i>	Riesling itálico/ <i>Vitis vinifera</i>	Madeira castanho-avermelhada	Ponto de enxertia	Monte Belo do Sul, RS	Fev./15	KY984072.1
TD 340	<i>P. chlamydospora</i>	Cabernet Sauvignon/ <i>Vitis vinifera</i>	Madeira castanho-avermelhada	Final basal do porta-enxerto	Pinto Bandeira, RS	Mai/15	KY984073.1
TD 487	<i>P. chlamydospora</i>	Niágara Rosa/ <i>Vitis labrusca</i>	Pontuações escuras	Esporão	Campestre da Serra, RS	Mai/15	KY984078.1
TD 538	<i>P. chlamydospora</i>	Merlot/ <i>Vitis vinifera</i>	Madeira castanho-avermelhada	Ponto de enxertia	Caldas, MG	Ago./15	KY984079.1
TD 336	<i>P. chlamydospora</i>	Cabernet Sauvignon/ <i>Vitis vinifera</i>	Pontuações escuras	Ponto de enxertia	Pinto Bandeira, RS	Mai/15	KY984080.1
TD 537	<i>P. chlamydospora</i>	Merlot/ <i>Vitis vinifera</i>	Linhas pretas	Ponto de enxertia	Caldas, MG	Ago./15	KY984081.1
TD 458	<i>P. chlamydospora</i>	Cabernet Sauvignon/ <i>Vitis vinifera</i>	Madeira apodrecida (macia e esponjosa)	Ponto de enxertia	Pinto Bandeira, RS	Dez./14	KY984082.1
TD 15	<i>P. chlamydospora</i>	Moscato Branco/ <i>Vitis vinifera</i>	Pontuações escuras	Final basal do porta-enxerto	Pinto Bandeira, RS	Dez./14	KY984083.1
TD 457	<i>P. chlamydospora</i>	Itália/ <i>Vitis vinifera</i> subsp. <i>vinifera</i>	Madeira apodrecida (macia e esponjosa)	Ponto de enxertia	Vacaria, RS	Mai/15	KY984084.1
TD 68	<i>P. chlamydospora</i>	Isabel/híbrido <i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	Pontuações escuras	Final basal do porta-enxerto	Farroupilha, RS	Dez./14	KY984085.1
TD 455	<i>P. chlamydospora</i>	Riesling itálico/ <i>Vitis vinifera</i>	Pontuações escuras	Final basal do porta-enxerto	Monte Belo do Sul, RS	Fev./15	KY984088.1
TD 456	<i>P. chlamydospora</i>	Merlot/ <i>Vitis vinifera</i>	Madeira apodrecida (macia e esponjosa)	Ponto de enxertia	Caldas, MG	Ago./15	KY984089.1
TD 639	<i>P. chlamydospora</i>	Paulsen 1103/cruzamento entre <i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis rupestris</i>	Pontuações escuras	Braço	Santana do Livramento, RS	Nov./15	KY984076.1
TD 635	<i>P. chlamydospora</i>	Paulsen 1103/cruzamento entre <i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis rupestris</i>	Pontuações escuras	Esporão	Santana do Livramento, RS	Nov./15	KY984077.1
TD 636	<i>P. chlamydospora</i>	Paulsen 1103/cruzamento entre <i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis rupestris</i>	Pontuações escuras	Parte superior do tronco	Santana do Livramento, RS	Nov./15	KY984074.1

"Continua..."

Tabela 1. Continuação.

Código	Identificação morfológica	Variedade de videira/genótipo	Sintomas	Partes da planta	Localidade de coleta	Data de coleta	Código GenBank
TD 642	<i>P. chlamydospora</i>	Paulsen 1103/ cruzamento entre <i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis rupestris</i>	Pontuações escuras	Parte superior do tronco	Santana do Livramento, RS	Nov./15	KY984075.1
TD 70	<i>P. chlamydospora</i>	Isabel/cruzamento entre <i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	Linhas pretas	Braço	Farroupilha, RS	Out./14	KY984090.1
TD 624	<i>P. chlamydospora</i>	Paulsen 1103/ cruzamento entre <i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis rupestris</i>	Pontuações escuras	Ponto de enxertia	Bento Gonçalves,RS	Nov./15	KY984091.1
TD 654	<i>P. chlamydospora</i>	Paulsen 1103/ cruzamento entre <i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis rupestris</i>	Madeira castanho-avermelhada	Final basal do porta-enxerto	Vacaria, RS	Dez./15	KY984092.1
TD 706	<i>P. chlamydospora</i>	Merlot/ <i>Vitis vinifera</i>	Pontuações escuras	Braço	Veranópolis, RS	Dez./15	KY984093.1
TD 563	<i>P. chlamydospora</i>	Cabernet Sauvignon/ <i>Vitis vinifera</i>	Pontuações escuras	Final basal do porta-enxerto	Farroupilha, RS	Set./15	KY984094.1
TD 571	<i>P. chlamydospora</i>	Bordô/ <i>Vitis labrusca</i>	Pontuações	Braço	Flores da Cunha, RS	Mar./14	-
TD 463	<i>P. chlamydospora</i>	Isabel/cruzamento entre <i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i>	Pontuações	Ponto de enxertia	Farroupilha, RS	Dez./14	-
BRM 006263	<i>Phaeoacremonium</i> spp.	<i>Vitis labrusca</i>	-	Pé-franco	Flores da Cunha, RS	2007	MG041383.1
BRM 006265	<i>Phaeoacremonium</i> spp.	<i>Vitis vinifera</i>	-	Desconhecido	Igrejinha, RS	2007	MG041383.1
BRM 006264	<i>Phaeoacremonium angustius</i>	<i>Vitis labrusca</i>	-	Pé-franco	São Marcos, RS	2003	MG041382.1

permaneceram sob agitação em mesa agitadora, em temperatura ambiente. Em seguida, o meio foi filtrado em um sistema utilizando trompa de vácuo e kitazato com papel filtro nº 1. Por fim, a biomassa micelial foi recolhida em tubos de 1,5 mL e estocada a -20 °C (Lobato; Cavalcanti, 2021).

Extração de DNA

A extração de DNA foi conduzida seguindo o protocolo fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (FAI), baseado em Sambrook e Russel (2001). Inicialmente, pérolas de vidro foram adicionadas a um tubo com tampão de extração (TE). Biomassa micelial e FAI foram adicionados, seguidos de agitação e adição de TE. Após centrifugação (11.200 x g) durante 6 minutos em centrífuga, o sobrenadante foi transferido e repetiu-se a adição de FAI, agitação e centrifugação.

Após sucessivas adições de clorofórmio e etanol, seguidas de centrifugação, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se etanol 75% e centrifugou-se novamente. O sobrenadante final foi descartado, deixando os tubos com DNA secarem a 37 °C por 12 horas. O DNA foi ressuspensão em água ultrapura e os tubos fechados expostos a 37 °C por 12 horas adicionais. Os tubos com DNA extraído foram armazenados a -20 °C para uso analítico.

Protocolos de PCR

Os ensaios de PCR foram realizados a partir do DNA total extraído da biomassa micelial dos isolados dos fungos causadores de “chocolate”, em vinhedos gaúchos (Tabela 1).

Para cada análise de PCR, foi preparada uma mistura (*mix*) contendo: água ultrapura, tampão, MgCl₂ (cofator da Taq polimerase), dNTPs, o par de

iniciadores de interesse, a enzima Taq polimerase e uma alíquota do DNA extraído, como descrito na Tabela 2. O *mix* foi então colocado em um termociclador para a obtenção dos produtos de PCR de interesse. Os iniciadores foram desenhados para amplificação de regiões específicas do DNA genômico do fungo.

As amplificações por PCR do DNA dos isolados de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp., foram realizadas utilizando-se os iniciadores: ITS1/ITS4 (White et al., 1990); T1/Bt2b (Glass; Donaldson, 1995; O'Donnel; Cigelnik, 1997) e EF1-728F/EF1-986R e EF1-728F/EF1-1567R (Carbone; Kohn, 1999; Rehner; Buckley, 2005) (Tabela 3). Para a detecção específica de *P. chlamydospora* foram utilizados os iniciadores Pch1/Pch2 (Tegli et al., 2000) e Pmo1/Pmo2 (Overton et al., 2004).

Para os ajustes nas condições da PCR foram consideradas as recomendações metodológicas citadas que referenciam os iniciadores selecionados para o presente estudo. Para a escolha das temperaturas de pareamento (ótimo de anelamento) de cada iniciador, foram consideradas as informações de temperatura de *melting* (Tm) (temperatura de dissociação), fornecidas pela empresa responsável por sintetizar os oligonucleotídeos, confirmadas com o uso de *software* para estimar temperatura de pareamento.

Para resumir as informações sobre os ciclos de PCR utilizados nos trabalhos de amplificação de regiões do DNA de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. segue a Tabela 4.

Eletroforese em gel de agarose foi empregada para cada reação de PCR. Géis em concentração de 1,2% foram preparados com tampão TBE 1x (10,8 g Tris-base; 5,5 g de ácido bórico; 4,0 ml de 0,5M EDTA, pH 8,0, em 1 L de água padrão Milli-Q). Nos poços, foram aplicados 4,5 µL de produto de PCR misturado com 1,3 µL de corante azul de bromofenol (na proporção de 1:10 em diluição com glicerol 60%) e, no poço de marcação, 2,2 µL de marcador de peso molecular de 100 pb (com concentração de 0,1 µg/µL). As amostras foram corridas em eletroforese a 120 V em tampão TBE 1x. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL por aproximadamente 20 minutos.

Em seguida, os géis foram visualizados em fotodocumentador. Para identificação do peso molecular, utilizou-se o marcador de peso molecular de 100 pb.

Tabela 2. Composição da mistura para a reação de PCR.

Composição	Concentração	Volume (1x)
Água ultra-pura	-	10,7 µL
Tampão	5x	5,0 µL
MgCl ₂	25 mM	1,5 µL
dNTP	1 mM	4,5 µL
Iniciador direto	20 µM	1,0 µL
Iniciador reverso	20 µM	1,0 µL
Taq polimerase	5 U µL ⁻¹	0,3 µL
DNA	20–40 ng	1,0 µL
Volume final	-	25,0 µL

Sequenciamento pelo método Sanger

Após a confirmação da amplificação dos produtos da PCR resolvidos por eletroforese em agarose, os *amplicons* das regiões ITS, β-tubulina e EF-1α, que não apresentavam produtos de PCR inespecíficos, foram preparados para sequenciamento pelo método de Sanger. Para tanto, o produto de PCR foi inicialmente purificado utilizando as enzimas fosfatase alcalina (*Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), 1 U/µL, e exonuclease (EXO), 2,5 U/µL, e submetido a uma etapa de *clean-up*. O programa utilizado para esse processo incluiu um ciclo de 37 °C por 15 minutos e 80 °C por 15 minutos.

Para quantificação da concentração de DNA das amostras e estimativa das respectivas purezas do DNA amplificado, foi realizada a leitura do DNA purificado (*clean-up*) em espectrofotômetro capilar. Para avaliação da pureza do DNA foram utilizados os critérios da razão entre as absorvâncias de 260–280 nm e 260–230 nm (Lobato; Cavalcanti, 2021).

Após a leitura, constatada a pureza ideal das amostras, em um tubo de 0,5 mL foi adicionada a quantidade de DNA molde para se atingir um valor de 60 ng de DNA e o iniciador direto (*forward*, utilizado na reação de sequenciamento) a 4,5 pmol. Por fim, as amostras foram secas e enviadas à empresa responsável pelo sequenciamento. O sequenciamento de nucleotídeos foi realizado pelo Método de Sanger. A empresa contratada realizou o sequenciamento de DNA a partir de produtos de PCR purificados. O tamanho das seqüências obtidas foi de 550 pares de base (bp), em média.

Tabela 3. Iniciadores utilizados na pesquisa.

Região	Iniciadores	Direção	Sequência de Nucleotídeos (5'→3') ⁽¹⁾	Número de pares de bases (pb)
ITS 1/2	ITS 1	Direto	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19
	ITS 4	Reverso	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20
β-tubulina	T1	Direto	ACCATGCGTGAGATTGTAAGT	21
	Bt2b	Reverso	CCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	23
Fator de Elongação	EF1-728F	Direto	CATCGA GAAGTTCGAGAAGG	20
	EF1-986R	Reverso	TACTTGAAGGAACCCTTACC	20
	EF1-1567R	Reverso	ACHGTRCCRATACCACCRATCTT	23
Iniciadores específicos para <i>P. chlamydospora</i>	Pch 1	Direto	CTCCAACCCTTGTATTATC	18
	Pch 2	Reverso	TGAAAGTTGATATGGACCC	19
	Pmo 1	Direto	GTTACATGTGACGTCTGAACG	21
	Pmo 2	Reverso	GTTACATGTGACGTCTGAACG	21

⁽¹⁾ H e R: posições degeneradas correspondentes aos nucleotídeos (A, C, T) e (A, G), respectivamente.

Tabela 4. Resumo das configurações de amplificação.

Fungo	Região	Iniciadores	Desnaturação	Amplificação	Extensão	Referência
<i>P. chlamydospora</i> <i>Phaeoacremonium</i> spp.	ITS	ITS1/ITS4	95 °C/ 5 min	39 ciclos (95 °C/30 s; 60 °C/1 min; 2 °C/1 min)	72 °C/ 10 min	White et al. (1990)
<i>P. chlamydospora</i>	β-tubulina	T1/Bt2b	95 °C/ 4 min	37 ciclos (96 °C/1 min; 61,6 °C/55 s; 72 °C/90 s)	72 °C/ 10 min	O'Donnell e Cigelnik (1997)
<i>Phaeoacremonium</i> spp.	β-tubulina	T1/Bt2b	95 °C/ 4 min	36 ciclos (96 °C/1 min; 58,5 °C/55 s; 72 °C/90 s)	72 °C/ 10 min	O'Donnell e Cigelnik (1997)
<i>P. chlamydospora</i>	Fator de elongação (EF-1α)	EF1-728F/ EF1-986R	95 °C/ 8 min	35 ciclos (95 °C/15 s; 52 °C/1 min; 72 °C/60 s)	72 °C/ 10 min	Carbone e Kohn (1999)
<i>P. chlamydospora</i> <i>Phaeoacremonium</i> spp.	Fator de elongação (EF-1α)	EF1-728F/ EF1-1567R	95 °C/ 5 min	35 ciclos (95 °C/30 s; 55,7 °C/1 min; 72 °C/60 s)	72 °C/ 10 min	Lobato e Cavalcanti (2021)
<i>P. chlamydospora</i>	ITS	Pch1/Pch2	95 °C/ 5 min	28 ciclos (95 °C/30 s; 55,8 °C/50 s; 72 °C/60 s)	72 °C/ 10 min	Tegli et al. (2000)
<i>P. chlamydospora</i>	ITS	Pmo1/ Pmo2	95 °C/ 5 min	39 ciclos (95 °C/30 s; 68 °C/50 min; 72 °C/60 s)	72 °C/ 10 min	Overton et al. (2004)

Digestão do DNA para procedimentos de PCR-RFLP (CAPS)

Para gerar padrões de PCR-RFLP em ensaios *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences* (CAPS), os produtos da PCR purificados das regiões ITS, β-tubulina e EF-1α foram digeridos, de forma individual, com duas endonucleases de restrição: *HaeIII* e *CfoI* (ambas 10 U/μL).

Os ensaios seguiram orientação do fabricante das enzimas. As clivagens enzimáticas foram realizadas conforme reações apresentadas na Tabela 5, durante 2 horas e 30 minutos a 37 °C. Para detectar os fragmentos gerados pela digestão enzimática, eletroforese foi corrida em gel de agarose a 3% em solução tampão de TBE 1X.

Tabela 5 - Composição para reações de PCR-RFLP.

Composição	<i>CfoI</i> (1X)	<i>HaeIII</i> (1X)
Água ultrapura	3,65 µL	3,5 µL
Tampão fabricante 10X	1,0 µL	1,0 µL
Soro BSA	0,1 µL	-
Enzima	0,25 µL	0,5 µL
Produto da PCR	5,0 µL	5,0 µL
Volume total	10,0 µL	10,0 µL

Estudos filogenéticos em *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp.

A partir dos produtos de PCR das três regiões analisadas (ITS, EF-1 α e β -tubulina) dos patógenos de tronco da videira abordados nesse estudo, sequências entre 200–900 pb foram obtidas e estudos filogenéticos foram realizados por meio de ferramentas de bioinformática.

Inicialmente, os eletroferogramas correspondentes às sequências foram revisados em um interpretador de intensidade de fluorescência em função do tempo ou da posição da base no sequenciamento. Para correção de falhas de ambiguidade em resíduos, ou baixo escore *Phred*. As sequências “depuradas” foram comparadas àquelas disponíveis na base de sequências de nucleotídeos do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) por meio da aplicação *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTN) disponível *online*. Para cada sequência, o BLASTN gerou informações sobre alinhamento e homologia das sequências, e uma lista de acessos ordenados por escores percentuais de identidade (*Query cover* e *Ident*). As informações de identidade de sequência fornecidas pelo BLASTN confirmaram a identificação morfológica dos isolados de *Phaeoacremonium* spp. e *P. chlamydospora*, que, por diante, foram denominados “isolados de referência”. As sequências depuradas dos isolados de referência de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. foram, então, organizadas em arquivos formato .FASTA para o alinhamento e as análises filogenéticas dos isolados estudados.

Com os arquivos FASTA contendo as sequências depuradas dos isolados de referência, foi realizado o alinhamento dos isolados em estudo com o uso da ferramenta de alinhamento múltiplo de sequências de DNA. Arquivos de alinhamento foram gerados e importados para o *software* para análise de dados

moleculares e estudos de evolução molecular, para a construção de árvores filogenéticas referentes aos isolados de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. estudados, para cada região do DNA genômico (ITS, EF-1 α e β -tubulina). As árvores foram construídas a partir dos alinhamentos individuais de cada região, e, por fim, a partir de informações concatenadas das três regiões abordadas neste trabalho. As sequências foram concatenadas com o uso da ferramenta de bioinformática para este fim.

A história evolutiva dos isolados neste estudo cujas sequências, alinhadas para os estudos filogenéticos, foi inferida pelos métodos *Neighbor-Joining* (NJ), *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) e/ou Máxima Parcimônia (MP). O método MP foi utilizado, neste trabalho, para reconstruções filogenéticas dos dados de sequência concatenados entre as três regiões de estudo. A estatística selecionada para gerar estimativas de confiabilidade para os desdobramentos evolutivos foi o teste de *bootstrap* ajustado para 1.500 repetições. As árvores filogenéticas foram desenhadas a partir de seus métodos e respeitando-se a escala evolutiva gerada. As distâncias evolutivas foram computadas utilizando o método *p-distance*.

Resultados e discussão

Ajustes de temperatura para PCRs das três regiões do genoma dos patógenos

A amplificação do DNA de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. com os iniciadores ITS1/4 já foi descrita na literatura (Groenewald et al., 2001). Como relataram esses autores, o par ITS1/4 foi utilizado nos estudos filogenéticos de *Phaeoacremonium* e espécies de *Phaeomoniella*, isolados de diversos países dos continentes europeu, africano e americano. Mais recentemente Ferreira et al. (2017) também utilizaram os iniciadores ITS1/4 para estudos filogenéticos em fungos causadores da doença de Petri no estado de São Paulo.

Para ajustar as condições de PCR considerando os DNAs miceliais dos isolados gaúchos, levou-se em consideração a informação da temperatura de *melting* apresentada pela fornecedora do par de iniciadores, 68,5 °C para ITS1 e 61,5 °C para ITS4. Antes das PCRs, as temperaturas de pareamento foram estudadas por uma ferramenta de bioinformática para o devido fim. A análise dos iniciadores na ferramenta recomendou temperaturas de pareamento

de 64,5 °C para o ITS1 e de 57,8 °C para ITS4. Após ajustes, a temperatura de pareamento foi de 60 °C, amplificando fragmento entre 500–600 pb (Figuras 1 e 2), produto esperado para a região ITS de fungos fitopatogênicos.

O espaçador interno transcrito (ITS) é uma região do DNA ribossomal dos eucariotos que se posiciona entre as regiões 18S rDNA (ITS1) e 5.8S rDNA (ITS2). Os genes das subunidades grande e pequena do ribossomo constituem uma região do DNA que possui informações úteis para identificação e caracterização de fungos (Korabecna, 2007). Mesmo sob mecanismos biológicos gerais de variabilidade (recombinação gênica) e passíveis de processamento pós-transcricional (*splicing*), a região do espaçador interno transcrito possui uma taxa evolutiva lenta, o bastante para servir de fonte de informação genética conservada, suficiente para caracterizar fungos verdadeiros e discriminar táxons dentro deste reino. De acordo com White et al. (1990), a ITS é uma região adequada para estudos filogenéticos em fungos por evidenciarem uma evolução mais rápida entre gêneros, sendo suficientemente conservadas possibilitando discriminação interespecífica em populações de isolados da mesma espécie. Desta forma, a identificação molecular de isolados de *Phaeoacremonium* spp. e *P. chlamydospora*, foi iniciada com a utilização dos iniciadores ITS1/4 (White et al., 1990) para amplificar um DNA intermediário ao ITS1 e ao ITS2.

As reações de amplificação do DNA de *Phaeoacremonium* spp. e *P. chlamydospora* com os iniciadores T1/Bt2b já foram descritas na literatura. Analogamente ao trabalho com a região do espaçador interno transcrito, Groenewald et al. (2001) utilizaram esses iniciadores nos estudos filogenéticos de *Phaeoacremonium* e espécies de *Phaeoconiella*. Também, Essakhi et al. (2008), relataram a utilização desse par de iniciadores em trabalhos de caracterização molecular e fenotípica de novas espécies de *Phaeoacremonium* isoladas de videiras com esca na Itália. Da mesma forma, Ferreira et al. (2017), utilizaram os iniciadores para estudos filogenéticos em fungos causadores da doença de Petri no estado de São Paulo.

Para os trabalhos envolvendo a sequência parcial de β -tubulina, as temperaturas de pareamento calculadas para os iniciadores utilizados basearam-se nas informações da T_m dos iniciadores fornecidas pela fabricante, respectivamente de 58,7 °C e 70,3 °C

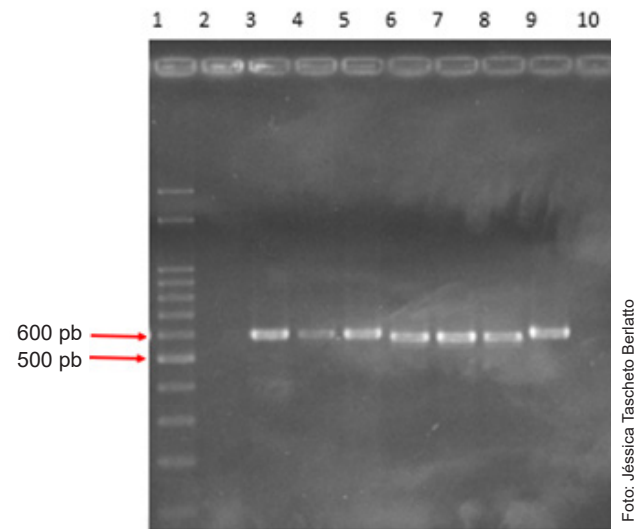


Foto: Jéssica Tascheilo Berlatto

Figura 1. Gel de agarose apresentando produtos de PCR da região ITS1/2 dos isolados de *P. chlamydospora*. Ordem no gel: Marcador de peso molecular - 100 pb (1); Controle negativo (2); TD181 (Pch) (3); TD538 (Pch) (4); TD336 (Pch) (5); TD537 (Pch) (6); TD462 (Npar) (7); TD464 (Npar) (8); TD461 (Npar) (9); Poço vazio (10).

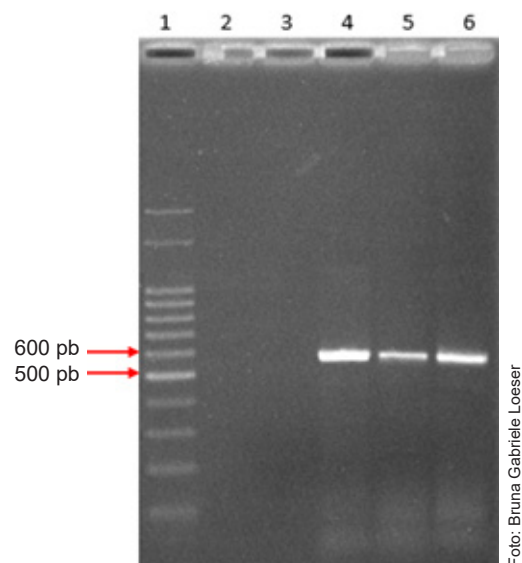


Foto: Bruna Gabriele Loeser

Figura 2. Gel de agarose apresentando produtos de PCR dos isolados de *Phaeoacremonium* spp. na região ITS 1/2. Ordem no gel: Marcador de peso molecular - 100 pb (1); Poço vazio (2); Controle negativo (3); BRM006263 (4); BRM006264 (5); BRM006265 (6).

para os iniciadores T1 e Bt2b. Conforme procedimento anterior utilizou-se a mesma ferramenta para estudo das temperaturas de pareamento, que sugeriu as temperaturas de 54,9 °C para o iniciador T1 e de 66,8 °C para o iniciador Bt2b. Assim,

os ensaios na PCR foram executados para a região BTUB. Por fim, a temperatura de pareamento que apresentou os melhores resultados para os isolados de *P. chlamydospora* foi 61,6 °C permitindo amplificação dos fragmentos entre 600–700 pb (Figura 3). Para os isolados de *Phaeoacremonium* spp. a temperatura de pareamento foi de 58,5 °C capaz de amplificar fragmentos entre 700–800 pb (Figura 4).

A obtenção de fragmentos de DNA associados ao fator de alongação EF-1 α do DNA genômico dos isolados gaúchos de *P. chlamydospora* utilizou dois pares de iniciadores. Na abordagem inicial, EF-1-728F/986R foram adotados da literatura para *P. chlamydospora*, como por exemplo, Cobos e Martin (2008) em estudo de caracterização molecular de *P. chlamydospora* isolada de videiras em Castela e Leão, na Espanha. Também, Úrbez-Torres e Gúbler (2011) descreveram o uso desse par de iniciadores em estudo sobre doenças do tronco da videira na Colúmbia Britânica, Canadá, relatando a incidência e caracterização dos patógenos fúngicos associados à doença de esca e Petri. Após os ajustes, as temperaturas de pareamento recomendadas foram 61,5 °C para EF1-728F, e 57,2 °C para EF1-986R. De acordo com a simulação em bioinformática, as temperaturas indicadas foram de 57,6 °C para EF1-728F e 53,5 °C para EF1-986R. Após os ajustes nas condições da PCR, a temperatura de pareamento foi de 55,7 °C para os isolados de *P. chlamydospora* estudados.

De fato, os produtos de PCR obtidos com esse par de iniciadores possuíam 200-300 pb (Figura 5) e as sequências desses *amplicons* foram amplamente encontradas na base de dados do GenBank. Entretanto, o tamanho relativamente reduzido do fragmento obtido com os iniciadores EF1-728F/986R na reação não permitiu a geração de padrões de fragmentação por PCR-RFLP capazes de discriminar *P. chlamydospora*.

Desta forma, outro iniciador reverso foi testado, o EF1-1567R, em mistura com o mesmo iniciador direto do ensaio anterior. Nas novas tentativas feitas com o segundo par de iniciadores, foram obtidos produtos de PCR com tamanhos entre 800–900 pb para *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. (Figuras 6 e 7). Esses amplicons, quando utilizados nas reações de PCR-RFLP, foram capazes de gerar padrões de fragmentação característicos para *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. na região estudada. A amplificação do DNA de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. com os iniciadores

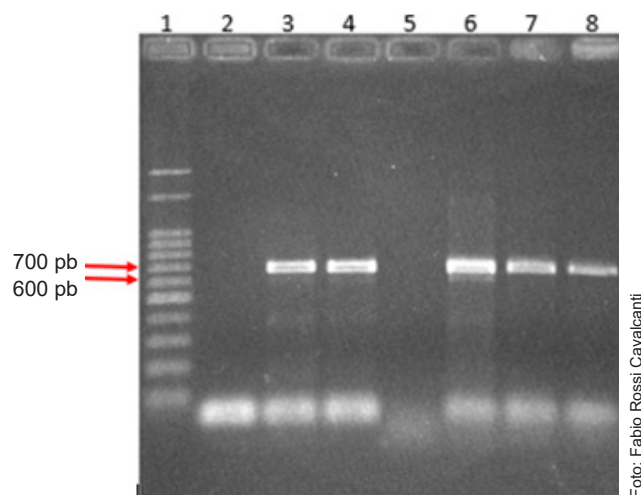


Foto: Fabio Rossi Cavalcanti

Figura 3. Gel de agarose apresentando produtos de PCR da região β -tubulina para isolados de *P. chlamydospora*. Ordem no gel: Marcador de peso molecular - 100 pb (1); Controle negativo (2); TD340 (3); TD455 (4); Poço vazio (5); TD624 (6); TD654 (7); TD706 (8).

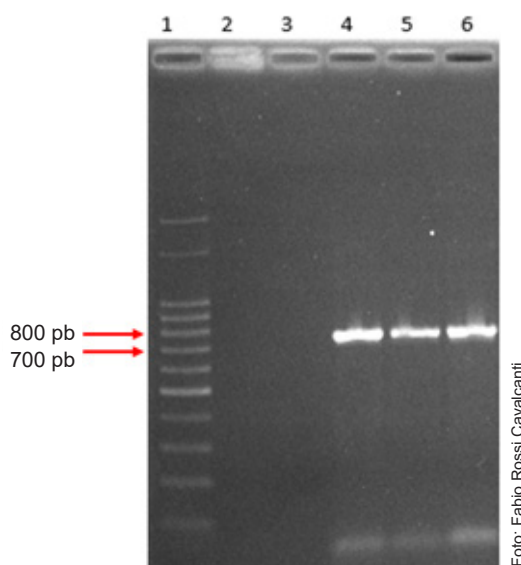


Foto: Fabio Rossi Cavalcanti

Figura 4. Gel de agarose apresentando produtos de PCR da região β -tubulina para isolados de *Phaeoacremonium* spp. Ordem no gel: Marcador de peso molecular - 100 pb (1); Poço vazio (2); Controle negativo (3); BRM006263 (4); BRM006264 (5); BRM006265m (6).

EF1-728F/1567R ainda não havia sido descrita. Também não há registros de sequências de nucleotídeos dessa região do DNA de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. depositadas no Genbank.

Os produtos de PCR da segunda combinação de iniciadores para EF-1 α (EF1- 728F/1567R) foram adotados para os trabalhos envolvendo PCR-RFLP e os estudos filogenéticos dos isolados de

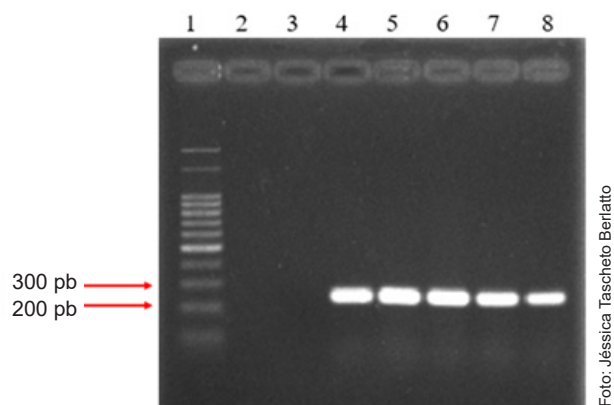


Foto: Jéssica Tascheto Berlatto

Figura 5. Gel de agarose apresentando produtos de PCR de isolados de *P. chlamydospora* na região Fator de Elongação com os iniciadores EF1- 728F/EF1- 986R. Ordem no gel: Marcador de peso molecular - 100pb (1); Poço vazio (2); Controle negativo (3); TD463 (4); TD457 (5); TD639 (6); TD635 (7); TD642 (6).

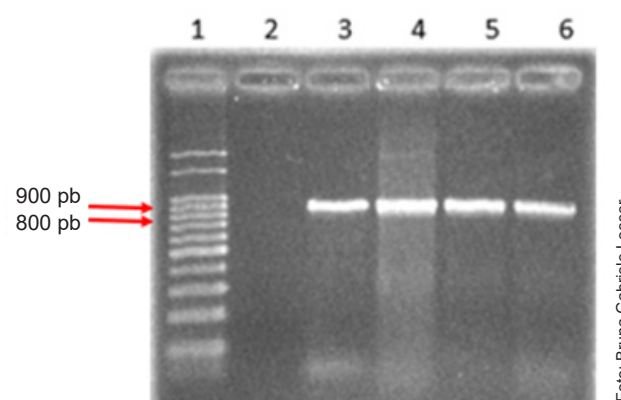


Foto: Bruna Gabriele Loesser

Figura 6. Gel de agarose apresentando produtos de PCR de isolados de *P. chlamydospora* na região Fator de Elongação com os iniciadores EF1- 728F/EF1- 1567R. Ordem no gel: Marcador de peso molecular - 100 pb (1); Poço vazio (2); Controle negativo (2); TD157 (3); TD537 (4); TD463 (5); TD642 (6).

P. chlamydospora e *Phaeoacremonium* spp. pelo fato de os fragmentos serem mais informativos. As temperaturas de pareamento, determinadas a partir da informação de T_m dos iniciadores fornecidas pelo fabricante, foram 61,5 °C para EF1-728F e 53,7 °C para EF1-1567R. De acordo com a estimativa de temperatura de pareamento, as temperaturas sugeridas foram 57,6 °C e 56 °C para os iniciadores, respectivamente. Assim, após ajustes na PCR, constatou-se que a temperatura de pareamento para os isolados de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. foi 55,7°C para EF1-728F/1567R, resultando na amplificação de fragmentos entre 800–900 pb (Figuras 6 e 7).

Sequenciamento das regiões ITS1/2, β -tubulina e EF-1 α

Analisando os produtos de PCR, as amostras que não apresentavam amplificações inespecíficas, ou seja, as que apresentavam apenas um *amplicon* evidente e na região esperada na eletroforese, foram selecionados para preparo e sequenciamento de DNA. Foram sequenciados 26 isolados de *P. chlamydospora* com os iniciadores ITS1/4, 20 com os iniciadores T1/Bt2b, 16 com os iniciadores EF1-728F/986R e 19 com os iniciadores EF1-728F/1567R. Com relação ao *Phaeoacremonium* spp. os três isolados da CMIA, foram caracterizados nas três regiões estudadas do DNA do microrganismo. Na consulta ao Genbank empregando a ferramenta BLASTN, todas as sequências das

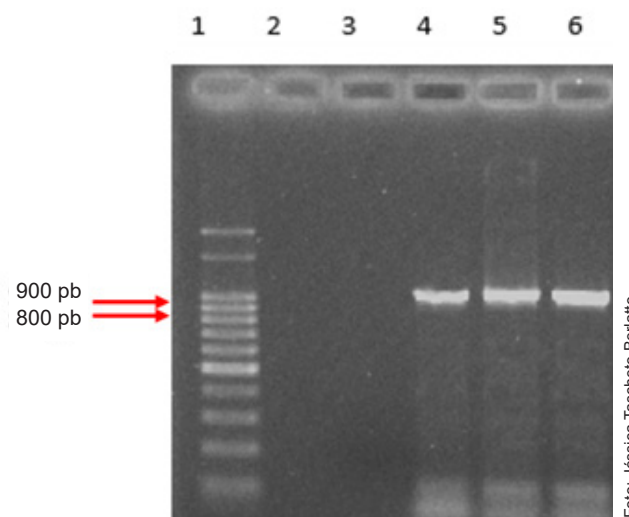


Foto: Jéssica Tascheto Berlatto

Figura 7. Gel de agarose apresentando produtos de PCR de isolados de *Phaeoacremonium* spp. na região Fator de Elongação com os iniciadores EF1- 728F/EF1- 1567R. Ordem no gel: Marcador de peso molecular - 100 pb (1); Poço vazio (2); Controle negativo (3); BRM 006263 (4); BRM 006264 (5); BRM 006265 (6).

regiões ITS e BTUB dos isolados de *P. chlamydospora* apresentaram cobertura superior a 80% e uma identidade igual ou maior que 98%, quando comparadas às sequências de *P. chlamydospora* depositadas. Confirmações similares foram conseguidas com as sequências de EF-1 α entre 200 e 300 pb, obtidas de amplificações com o par de iniciadores EF1-728F/986R. No entanto, considerando o *amplicon* maior de EF-1 α , entre 800–900 pb, obtido por

amplificações usando o par EF1-728F/1567R, quando tais sequências foram submetidas ao BLASTN, foram obtidas sequências de outros microrganismos, principalmente dos gêneros *Exophiala*, *Fonsecaea* e *Beauveria*. Essas sequências apresentaram valores de cobertura em torno de 80% e identidade de 90%. Este fato pode ser atribuído à ausência de sequências da região contida entre os iniciadores EF1-728F/1567R no DNA de *P. chlamydospora*.

Ao analisar as sequências de *Phaeoacremonium* spp. com o BLASTN, todas as sequências submetidas da região ITS e BTUB apresentaram cobertura superior a 98% e identidade igual a 100%, quando comparado às sequências de *Phaeoacremonium* spp. das bases de dados do GenBank. Quando as sequências dos isolados de *Phaeoacremonium* spp. da região EF-1 α foram analisadas por BLASTN constatou-se a comparação dessas sequências a *Togninia minima*, teleomorfo de *Phaeoacremonium aleophilum*, isolada em São Paulo por Ferreira et al. (2017) (cobertura de 81% e identidade maior ou igual a 99%). Também retornou sequência de *Phaeoacremonium minimum*, no entanto apresentando cobertura de 44% e uma identidade de 99%. Fato que pode ser atribuído à utilização de iniciadores próximos ao par EF1-728F/1567R, gerando sequências semelhantes.

O presente estudo trouxe informações novas a respeito da região EF-1 α de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. devido à adoção do par de iniciadores EF1-728F/1567R. Vinte e quatro isolados de *P. chlamydospora* e três de *Phaeoacremonium* spp. obtidos de plantas de videira com podridão de tronco, recolhidas em vinhedos comerciais de municípios gaúchos, tiveram suas sequências ITS1/2 depositadas no GenBank (NCBI), e seus respectivos números de acesso encontram-se na Tabela 1.

PCR-RFLP das regiões ITS1/2, β -tubulina e Fator de Elongação

Foram realizados ensaios de PCR-RFLP (CAPS) para levantamento de informações sobre restrição dos produtos de PCR das três regiões estudadas (ITS1/2, β -tubulina e Fator de Elongação). Essas informações podem auxiliar a identificação molecular de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. Para isso, os produtos de PCR das regiões supracitadas foram submetidos à restrição enzimática utilizando as endonucleases *HaeIII* e *CfoI*. Esteve-Zarzoso et al. (1999) utilizaram essas enzimas para analisar

o polimorfismo da região ITS (utilizando iniciadores ITS 1/4) de diferentes espécies de leveduras, obtendo resultados satisfatórios.

Trabalhos envolvendo a digestão de produtos de amplificação de DNA de *Phaeoacremonium* com a enzima de restrição *CfoI* foram relatados na literatura. Dupont et al. (2000) realizaram a identificação de *Phaeoacremonium* por PCR-RFLP do ITS com a enzima de restrição *CfoI*, na França. Aroca e Raposo (2007) conseguiram distinguir espécies de *Phaeoacremonium*, isoladas em viveiros da Espanha, com a digestão da amplificação da região ITS com enzima *CfoI*, obtendo a distinção de *Phaeoacremonium venezuelense* pela presença de um fragmento de 296 pb; *Phaeoacremonium inflatipes* por fragmento de 241 pb; *Phaeoacremonium mortoniae* mostrou fragmento de 192 pb e *Phaeoacremonium krajdennii* com fragmento de 297 pb; *Phaeoacremonium angustius* e *Phaeoacremonium viticola* não foram distinguíveis pela digestão do amplicon com a enzima. Da mesma forma, Aroca e Raposo (2007) obtiveram um padrão de bandas com a digestão da enzima *CfoI*, o que permitiu a diferenciação das espécies de *Phaeoacremonium*, exceto *P. angustius* e *P. viticola*, na Espanha.

Com as sequências das três regiões estudadas (ITS, BTUB, EF-1 α), foi possível executar simulações *in silico* para a clivagem dos produtos de PCR selecionados, com a utilização de um programa de simulação de clivagem de sítios de restrição em sequências de DNA. Com o emprego da enzima *HaeIII* em amplicons de *Phaeoacremonium* spp., as sequências da região ITS apresentaram pequena diferença com relação a distância entre os sítios de clivagem abaixo do 100 pb. Mesmo caso ocorreu entre os isolados TD487 e TD457 na região BTUB digeridos com a enzima *CfoI*, as bandas entre 200 e 300 pb apresentaram diferença com relação a distância entre os sítios de clivagem. A região EF-1 α não apresentou diferença entre os isolados.

Para *Phaeoacremonium* spp., na região EF-1 α houve diferença no isolado BRM006263 com o uso da enzima *HaeIII*, com o reconhecimento de apenas dois sítios de clivagem entre 100 e 200 pb. O contrário ocorreu com as demais sequências, com o reconhecimento de três sítios de clivagem entre 100 e 200 pb. Nesta região também ocorreu diferença com o mesmo isolado utilizando a enzima *CfoI*, sendo que não houve o reconhecimento de sítios de clivagem entre 200 e 300 pb, e sim dois sítios de clivagem entre a região 100 e 200 pb. Para os demais

isolados um sítio de clivagem foi reconhecido entre 200–300 pb e outro entre 100–200 pb. As demais regiões (ITS e BTUB) não apresentaram diferença entre os isolados (Figuras 8, 9, 10 e 11).

Analisando os dados obtidos na simulação *in silico*, foi possível prever os resultados da análise de PCR-RFLP e averiguar se as reações ocorreram conforme o esperado. Nas figuras 8, 9, 10 e 11 estão apresentados os resultados do ensaio *in vitro* de RFLP com os produtos de PCR das três regiões do DNA, com as duas enzimas de restrição utilizadas.

Utilizando uma ferramenta de análise de imagens obtidas a partir de técnicas como eletroforese em gel foi possível estimar valores (em pares de base) dos padrões de fragmentação dos produtos de PCR de *P. chlamydospora* gerados pela clivagem enzimática com as enzimas *HaeIII* e *CfoI*.

É perceptível o baixo polimorfismo apresentado pelos isolados TD157 e TD537, amplificados na região EF-1 α , quando submetidos à clivagem enzimática com a enzima *HaeIII* (Figura 8). No perfil de fragmentação o isolado TD157 apresenta três fragmentos: um entre a região de 300–400 pb; um na região de 200–300 pb e uma abaixo de 100 pb, o mesmo perfil apresentado pelo isolado TD537. Com a clivagem da enzima *CfoI* (Figura 9) nas sequências da mesma região (EF-1 α) é perceptível uma banda adicional, entre 900–1000 pb, no isolado TD537 quando comparado ao isolado TD157, banda do próprio *amplicon* que não foi digerida.

Com relação a *P. chlamydospora*, os resultados do RFLP (Figura 9) com a enzima *CfoI* para as regiões ITS e BTUB quando comparados às simulações *in silico* apresentaram resultados coerentes. Apenas o isolado TD537, amplificado na região EF-1 α , apresentou uma banda adicional quando comprado com o resultado esperado para *CfoI*. Os resultados do RFLP com a enzima *HaeIII* (Figura 8) para as regiões ITS e BTUB estão coerentes com os resultados da simulação *in silico*. Os resultados de fragmentação estão resumidos na Tabela 6.

Utilizando o software de análise de geis foi possível estimar os padrões de fragmentação de *Phaeoacremonium* spp. gerados pela clivagem enzimática com a enzima *HaeIII* e *CfoI* (Tabela 7).

Os produtos da amplificação da região ITS dos isolados BRM006263, BRM006264 e BRM006265 apresentaram polimorfismo quando submetidas à clivagem enzimática com a enzima *HaeIII* (Figura 10).

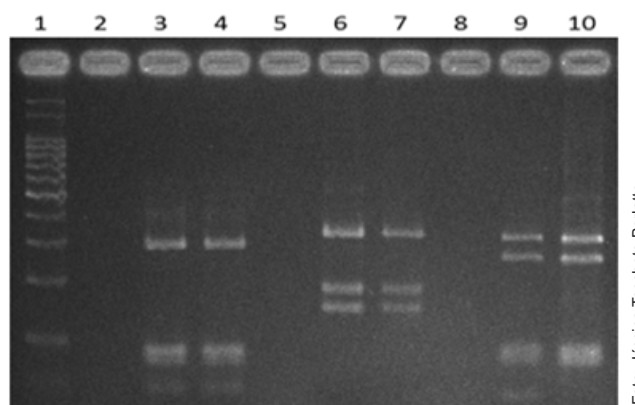


Foto: Jéssica Tascheto Berlatto

Figura 8. Perfil de restrição com a enzima *HaeIII* do produto da amplificação das regiões ITS, BTUB e EF-1 α de isolados de *P. chlamydospora*. Ordem do gel: Marcador de peso molecular (1); Poço Vazio (2); TD157 (ITS) (3); TD 457 (ITS) (4); Poço Vazio (5); TD487 (BTUB) (6); TD457 (BTUB) (7); Poço Vazio (8); TD157 (EF-1 α) (9); TD537 (EF-1 α) (10).

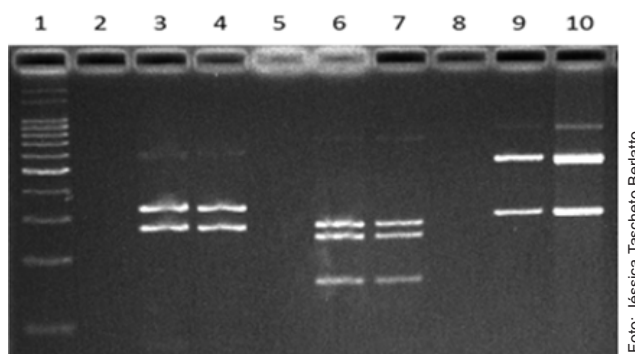


Foto: Jéssica Tascheto Berlatto

Figura 9. Perfil de restrição com a enzima *CfoI* do produto da amplificação das regiões ITS, BTUB e EF-1 α de isolados de *P. chlamydospora*. Ordem no gel: Marcador de peso molecular (1); Poço Vazio (2); TD157 (ITS) (3); TD 457 (ITS) (4); Poço Vazio (5); TD487 (BTUB) (6); TD457 (BTUB) (7); Poço Vazio (8); TD157 (EF-1 α) (9); TD537 (EF-1 α) (10).

O perfil de fragmentação do amplicon do isolado BRM006263 apresentou quatro fragmentos: na região entre 200–300 pb; na região entre 100–200 pb e dois abaixo de 100 pb. O isolado BRM006264 mostrou seis fragmentos, um em cada região: 600–700 pb; 300–400 pb; 20–300 pb; 100–200 pb e dois abaixo de 100 pb. E o isolado BRM006265 apresentou cinco fragmentos, um em cada região 300–400 pb; 200–300 pb; 100–200 pb e dois abaixo de 100 pb. Isso fundamenta a identificação dos microrganismos, uma vez que o isolado BRM006264 foi caracterizado como *Phaeoacremonium angustius*, e os demais

Tabela 6. Padrões de fragmentos gerados pela clivagem enzimática (*HaeIII* e *CfoI*) de isolados de *P. chlamydospora*, estimados com auxílio de ferramenta para análise de géis de agarose.

Isolado	Localidade	ITS 1/4 (pb)	
		<i>HaeIII</i>	<i>CfoI</i>
TD 157	Pinto Bandeira, RS	291; 80; 52	360; 286
TD 457	Vacaria, RS	294; 81; 52	360; 286
		T1/Bt2b (pb)	
		<i>HaeIII</i>	<i>CfoI</i>
TD 487	Campestre da Serra, RS	336; 172; 137	300; 260; 152
TD 457	Vacaria, RS	332; 170; 135	304; 263; 154
		EF1-728F/1567R (pb)	
		<i>HaeIII</i>	<i>CfoI</i>
TD 157	Pinto Bandeira, RS	320; 252; 79	661; 347
TD 537	Caldas, MG	313; 246; 77	963; 653; 347

como *Phaeoacremonium* spp. Assim como *P. chlamydospora*, os três isolados de *Phaeoacremonium* parecem possuir diferentes locais de origem (Tabela 7). Tal resultado difere do previsto (*in silico*), ficando esta observação carente de estudos adicionais.

Analogamente, os amplicons da região EF-1 α de três *Phaeoacremonium* apresentaram polimorfismo submetidos à clivagem com a enzima *CfoI* (Figura 11).

Para o isolado BRM006263, quatro fragmentos foram gerados, um em cada região entre: 400–500 pb; 300–400 pb; 100–200 pb e um abaixo de 100 pb. E para os isolados BRM006264 e BRM006265 foram gerados seis fragmentos, um em cada região entre 700–800 pb; 500–600 pb; 400–500 pb; 300–400 pb; 100–200 pb e um abaixo de 100 pb. Tal resultado pode ser atribuído ao tempo de

incubação, uma vez que o amplicon não conseguiu fragmentar-se totalmente com o tempo utilizado.

Analisando os quatro géis com os fragmentos gerados (nas três regiões estudadas) pela digestão com as duas enzimas de restrição, apesar do baixo polimorfismo apresentado por alguns isolados, foi possível evidenciar que na maioria das reações o padrão de fragmentação se manteve entre os isolados. As diferenças observadas foram principalmente entre as enzimas e entre as regiões estudadas. Isto sugere que as sequências dos isolados possuem baixa variabilidade (Figuras 10 e 11).

Estudos Filogenéticos

No alinhamento da região ITS1/2, realizado no programa GeneDOC 2.7, foi possível observar baixa variabilidade entre os isolados considerando-se

Tabela 7. Padrões de fragmentos gerados pela clivagem enzimática (*HaeIII* e *CfoI*) de isolados de *Phaeoacremonium* spp., estimados com auxílio de ferramenta para análise de géis de agarose.

Isolado	Localidade	ITS 1/4 (pb)		BTUB T1/Bt2b (pb)		EF1-728F/1567R (pb)	
		<i>HaeIII</i>	<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>CfoI</i>
BRM 006263	Flores da Cunha, RS	220; 151; 85; 48	323; 179; 121; 75; 48	385; 323; 171; 122; 48	752; 648; 511; 133; 107; 55	271; 208; 99; 78; 60	481; 372; 182; 72
BRM 006264	São Marcos, RS	637; 364; 218; 150; 84; 48	318; 180; 123; 77; 48	385; 316; 165; 120; 48	752; 654; 516; 134; 109; 55	265; 206; 99; 78; 60	737; 576; 472; 365; 180; 71
BRM 006265	Igrejinha, RS	360; 215; 148; 83; 48	324; 182; 124; 77; 49	380; 312; 164; 119; 48	759; 661; 521; 137; 110; 57	265; 206; 99; 78; 60	715; 565; 463; 357; 179; 70

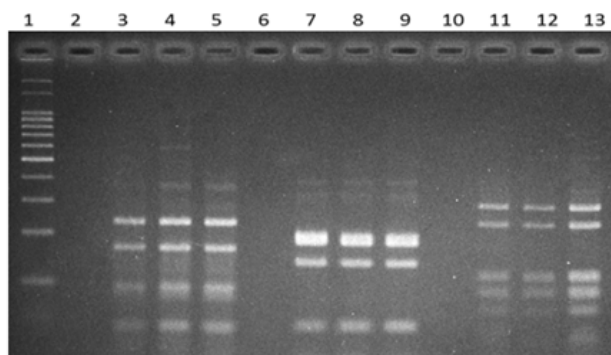


Foto: Jéssica Tascheto Berlatto

Figura 10. Perfil de digestão com a enzima HaeIII do produto da amplificação das regiões ITS, BTUB e EF-1 α dos isolados de *Phaeoacremonium* spp. Ordem no gel: Marcador de peso molecular (1); Poço Vazio (2); BRM006263 (ITS) (3); BRM006264 (ITS) (4); BRM006265 (ITS) (5); Poço Vazio (6); BRM006263 (BTUB) (7); BRM006264 (BTUB) (8); BRM006265 (BTUB) (9); Poço Vazio (10); BRM006263 (EF-1 α) (11); BRM006264 (EF-1 α) (12) e BRM006265 (EF-1 α) (13).

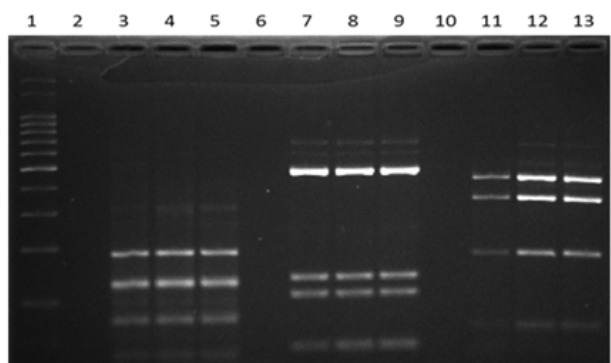


Foto: Jéssica Tascheto Berlatto

Figura 11. Perfil de digestão com a enzima CfoI utilizando do produto da amplificação das regiões ITS, BTUB e EF-1 α dos isolados de *Phaeoacremonium* spp. Ordem no gel: Marcador de peso molecular (1); Poço Vazio (2); BRM006263 (ITS) (3); BRM006264 (ITS) (4); BRM006265 (ITS) (5); Poço Vazio (6); BRM006263 (BTUB) (7); BRM006264 (BTUB) (8); BRM006265 (BTUB) (9); Poço Vazio (10); BRM006263 (EF-1 α) (11); BRM006264 (EF-1 α) (12); BRM006265 (EF-1 α) (13).

todas as regiões genômicas para *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. Tal conclusão está embasada nos resultados obtidos por PCR-RFLP, os quais apresentaram baixo polimorfismo intraespecífico.

Foram alinhadas 26 sequências da região ITS dos isolados de *P. chlamydospora* e três sequências dos isolados de *Phaeoacremonium* spp. estudados. Adicionalmente os isolados de *P. chlamydospora* foram alinhados com 29 isolados da mesma espécie provenientes de outros países e regiões (Espanha, França,

Portugal, Estados Unidos, Chile, África do Sul, Turquia, Nova Zelândia e São Paulo (Brasil)). Também, os isolados estudados de *Phaeoacremonium* spp. foram alinhados com 32 isolados de diferentes espécies de *Phaeoacremonium* (*P. minimum* (9 isolados), *P. angustius* (2), *P. aleophilum* (3), *P. tuscanicum* (1), *P. mortoniae* (1), *P. iranianum* (4), *P. roseum* (1), *P. austroafricanum* (1), *P. hungaricum* (1), *P. chlamydosporum* (3), *P. pseudopanaci* (1), *P. novae-zealandiae* (1) e *Phaeoacremonium* spp. (2), incluindo dois isolados de *Togninia minima*, teleomorfo de *Phaeoacremonium aleophilum*) provenientes de diferentes regiões vitícolas (Espanha, Canadá, Estados Unidos, China, Grécia, África do Sul, Austrália, Irã, Itália, Japão, Nova Zelândia, Hungria e São Paulo (Brasil)).

A Figura 12 apresenta a árvore filogenética construída para a região ITS dos isolados estudados de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp., para a qual foi utilizado o método UPGMA, com modelo de distância entre nucleotídeos *p-distance*. O teste de *bootstrap* utilizou 1.500 repetições para testar a confiabilidade da filogenia, e deleção parcial de 80%. As figuras 13 e 14 mostram as árvores filogenéticas geradas para a região ITS dos isolados de *P. chlamydospora* e de *Phaeoacremonium* spp., respectivamente, com isolados de diferentes locais de origem, respectivamente. Foram construídas pelo método UPGMA (Pch) e NJ (Pm.) com as mesmas configurações.

A análise da árvore filogenética da região ITS apenas com os isolados estudados (Figura 12) mostra que os três isolados de *Phaeoacremonium* spp. foram distintos das sequências de *P. chlamydospora* em um clado suportado por *bootstrap* de 100. As sequências dos isolados de *Phaeoacremonium* spp. não apresentaram diferença entre si. A árvore filogenética da região ITS com as sequências de *P. chlamydospora* obtidas neste trabalho e com sequências deste microrganismo de outras regiões vitícolas do mundo (Figura 13), apresenta a formação de três grupos distintos: IBVD04 de São Paulo; TD541 de Monte Belo; TD624 de Bento Gonçalves.

Outro grupo se apresenta com o restante dos isolados, mas sustentando com *bootstrap* muito baixo. A árvore filogenética da região ITS gerada com as sequências de *Phaeoacremonium* spp. obtidas neste trabalho e sequências de outras regiões do mundo (Figura 14), apresenta a formação de três grupos: um primeiro grupo, onde os três isolados desse estudo se encaixaram, desdobrado de um

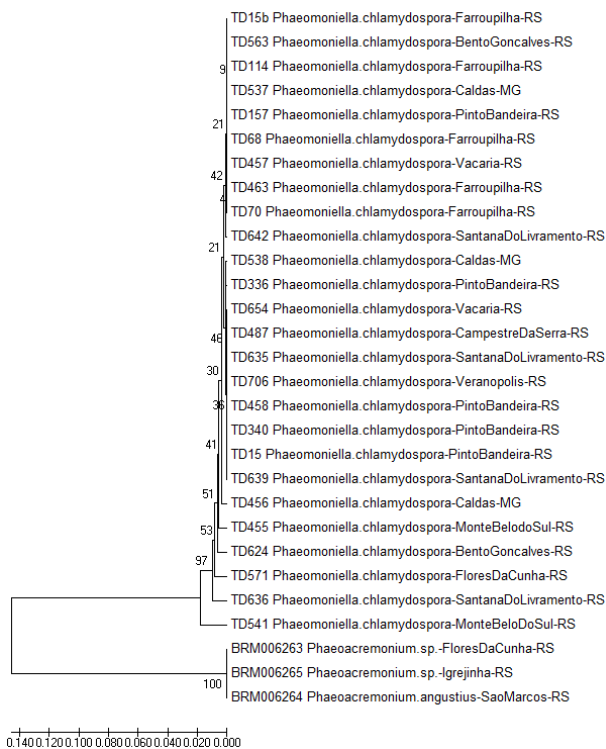


Figura 12. Árvore filogenética baseada nas sequências da região ITS 1/2. A análise envolveu 29 sequências de nucleotídeos dos isolados estudados. A história evolutiva foi inferida pelo método UPGMA, baseada no modelo p-distance. O teste de bootstrap utilizou 1500 replicações. As distâncias evolutivas estão no número de diferenças de bases por sítio. Todas as posições com menos de 80% de cobertura foram eliminadas, sendo permitidos 20% de alinhamento de gaps, dados faltantes ou bases ambíguas em qualquer posição. Os valores de bootstrap indicados nos desdobramentos estão em porcentagem. O conjunto de dados final contou com 523 posições.

segundo grupo em um clado. Desse clado se desdobrou um terceiro grupo (Figura 14). Os resultados obtidos nas três árvores filogenéticas parecem mostrar que o local de origem dos isolados não é fator determinante para as diferenças apresentadas. No entanto, nada se pode concluir com sequências de baixo polimorfismo.

Para a região da β -tubulina foram alinhadas 20 sequências dos isolados de *P. chlamydospora* e três sequências dos isolados de *Phaeoacremonium* spp. obtidas neste trabalho. Adicionalmente os isolados de *P. chlamydospora* foram alinhados com 19 isolados da mesma espécie provenientes de outras regiões vitícolas do mundo (Canadá, Espanha, África do Sul, Chile, Irã, Turquia e São Paulo (Brasil)). Igualmente, os isolados de *Phaeoacremonium* spp. foram alinhados com 21 isolados de diferentes espécies de *Phaeoacremonium* [*Phaeoacremonium*

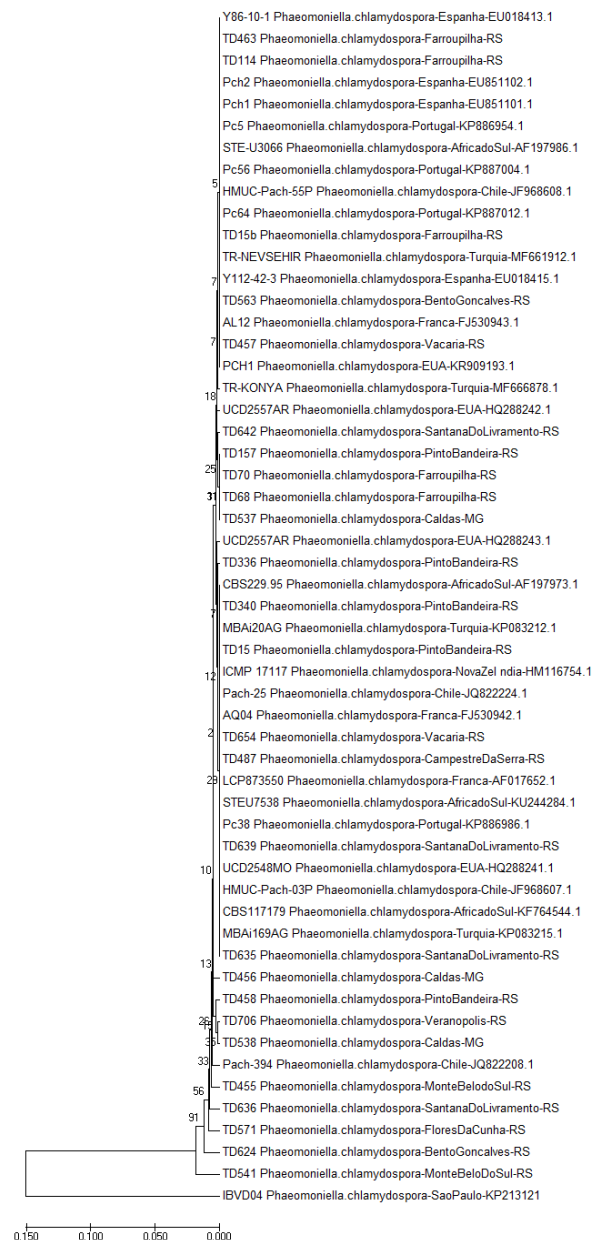


Figura 13. Árvore filogenética baseada nas sequências da região ITS 1/2 dos isolados de *P. chlamydospora* comparados com outras sequências encontradas no GenBank (do NCBI). A análise envolveu 55 sequências de nucleotídeos. Foi utilizado método UPGMA, baseado no modelo p-distance para inferir a história evolutiva dos isolados. O teste de bootstrap utilizou 1.500 replicações. As distâncias evolutivas estão nos números de diferenças de bases por sítio (barra). Todas as posições com menos de 80% de cobertura foram eliminadas, sendo permitidos 20% de alinhamento de gaps, dados faltantes ou bases ambíguas em qualquer posição. Os valores de bootstrap indicados nos desdobramentos estão em porcentagem. O conjunto de dados final contou com 499 posições.

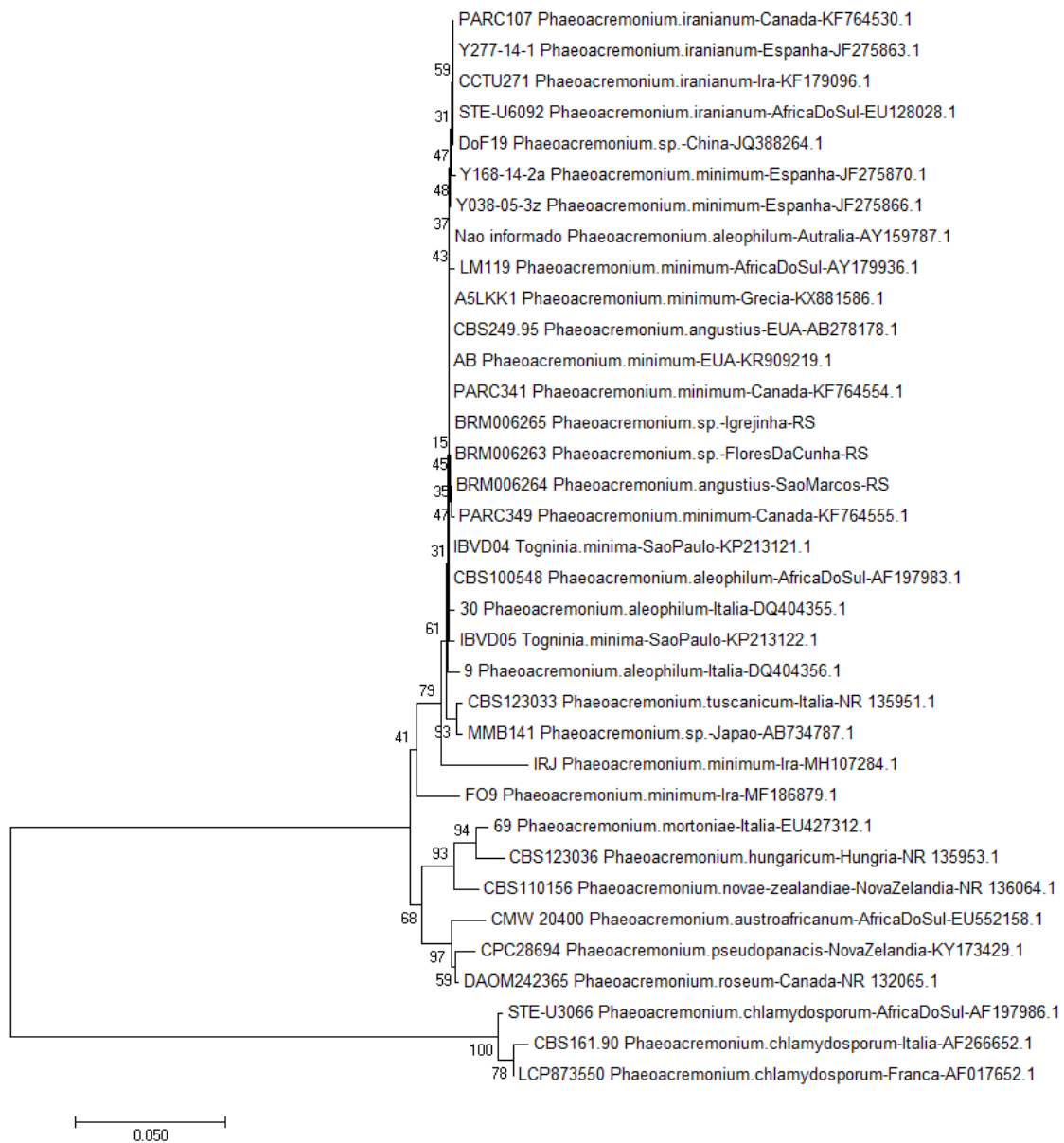


Figura 14. Árvore filogenética baseada nas sequências da região ITS 1/2 dos isolados de *Phaeoacremonium* spp. comparados com outras sequências encontradas no GenBank (do NCBI). A análise envolveu 35 sequências de nucleotídeos. A história evolutiva foi inferida pelo método *Neighbor-Joining*, baseada no modelo *p-distance*. O teste de *bootstrap* utilizou 1.500 replicações. As distâncias evolutivas são dispostas nos números de diferenças de bases por sítio. Todas as posições com menos de 80% de cobertura foram eliminadas, sendo permitidos 20% de alinhamento de *gaps*, dados faltantes ou bases ambíguas em qualquer posição. Os valores de *bootstrap* são apresentados em porcentagem. O conjunto de dados final contou com 536 posições.

minimum (15 isolados), *Phaeoacremonium iranianum* (3), *Phaeoacremonium aleophilum* (1), incluindo dois isolados de *Togninia minima*, teleomorfo de *Phaeoacremonium aleophilum*] de diversos locais do mundo. Acessos Genbank estão nas figuras que apresentam os estudos filogenéticos.

A árvore filogenética construída para a região BTUB dos isolados de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. abordados está apresentada na Figura 15. As figuras 16 e 17 mostram as árvores

filogenéticas geradas para a região BTUB dos isolados de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. com sequências de diferentes locais.

As árvores da região β -tubulina mostraram que essa região é mais informativa que a região ITS, por ser capaz de distinguir grupos entre os isolados de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. que não puderam ser diferenciados com o uso da região ITS (Figura 12). A árvore gerada com as sequências dos isolados trabalhados (Figura 15)

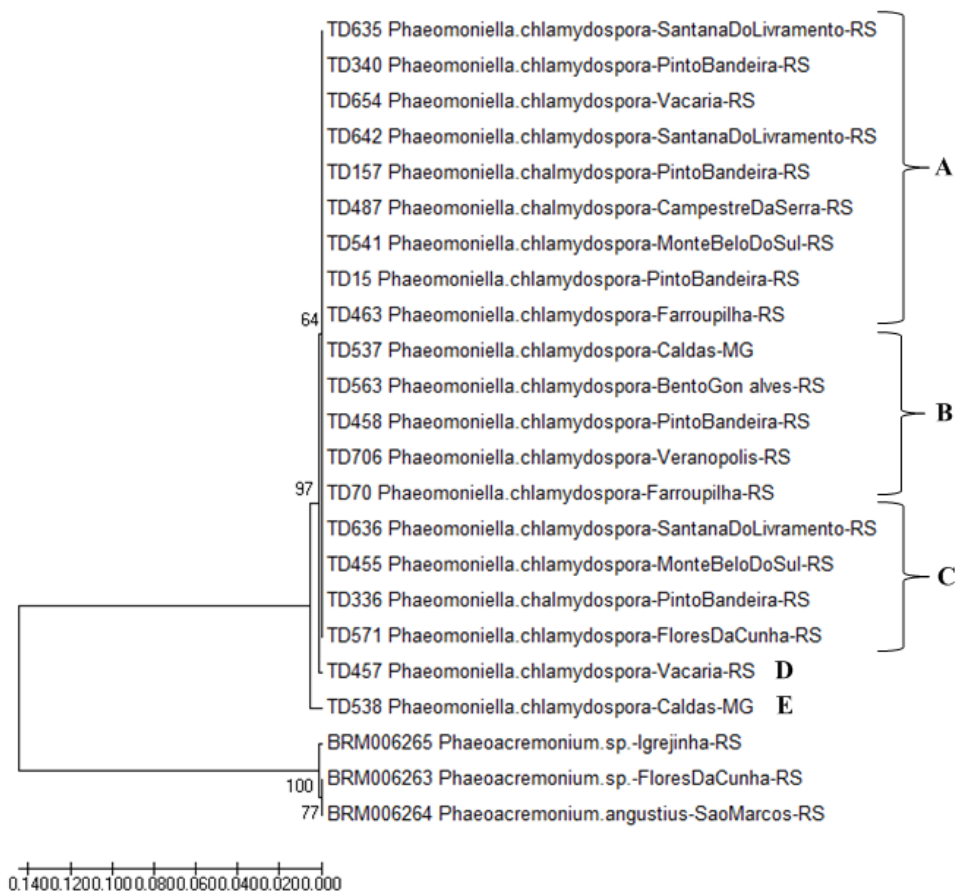


Figura 15. Árvore filogenética com base nas sequências da região β -tubulina. A análise envolveu 23 sequências de nucleotídeos dos isolados do estudo. A história evolutiva foi inferida pelo método UPGMA, baseada no modelo p -distance. Foram utilizadas 1.500 repetições de *bootstrap*. Os comprimentos dos ramos foram medidos pelo número de substituições de nucleotídeos por sítio. Todas as posições com menos de 80% de cobertura foram eliminadas, sendo permitidos 20% de alinhamento de *gaps*, dados faltantes ou bases ambíguas em qualquer posição. Os valores de *bootstrap* estão dispostos em porcentagem. O conjunto de dados contou com 604 posições. Com os desdobramentos foram formados 5 grupos (A-E)..

apresenta a formação de cinco grupos entre os isolados de *P. chlamydospora*: grupo A; grupo B (TD537; TD563; TD458; TD706; TD70), grupo C (TD636; TD455; TD336; TD571); grupo D (TD457) e grupo E (TD538). Entre os isolados de *Phaeoacremonium* spp. foi possível a diferenciação do isolado BRM006265, identificado com *Phaeoacremonium* spp., em um clado.

A árvore da região (BTUB) gerada com as sequências de *P. chlamydospora* estudadas e sequências do mesmo microrganismo de outros locais vitícolas (Figura 16) apresenta a formação de seis grupos, sendo cinco deles com um isolado cada: IBV01, de São Paulo; MBA157AG e MBA13AG, da Turquia; Pach-230 e Pach-525, do Chile, e um último grupo no qual os demais isolados de *P. chlamydospora* deste estudo foram agrupados. Novamente, é

perceptível a similaridade entre os isolados do Rio Grande do Sul e os demais isolados do mundo.

Para as sequências da região BTUB dos isolados de *Phaeoacremonium* spp. estudados e de outros locais vitícolas do mundo, a árvore filogenética gerada (Figura 17) apresentou a formação de quatro grupos: grupo A, no qual os três isolados do trabalho estão agrupados e grande parte das sequências são de *Phaeoacremonium minimum* provenientes de diferentes continentes; grupo B, isolados de São Paulo (Brasil); grupo C, com isolados de *Phaeoacremonium iraniana* e grupo D, com os isolados da Turquia.

Para região do Fator de Elongação, com a utilização do par de iniciadores EF1-728F/EF1-1567R, foi possível alinhar 19 sequências dos isolados de *P. chlamydospora* e três sequências dos isolados de

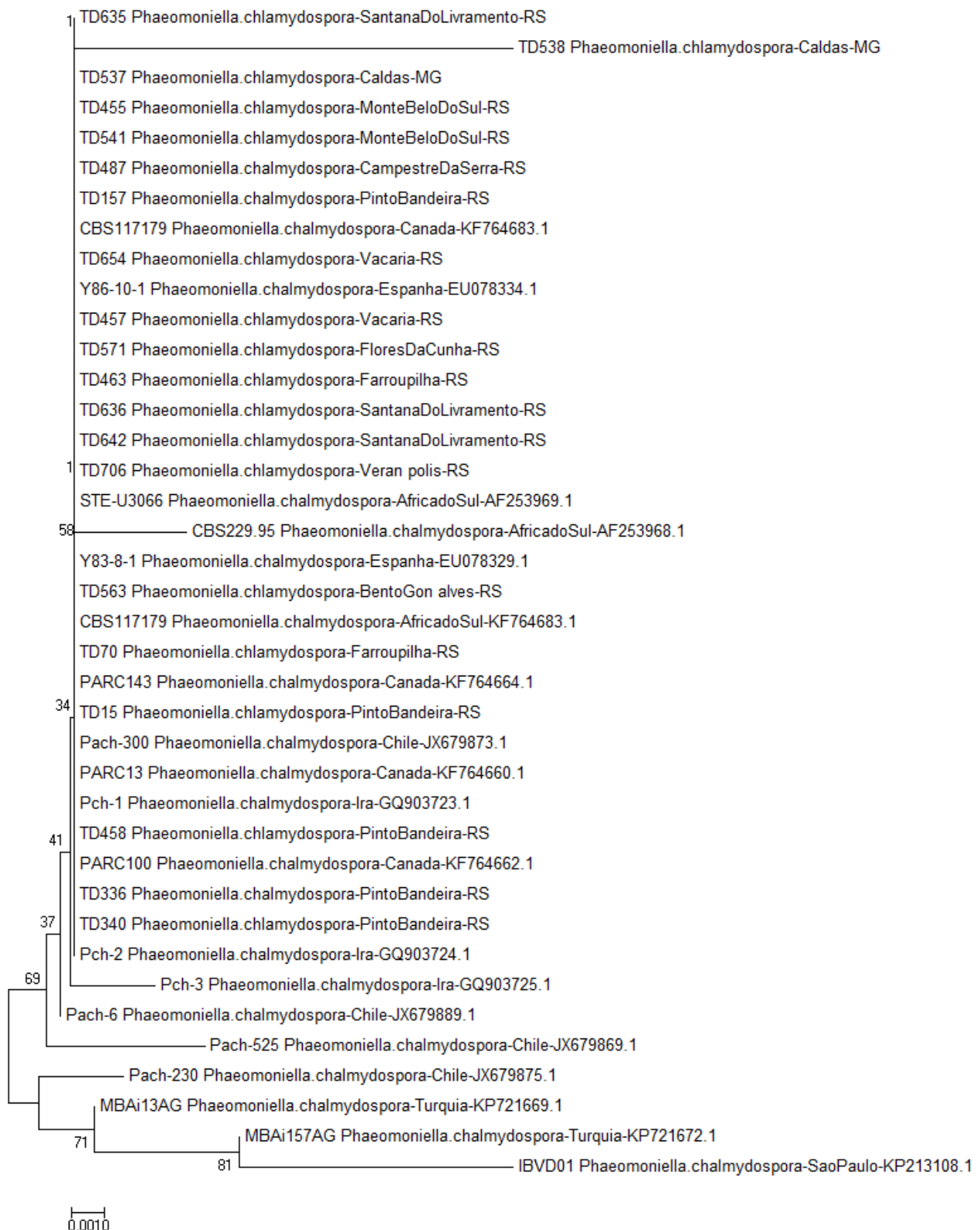


Figura 16. Árvore filogenética baseada nas sequências da região β -tubulina dos isolados de *P. chlamydospora* do estudo comparados com outras sequências encontradas no GenBank. A história evolutiva foi inferida pelo método *Neighbor-Joining*, baseada no modelo *p-distance*. O teste de *bootstrap* utilizou 1.500 repetições. As distâncias evolutivas estão no número de diferenças de bases por sítio. Todas as posições com menos de 80% de cobertura foram eliminadas, sendo permitidos 20% de alinhamento de *gaps*, dados faltantes ou bases ambíguas em qualquer posição. Os valores de *bootstrap* indicados nos desdobramentos estão em porcentagem. O conjunto de dados final contou com 374 posições.

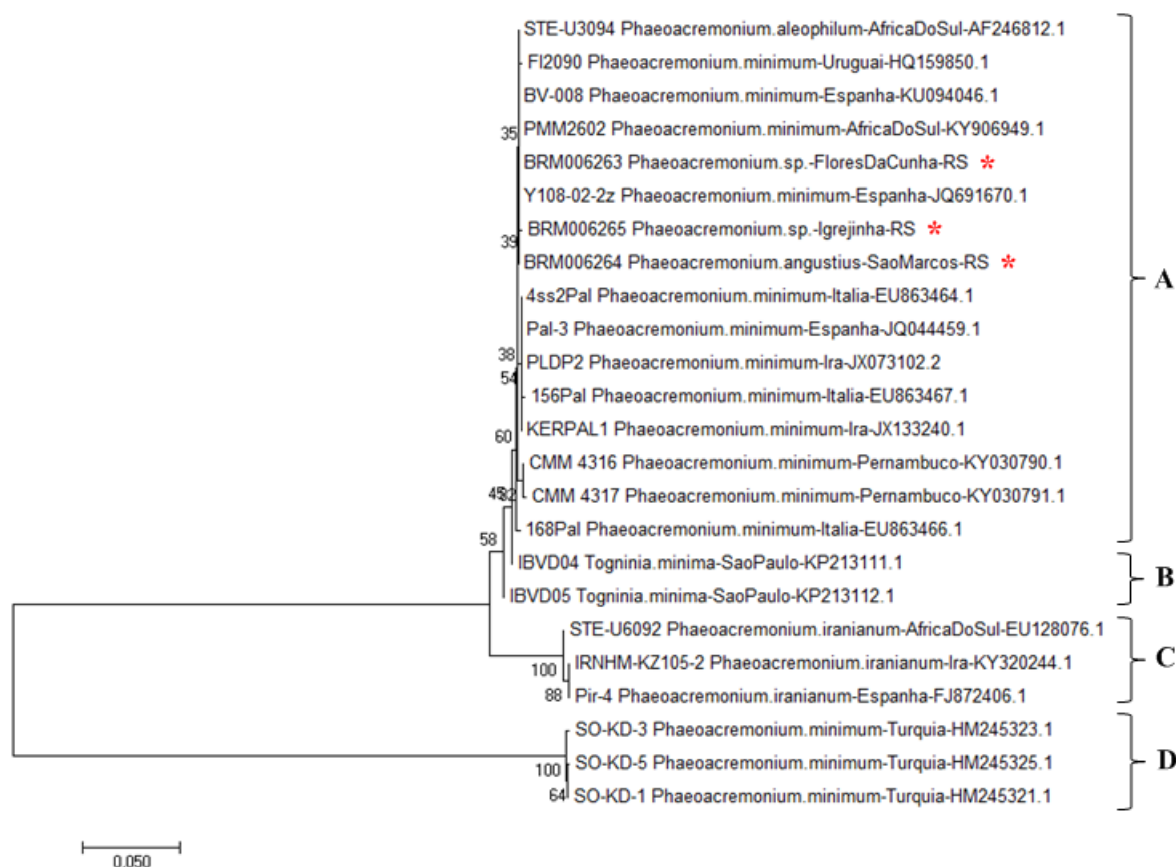


Figura 17. Árvore filogenética baseada nas sequências da região β -tubulina dos isolados de *Phaeoacremonium* spp. estudados, comparados com outras sequências encontradas no GenBank. A história evolutiva foi inferida pelo método *Neighbor-Joining* baseada no modelo *p-distance*. O teste de *bootstrap* utilizou 1.500 repetições. As distâncias evolutivas no número de diferenças de bases por sítio. Todas as posições com menos de 80% de cobertura foram eliminadas, sendo permitidos 20% de alinhamento de *gaps*, dados faltantes ou bases ambíguas em qualquer posição. Os valores de *bootstrap* indicados nos desdobramentos estão em porcentagem. O conjunto de dados final contou com 588 posições. Com os desdobramentos foram formados quatro grupos (A-D). Asteriscos indicam linhagens estudadas.

Phaeoacremonium spp. (Figura 18). Adicionalmente, 16 isolados de *P. chlamydospora* amplificados com os iniciadores EF1-728F/EF1-986R, foram alinhados com 10 sequências de isolados da mesma espécie provenientes de outras regiões vitícolas (Canadá, Espanha, Turquia e São Paulo (Brasil)) (Figura 19). A análise da árvore filogenética realizada com a região do Fator de Elongação dos isolados trabalhados (Figura 18) exibe a diferença entre os três isolados de *Phaeoacremonium* spp. e as sequências de *P. chlamydospora*, em um clado suportado por *bootstrap* de 100. Todos os isolados de *P. chlamydospora* foram agrupados em um único grupo, confirmando a similaridade entre as sequências. No entanto, os isolados de *Phaeoacremonium* spp. apresentaram diferença. O isolado BRM006263

mostrou-se distinto dos demais isolados, o que confirma o polimorfismo encontrado com a análise de RFLP para essa região utilizando a enzima *CfoI*.

O estudo filogenético realizado com as sequências dos isolados de *P. chlamydospora* trabalhados e com as sequências de isolados de outras regiões vitícolas (Figura 19) apresenta a formação de quatro grupos: grupo A, onde todos os isolados de *P. chlamydospora* foram agrupados; grupo B, com isolados da Espanha, São Paulo (Brasil) e Canadá; grupo C, com dois isolados da Turquia e grupo D, com os demais isolados provenientes da Turquia. Tal resultado mostra a similaridade entre as sequências de *P. chlamydospora* do Rio Grande do Sul e a distinção entre estas e as sequências provenientes de outros locais vitícolas. Com isso, percebe-se que

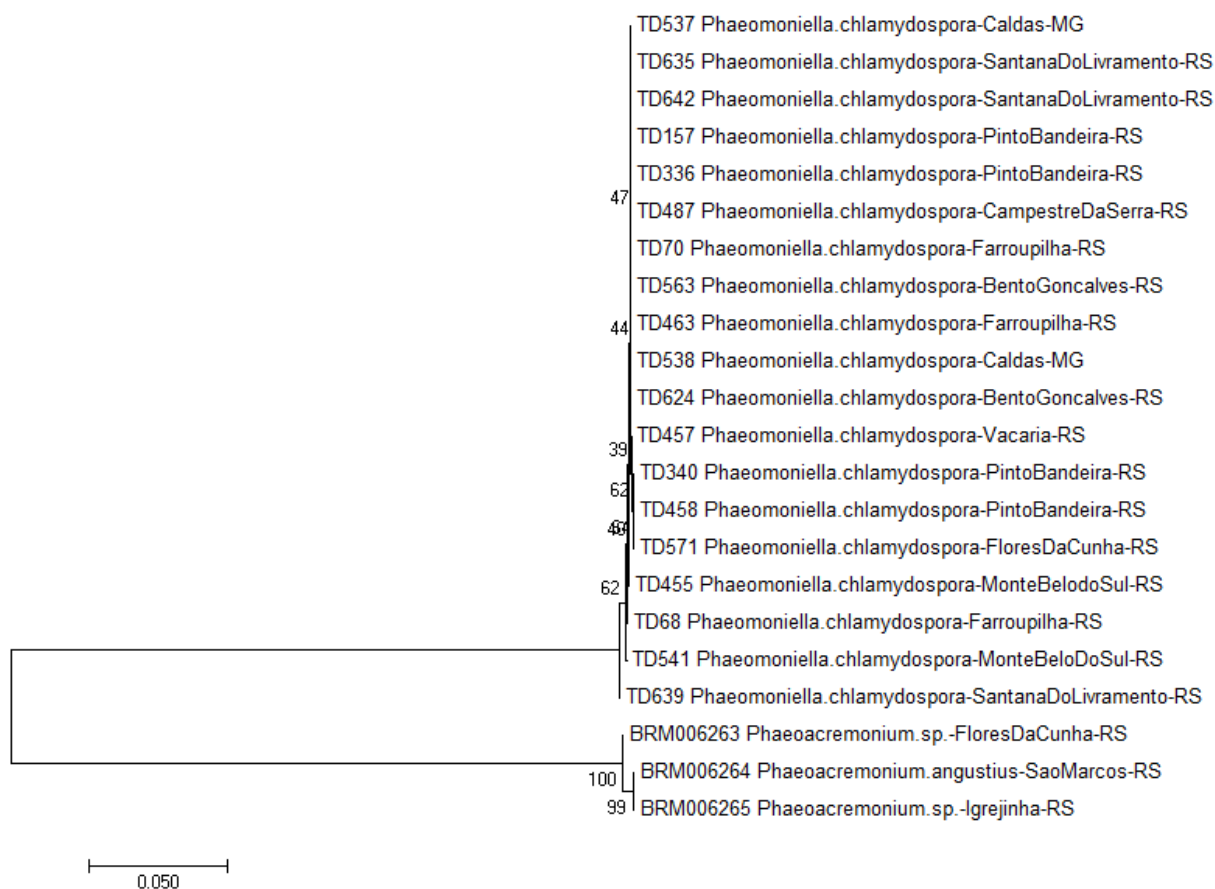


Figura 18. Árvore filogenética baseadas nas sequências da região do EF-1 α . A análise envolveu 22 sequências de nucleotídeos. A história evolutiva foi inferida pelo método *Neighbor-Joining*, baseada no modelo *p-distance*. O teste de *bootstrap* utilizou 1.500 replicações. As distâncias evolutivas são o número de diferenças de bases por sítio (barra). Todas as posições com menos de 80% de cobertura foram eliminadas, sendo permitidos 20% de alinhamento de *gaps*, dados faltantes ou bases ambíguas em qualquer posição. Os valores de *bootstrap* são apresentados em porcentagem. O conjunto de dados final contou com 636 posições.

a região do Fator de Elongação é a mais informativa das três regiões estudadas.

Além das árvores geradas para cada região estudada, uma árvore filogenética foi gerada com as sequências das três regiões (ITS, BTUB e EF-1 α) concatenadas (Figura 20). O método utilizado foi Máxima Parcimônia (MP), com algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR). O teste de confiabilidade da filogenia foi baseado em *bootstrap* com deleção parcial de *gaps* em 80%, replicadas 900 vezes. Foram selecionados para esta análise os isolados que continham as três regiões sequenciadas, no total, dezesseis sequências de *P. chlamydospora* e as três sequências de *Phaeoacremonium spp.*

A análise da árvore filogenética com os dados concatenados (Figura 20) exibiu a diferença entre os isolados de *P. chlamydospora* e as sequências de *Phaeoacremonium spp.* em um clado suportado por *bootstrap* de 100. Também exibiu a formação de

dois grupos entre os isolados de *P. chlamydospora*: grupo A e grupo B, este último composto pelos isolados TD 538, proveniente de Caldas, MG e TD457, de Vacaria, RS. Entre as sequências de *Phaeoacremonium spp.*, o isolado BRM006265 se diferenciou dos demais isolados, confirmando o resultado igualmente encontrado no estudo filogenético da região BTUB.

Otimização da PCR para detecção específica de espécies fúngicas

De acordo com Langrell (2002), a região ITS pode trazer informações de similaridade intraespecífica e dificultar a diferenciação de fungos estreitamente relacionados que compartilhem um mesmo hospedeiro. No entanto, a região ITS do DNA ribossômico inclui ITS1, 5.8S e ITS2. Dentro dela, a 5.8S é geralmente mais conservada enquanto as regiões ITS1 e ITS2 são altamente variáveis. As variações

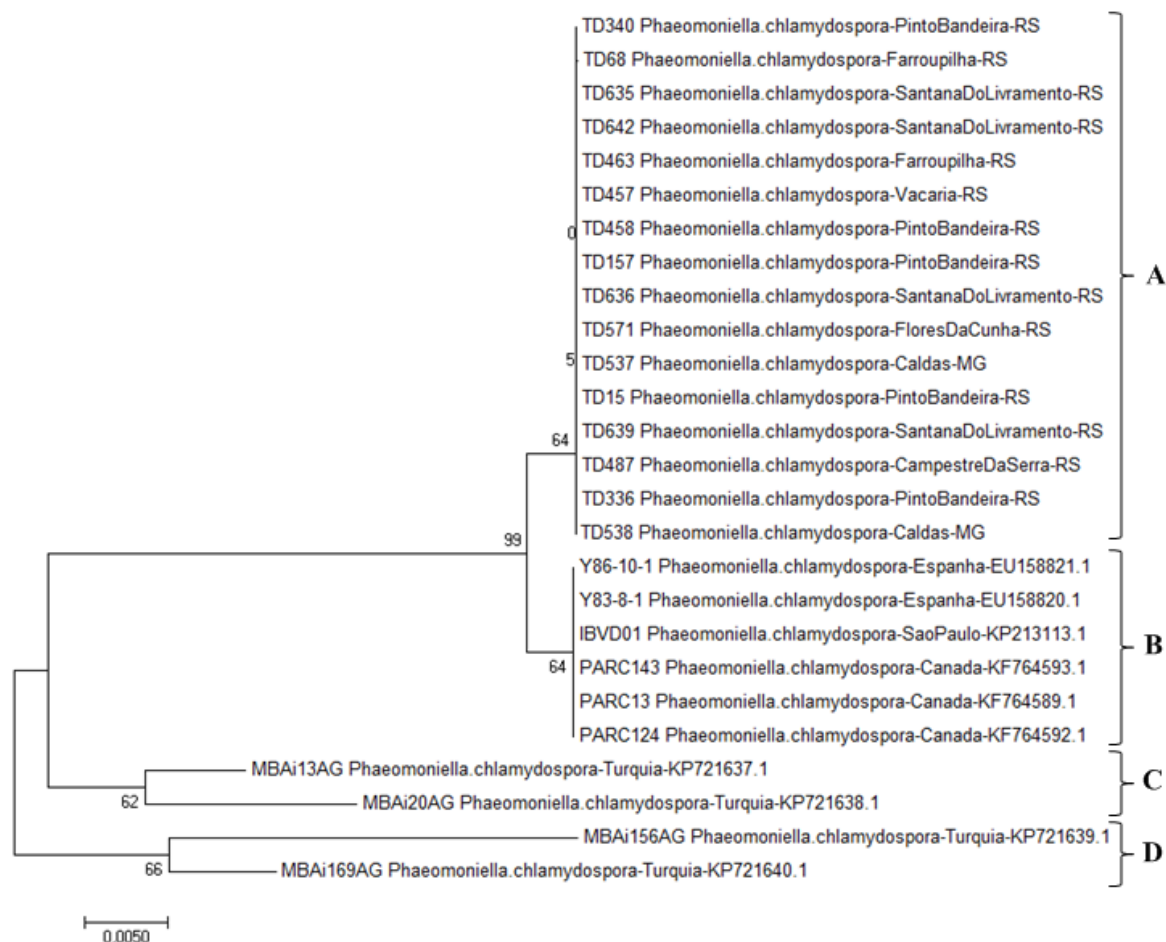


Figura 19. Árvore filogenética baseada nas sequências da região do EF-1α dos isolados de *P. chlamydospora* comparados com outras sequências encontradas no GenBank. Foi utilizado o método *Neighbor-Joining*, baseada no modelo *p-distance*, para inferir a história evolutiva. O teste de *bootstrap* utilizou 1.500 replicações. As distâncias evolutivas são dispostas nas unidades do número de diferenças de bases por sítio. Todas as posições com menos de 80% de cobertura foram eliminadas, sendo permitidos 20% de alinhamento de *gaps*, dados faltantes ou bases ambíguas em qualquer posição. Os valores de bootstrap são apresentados em porcentagem. O conjunto de dados final contou com 157 posições. Com os desdobramentos foram formados 4 grupos (A-D).

encontradas na ITS1/2 podem permitir o desenho de iniciadores para diferenciação entre espécies (Schoch et al., 2012). A especificidade dos iniciadores publicados para *P. chlamydospora* foi avaliada com DNA micelial dos isolados de referência. Os iniciadores utilizados foram: Pch1/Pch2 (Tegli et al., 2000) e Pmo1/Pmo2 (Overton et al., 2004), ambos desenhados a partir da região ITS1/2.

Inicialmente, para os iniciadores Pch1/2, considerou-se a temperatura de pareamento de 56 °C para Pch1 e 57,3 °C para Pch2, baseado na informação de Tm dos iniciadores fornecida pela empresa da síntese. Para definição das temperaturas de pareamento utilizou-se *software* para estimar a temperatura de pareamento, que forneceu as temperaturas de

52,1 °C e 53,2 °C para Pch1 e Pch2, respectivamente. Após os ajustes, a temperatura de pareamento que apresentou resultados satisfatórios foi de 55,8 °C, amplificando o fragmento de aproximadamente 300–400 pb (Figura 21).

Para os iniciadores Pmo1/2 as temperaturas de pareamento foram baseadas na Tm dos iniciadores fornecidas pela empresa de síntese, sendo 60,7 °C e 63,4 °C para Pmo1 e Pmo2, respectivamente. Já, pela ferramenta de bioinformática, as temperaturas de pareamento indicadas foram de 56,7 °C para Pmo1 e 59,5 °C para Pmo2. Após ajustes na PCR, constatou-se que a temperatura ótima de pareamento foi a de 68 °C, resultando na amplificação de fragmentos entre 300–400 pb (Tabela 4).

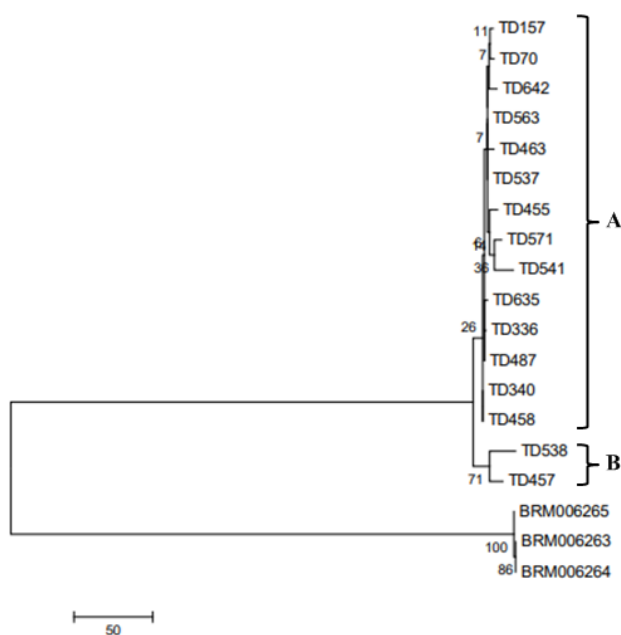


Figura 20. Árvore filogenética baseada nos dados concatenados de sequências das regiões ITS, β -tubulina e EF-1 α . A análise envolveu 19 sequências de nucleotídeos. Foi utilizado o método Máxima Parcimônia. O teste de *bootstrap* utilizou 900 repetições. A árvore MP foi obtida usando o algoritmo de *Subtree-Pruning-Regrafting* (SPR). As distâncias evolutivas referem-se ao número de diferenças de bases por sítio (barra). A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos de ramificação calculados usando o método de caminho médio e estão nas unidades do número de alterações em toda a sequência. Todas as posições com menos de 80% de cobertura foram eliminadas. Considerou-se 1.757 posições no conjunto de dados final. Com os desdobramentos foram formados 2 grupos (A-B).

Para as reações com os dois iniciadores específicos foram utilizados dois isolados de referência de *P. chlamydospora* (TD15 e TD157) e três isolados de referência de outras espécies de fungos, sendo um isolado de *Phaeoacremonium* spp. (BRM006263), um de *Ilyonectria liriodendri* (TD1117) e um de *Neofusicoccum parvum* (TD476) empregados como controles negativos.

As amplificações de isolados de referência de *P. chlamydospora* (bandas entre 300–400 pb) e a ausência de amplificação nos controles negativos (*Phaeoacremonium minimum*, *Ilyonectria liriodendri* e *Neofusicoccum parvum*) (Figura 21) confirmaram a utilidade dos iniciadores específicos para a detecção de *P. chlamydospora*. Esses iniciadores podem ser utilizados para outras análises, como por exemplo, PCR multiplex, que possibilita detectar várias sequências do DNA alvo em uma única reação, qPCR, bem como a aplicação desses iniciadores

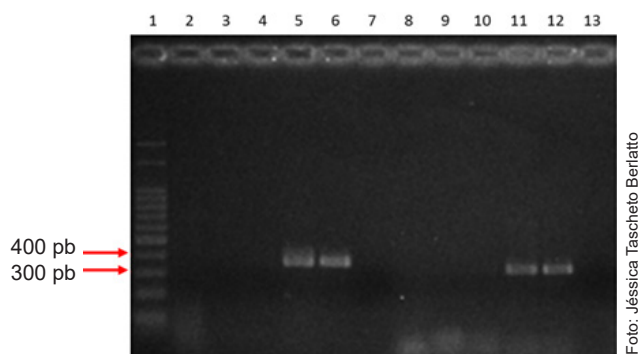


Figura 21. Gel de agarose apresentando a amplificação de isolados de *P. chlamydospora* com iniciadores espécie-específicos. Ordem no gel: Marcador de peso molecular 100 pb (1); BRM006263 (Pm.), TD1117 (Ilyo.), TD476 (Npar), TD157 (Pch), TD15 (Pch), respectivamente, com os iniciadores Pch1/Pch2 (2, 3, 4, 5 e 6); Controle negativo (7); BRM006263 (Pm.), TD1117 (Ilyo.), TD476 (Npar), TD157 (Pch), TD15 (Pch), respectivamente, com os iniciadores Pmo1/Pmo2 (8, 9, 10, 11 e 12); Controle negativo (13).

espécie-específicos com DNA total extraído de tecido cortical (lenho) da videira. Abordagens de PCR qualitativo funcionariam como ferramentas de checagem da etiologia da podridão do tronco (Stein et al., 2016).

Conclusões

- 1) Este estudo apresentou informações sobre detecção molecular de *P. chlamydospora*, e aspectos filogenéticos dos isolados de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. encontrados no Rio Grande do Sul. Tais informações formam um ponto de partida para estratégias de detecção molecular de patógenos do tronco da videira e outros estudos de diversidade genética.
- 2) O trabalho também revelou informações sobre a digestão dos produtos de PCR das regiões estudadas do DNA genômico e ribossomal de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. Perfis de fragmentação, mesmo que inconclusivos, podem servir como referências de marcação de espécies de fungos, e podem ser utilizados na identificação dos microrganismos, quando estes estejam presentes em tecidos da planta contaminada.
- 3) Os estudos filogenéticos realizados com as sequências da região ITS1/2 de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. provenientes da região sul do Brasil mostraram alta similaridade intraespecífica com isolados provenientes de outras regiões vitivinícolas. No entanto, os estudos filogenéticos obtidos com as sequências das regiões β -tubulina e EF-1 α demonstraram haver variações intra e interespecíficas para diferenciação de linhagens de *P. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. do Rio Grande do Sul e de outros isolados de diferentes locais do mundo. No entanto, essas divergências precisam ser confirmadas por estudos de diversidade genética.
- 4) O estudo com iniciadores espécie-específicos Pmo1/2 e Pch1/2 proporcionou amplificação específica do DNA micelial de *P. chlamydospora*. Como perspectiva, uma aplicação prática destes resultados seria, em pesquisa subsequente, a adaptação do método para obtenção de produtos de PCR marcadores do fungo no DNA total extraído de tecido cortical da videira. Essa abordagem estabeleceria uma ferramenta de checagem/detecção molecular do fitopatógeno, acessível e de relativo baixo custo.

Referências

- AIGOUN-MOUHOUS, W.; MAHAMED, A. E.; LEÓN, M.; CHAOUIA, C.; ZITOUNI, A.; BARANKOVA, K.; EICHMEIER, A.; ARMENGOL, J.; GRAMAJE, D.; TEBAL, A.B. *Cadophora sabaouae* sp. nov. and *Phaeoacremonium* species associated with Petri Disease on grapevine propagation material and Young grapevines in Algeria. **Plant Disease**, v. 105, n. 11, p. 3657-3668, Nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-20-2380-RE>.
- ALMANÇA, M. A. K.; ABREU, C. M. de; SCOPEL, F. B.; BENEDETTI, M.; HALLEEN, F.; CAVALCANTI, F. R. **Evidências morfológicas da ocorrência de *Phaeoacremonium chlamydospora* em videiras no estado do Rio Grande do Sul**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado técnico, 134). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/856487>. Acesso em: 7 ago. 2023.
- AROCHA, A.; RAPOSO, R. PCR-Based strategy to detect and identify species of *Phaeoacremonium* causing grapevine diseases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 9, p. 2911-2918, May 2007. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02176-06>.
- BERLATTO, J. T.; ALMANÇA, M. A. K.; LOESER, B. G.; TORMENTE, F. V.; CAVALCANTI, F. R. Phylogenetic characterization of grapevine trunk pathogens isolated from vineyards in southern Brazil. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 56, n. 3, p. 513-588, 2017. DOI: https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-21865.
- BRIOSO, P. S. T.; POZZER, L.; MONTANO, H. G.; PIMENTEL, J. P. Uso atual e futuro da biologia molecular na fitopatologia: aplicação em fitopatógenos e vetores. Parte 1. **RAPP**, v. 9, p. 79-118, 2001.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553-556, June 1999. DOI: <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>.
- CAVALCANTI, F. R.; BUENO, C. J.; ALMANÇA, M. A. K. **Declínio e morte de plantas de videira**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2013. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 82). 44p. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/859270>. Acesso em: 7 ago. 2023.
- CAVALCANTI, F. R. Manejo fitossanitário: manejo de doenças da videira na Campanha Gaúcha. In: SILVEIRA, S. V.; PROTAS, J. F da S. **Vinhos finos da região da Campanha gaúcha: tecnologias para a vitivinicultura e para a estruturação de indicação geográfica**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2021, p. 117-134. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 130). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1139750>. Acesso em: 7 ago. 2023.

- COBOS, R.; MARTÍN, M. T. Molecular characterisation of *Phaeoconiella chlamydospora* isolated from grapevines in Castilla y León (Spain). **Phytopathologia Mediterranea**, v. 47, n. 1, p. 2027, April 2008. DOI: <https://www.jstor.org/stable/26463294>.
- DUPONT, J.; LALOU, W.; SANDRINE, M.; LARIGNON, P.; ROQUEBERT, M-F. *Phaeoacremonium viticola*, a new species associated with Esca disease of grapevine in France. **Mycologia**, v. 92, n. 3, p. 499-504, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1080/00275514.2000.12061185>.
- ESSAKHI, S.; MUGNAI, L.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; SURICO, G. Molecular and phenotypic characterisation of novel *Phaeoacremonium* species isolated from esca diseased grapevines. **Persoonia**, v. 21, p. 119-134, dez. 2008.
- ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUERO, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 329-337, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-329>.
- FERREIRA, A. B. M.; LEITE, L. G.; HARAWAKA, R.; PADOVANI, C. R.; BUENO, C. J. Incidência da doença de Petri na videira 'Niágara Rosada' no estado de São Paulo – Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 2, p. 124-132, Apr./June 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2154>.
- GLASS, N. L.; DONALDSON, G. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, April 1995. DOI: 0.1128/aem.61.4.1323-1330.1995.
- GROENEWALD, M.; KANG, J.-C.; CROUS, P. W. ITS and β -tubulin phylogeny of *Phaeoacremonium* and *Phaeoconiella* species. **Mycological Research**, v. 105, n. 6, p. 651-657, jun. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0953756201004282>.
- JACKSON, R. S. **Wine science: principles and applications**. 5th ed. Academic Press, 2020. 1030p.
- JI, T.; ALTIERI, V.; SALOTTI, I.; ROSSI, V. Effects of temperature and moisture duration on spore germination of four fungi that cause grapevine trunk diseases. **Plant Disease**, v. 107, n. 4, p. 1005-1008, April 2023. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-22-1802-SC>.
- KORABECNA, M. The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8S rRNA Gene): its biological meaning and application in medical mycology. In: MENDEZ-VILAS, A. (ed.). **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**.
- KRAUS, C.; DAMM, U.; BIEN, S.; VOEGELE, R. T.; FISCHER, M. New species of *Phaeoconiellales* from a German vineyard and their potential threat to grapevine (*Vitis vinifera*) health. **Fungal Systematics and Evolution**, v. 6, p. 139-155, Dec. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3114/fuse.2020.06.08>.
- LANGRELL, S. R. H. Molecular detection of *Neonectria galligena* (syn. *Nectria galligena*). **Mycological Research**, v. 106, n. 3, p. 280-292, March 2002. DOI: <https://doi.org/10.1017/S095375620200552X>.
- LAWRENCE, D. P.; TRAVADON, R.; NITA, M.; BAUMGARTNER, K. TrunkDiseaseID.org: A molecular database for fast and accurate identification of fungi commonly isolated from grapevine wood. **Crop Protection**, v.102, p. 110-117, Dec. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.08.017>.
- LOBATO, A. C. B.; CAVALCANTI, F. R. **Padrões de restrição de DNA para detecção molecular de *Lasiodiplodia theobromae* em videira e estudos filogenéticos em sequências concatenadas**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, fev. 2021. (Embrapa Uva e Vinho. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 19). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1130397>. Acesso em: 7 ago. 2023.
- O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 103-116, Feb. 1997. DOI: <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>.
- OVERTON, B. E.; STEWART, E. L.; XINSHUN, Q. U.; WENNER, N. G.; CHRIST, B. J. Qualitative real-time PCR SYBR Green detection of Petri disease fungi. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 43, n. 3, p. 403-410, 2004. DOI: https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1770.
- REHNER, S. A.; BUCKLEY, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, v. 97, n. 1, p. 84-98, Jan./Feb. 2005. DOI: <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.1.84>.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDFORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A.; CHEN, W.; FUNGAL BARCODING CONSORTIUM. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.111701810>.
- SOFIA, J.; TROVÃO, J.; PORTUGAL, A.; PAIVA DE CARVALHO, H.; MESQUITA, N.;

NASCIMENTO, T.; REGO, C.; GONÇALVES, M. Molecular and phenotypic characterisation of *Phaeoconiella chlamydospora* isolates from the demarcated wine region of Dão (Portugal). **Phytopathologia Mediterranea**, v. 54, n. 2, p. 403-413, 2015. DOI: https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-16302.

STEIN, D. L.; AGUSTINI, B. C.; ALVES, S. A. M.; CAVALCANTI, F. R. **Adaptação de um método de detecção molecular para agentes do cancro europeu das pomáceas (*Neonectria ditissima*) isolados na região Sul**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2016. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado técnico, 185). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1047035>. Acesso em: 7 ago. 2023.

TEGLI, S.; BERTELLI, E.; SURICO, G.: Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five *Phaeoacremonium* species and development of a PCR based assay for the detection of *P. chlamydospora* and *P. aleophilum* in grapevine tissue. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 39, n. 1, p. 134-149, 2000. DOI: https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1555.

TRONSMO, A. M.; COLLINGE, D. B.; DJURLE, A.; MUNK, L.; YUEN, J.; TRONSMO, A. **Plant Pathology and Plant Diseases**. CABI Digital Library, 2020. 440 p.

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; GUBLER, W. D. Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. **Plant Pathology**, v. 60, n. 2, p. 261-270, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02381.x>.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, J. W. (ed.). **A guide to molecular methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315-322.

YE, Q.; JIA, J.; MANAWASINGHE, I. S.; LI, X.; ZHANG, W.; MUGNAI, L.; WU, X.; HYDE, K. D.; YAN, J. *Fomitiporia punicata* and *Phaeoacremonium minimum* associated with Esca complex of grapevine in China. **Phytopathology Research**, v. 3, n. 11, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s42483-021-00087-w>.