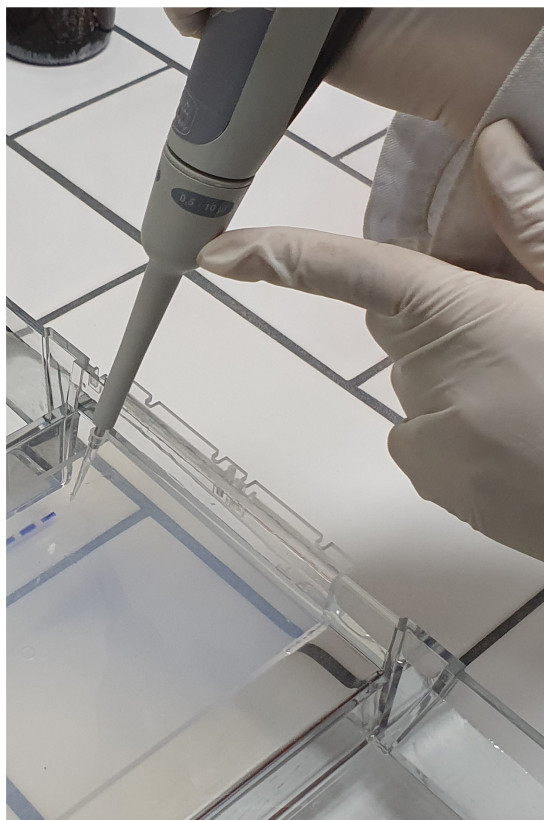
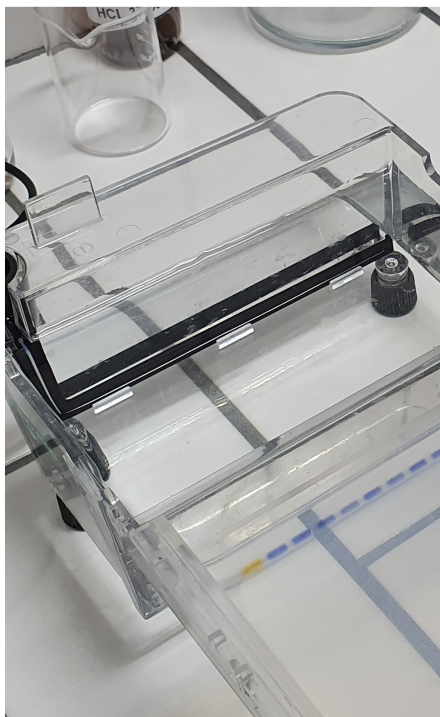


Padrões de restrição de DNA para detecção  
molecular de *Lasiodiplodia theobromae*  
em videira e estudos filogenéticos  
em sequências concatenadas



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Uva e Vinho  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
19**

**Padrões de restrição de DNA para detecção  
molecular de *Lasiodiplodia theobromae*  
em videira e estudos filogenéticos  
em sequências concatenadas**

*Alnilan Cristina Barros Lobato  
Fábio Rossi Cavalcanti*

**Embrapa Uva e Vinho  
Bento Gonçalves, RS  
2021**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Uva e Vinho**  
Rua Livramento, 515 - Caixa Postal 130  
95701-008 Bento Gonçalves, RS  
Fone: (0xx) 54 3455-8000  
Fax: (0xx) 54 3451-2792  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Uva e Vinho

Presidente  
*Adeliano Cargnin*

Secretário-Executivo  
*Edgardo Aquiles Prado Perez*

Membros  
*João Henrique Ribeiro Figueredo, Jorge Tonietto,  
Klecius Ellera Gomes, Luciana Mendonça Prado,  
Nubia Poliana Vargas Gerhardt, Rochelle Martins  
Alvorcem, Viviane Maria Zanella Bello Fialho*

Supervisão editorial  
*Klecius Ellera Gomes*

Revisão de texto  
*Edgardo Aquiles Prado Perez*

Normalização bibliográfica  
*Rochelle Martins Alvorcem CRB10/1810*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Cristiane Turchet / Edgardo Aquiles Prado Perez*

Foto da capa  
*Fábio Ribeiro dos Santos*

**1ª edição**  
Publicação digitalizada (2021)

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
Embrapa Uva e Vinho

---

Padrões de restrição de DNA para detecção molecular de *Lasiodiplodia  
theobromae* em videira e estudos filogenéticos em sequências  
concatenadas / por Alnilan Cristina Barros Lobato, Fábio Rossi Cavalcanti  
- Bento Gonçalves, Embrapa uva e Vinho, 2021.  
25 p. : il. color. -- (Embrapa Uva e Vinho. Boletim de Pesquisa e  
Desenvolvimento online, 19).

ISSN 1981-1004

1. Filogenia. 2. Diversidade genética. 3. Botryosphaeriaceae. 4. Podridão  
descendente. 5. *Vitis Vinifera*. 6. Doença de planta. I. Cavalcanti, Fabio Rossi. II.  
Embrapa Uva e Vinho. III. Série.

CDD 634.82 (21 ed.)

---

© Embrapa, 2021

## Sumário

---

|                              |    |
|------------------------------|----|
| Resumo .....                 | 5  |
| Abstract .....               | 6  |
| Introdução.....              | 7  |
| Material e Métodos .....     | 10 |
| Resultados e Discussão ..... | 15 |
| Conclusões.....              | 23 |
| Referências .....            | 24 |

# Padrões de restrição de DNA para detecção molecular de *Lasiodiplodia theobromae* em videira e estudos filogenéticos em sequências concatenadas

Alnilan Cristina Barros Lobato<sup>1</sup>

Fábio Rossi Cavalcanti<sup>2</sup>

**Resumo** – Uma das podridões de tronco de grande impacto na videira é a chamada “descendente”, sendo causada por espécies de fungos Botryosphaeriaceae (“*Botryosphaeria dieback*”) como o *Lasiodiplodia theobromae*. O presente estudo aborda fragmentação de produtos de PCR para caracterização de *L. theobromae*. As linhagens utilizadas, TD323/2015 (ITS: MT823466, A. Prado/RS), BRM004720 (ITS: MT823467, B. Gonçalves/RS) e BRM004725 (ITS: MT823468, Jales/SP) foram isoladas de tronco sintomático e crescidas para obtenção de biomassa em meio BD líquido, sob agitação. O DNA total foi extraído pelo método CIA, adaptado. Duas estratégias foram usadas: 1) Amplificação, sequenciamento e BLASTn das regiões ITS1/2,  $\beta$ -tubulina e EF-1 $\alpha$ ; 2) Padrões de restrição (CfoI e HaeIII) dos amplicons das regiões por meio de PCR-RFLP (CAPS). Para filogenias de ITS1/2 e  $\beta$ -tubulina, as sequências foram concatenadas (FaBox 1.5), alinhadas com ClustalX e transferidas em .FASTA para árvores filogenéticas em MEGA7. O método Máxima Parcimônia (MP) foi adotado para demonstrar um agrupamento comum aos isolados de Antônio Prado/RS e Jales/SP conjuntamente a isolados da China e EUA. No entanto, uma divergência foi encontrada para a linhagem de Bento Gonçalves/RS, dando um indicativo de diversidade genética entre *L. theobromae* em vinhedos gaúchos, a despeito de sua baixíssima prevalência na região Sul do Brasil. Paralelamente, foram encontrados padrões de restrição específicos após digestão das regiões amplificadas com as enzimas HaeIII e CfoI, capazes de promover a identificação do patógeno.

**Termos para indexação:** Filogenia, diversidade genética, podridão descendente, *Vitis vinifera*.

<sup>1</sup> Alnilan Cristina Barros Lobato, estudante do Departamento de Química Fundamental (IQ-USP), Instituto de Química - Universidade de São Paulo, SP.

<sup>2</sup> Fábio Rossi Cavalcanti, engenheiro agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS.

## Restriction patterns for molecular detection of *Lasiodiplodia theobromae* in grapevine and phylogeny studies on concatenated DNA sequences

**Abstract** – The “Botryosphaeriae dieback” is known as a grapevine trunk disease caused by Botryosphaeriaceae fungi and the *Lasiodiplodia theobromae* appears as one of those species. The present study deals with the fragmentation of PCR products to characterize *L. theobromae*. The strains were TD323/2015 (ITS: MT823466, A. Prado/RS), BRM004720 (ITS: MT823467, B. Gonçalves/RS) and BRM004725 (ITS: MT823468, Jales/SP). They were isolated from the symptomatic trunk and grown for biomass in liquid BD medium under agitation. The total DNA was extracted through an adapted CIA method. Two strategies were used: 1) Amplification, sequencing and BLASTn of the ITS1 / 2,  $\beta$ -tubulin and EF-1 $\alpha$  regions; 2) Restriction patterns (CfoI and HaeIII) of the region’s amplicons by means of PCR-RFLP (CAPS). For phylogenies of ITS1 / 2 and  $\beta$ -tubulin, the sequences were concatenated (FaBox 1.5), aligned with ClustalX and transferred in .FASTA format to obtain phylogenetic trees in MEGA7. The Maximum Parsimony (MP) method was adopted to demonstrate a common grouping of isolates from Antônio Prado/RS and Jales/SP together with isolates from China and the USA. However, a divergence was found for the Bento Gonçalves/RS isolate. This result could indicate a genetic diversity among *L. theobromae* in vineyards from Serra Gaucha, despite the very low prevalence of this pathogen in southern Brazil. In parallel, specific restriction patterns were found after HaeIII and CfoI digestion of the amplicons. Such profiles could fingerprint *L. theobromae* in grapevine trunks.

**Index terms:** Phylogeny, genetic diversity, Botryosphaeriaceae dieback, *Vitis vinifera*.

## Introdução

---

A vitivinicultura representa um importante mercado para a economia do Rio Grande do Sul. O estado é o maior produtor de uvas do Brasil, fornecendo em torno de 60% da produção nacional, com a safra 2020 prevista para atingir entre 550 a 590 mil toneladas (Zanus, 2020). Podridões de tronco de videira são causas significativas do declínio da videira (*Vitis vinifera* L.), pois incidem sobre os tecidos cortical e vascular da planta, causando sua morte a curto ou longo prazo (Cavalcanti et al., 2013). Portanto, as doenças do tronco representam eventos biológicos prejudiciais para a videira, com potencial de causar perdas econômicas importantes para essa cultura (Bertsch et al., 2013).

Atualmente, as **podridões descendentes** vêm sendo consideradas as piores doenças de tronco associadas à cultura, no mundo (Sosnowski & Mundy, 2019). Essas podridões são conhecidas internacionalmente como “*Eutypa dieback*”, quando causadas por *Eutypa lata*, ou “*Botryosphaeria dieback*” ou “*Black Dead Arm*” (BDA), quando causadas por fungos da Família Botryosphaeriaceae. Neste taxon, se aloca ao menos 26 espécies associadas à etiologia da podridão, em diferentes gêneros: *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, dentre outros (Gramaje et al., 2018). Como escopo do presente estudo, nos últimos anos, tem se evidenciado o fungo *Lasiodiplodia theobromae* (telemorfo *Botryosphaeria rhodina*) presente em vinhedos gaúchos, com prevalência ainda em níveis muito reduzidos na região sul do Brasil, mas com crescente identificação em levantamentos recentes (Berlatto et al., 2017). O fungo *Lasiodiplodia theobromae* tem ampla gama de hospedeiros (mais de 650 espécies de planta) e pode ser encontrado principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Correia et al., 2016; Zhang et al., 2019).

A podridão descendente causada por *Lasiodiplodia* frequentemente causa abortamento de rebrotas em ramos laterais do vinhedo afetado, promovendo paulatina morte descendente do lenho, a partir de necrose no tecido cortical e nas gemas (Gramaje et al., 2018). Em determinados fungos da família Botryosphaeriaceae, corpos de frutificação (picnídios) podem se desenvolver no lenho necrosado com o que é considerado o principal sintoma longitudinal de podridões descendentes de videiras: o cancro em formato de cunha

(Úrbez-Torres et al., 2008; Berlatto et al., 2017). Em geral, sintomas agudos aparecem no campo apenas um ou dois anos após o início da infecção, frequentemente observados em vinhedos maduros, acima de 8 anos após implantação (Gramaje et al., 2018). Em geral, fungos Botryosphaeriaceae liberam seus esporos durante a chuva, sendo assim transportados ao tecido vegetal recém-podado e frágil, e o infectando (Burruano et al., 2008; Díaz & Latorre, 2013).

Quando comparado a outros fungos fitopatogênicos pertencentes à mesma família, o *L. theobromae* tem uma temperatura ótima de crescimento levemente maior e progride mais rapidamente no tecido vegetal no processo de parasitismo (Felix et al., 2019). Em testes de patogenicidade, foi comprovado que *L. theobromae* produz lesões maiores, sendo considerado, portanto, mais patogênico (Úrbez-Torres et al., 2008). Aliás, levando-se em consideração todos os tipos de podridões – não apenas as descendentes –, mais de 130 espécies de fungos pertencentes a 34 gêneros já foram associados às **doenças de tronco da videira** (Grapevine Trunk Diseases, GTD) no mundo todo. No entanto, permanecem relatos de devida falta de comprovação dos postulados de Koch, ou seja, a relação etiológica da doença (Gramaje et al., 2018). Podridões como o **pé preto**, **doença de Petri** e **Esca** são doenças associadas ao declínio e morte de plantas de videira: um problema que cresceu muito em vinhedos e parreirais do mundo, inclusive no Rio Grande do Sul a partir dos anos 90 do século passado. Tais doenças são causadas respectivamente por espécies de *Cylindrocarpon* e *Ilyonectria* (**pé preto**), por associações de fungos *Phaeoacremonium* spp. e *Phaeoconiella chlamydospora* (**doença de Petri**) e pela associação desses dois com a adição de um terceiro do gênero *Fomitiporia*, ainda não relatado no Brasil (**Esca**), em plantas adultas (Cavalcanti et al., 2013).

Historicamente, podridões de tronco da videira são caracterizadas a partir do isolamento do agente patogênico dos tecidos vegetais apresentando lesões típicas. Depois, o fungo isolado é submetido a crescimento e ao estímulo do desenvolvimento de suas estruturas reprodutivas, que são identificadas por meio de preparações para microscopia ótica (Almança et al., 2013). No entanto, no caso das podridões de tronco da videira, a utilização de técnicas de biologia molecular se mostra importante, pois com a acurácia dessas técnicas é possível detectar patógenos presentes em tecidos infectados para confirmação etiológica em uma situação de alta densidade de contaminantes



dentro e sobre o tecido lenhoso da videira (Correia et al., 2016; Stein et al., 2019). Para que isso se proceda da maneira mais correta e precisa, trabalhos envolvendo caracterização de DNA de populações em estudos filogenéticos e de variabilidade genética de patógenos coletados em uma delimitação geográfica devem ser conduzidos previamente (Strange, 2003; Stein et al., 2019). Tais estudos servem para subsidiar abordagens corretas para detecção molecular, como seleção de regiões discriminantes e específicas do DNA, sítios de restrição e desenho de iniciadores (Stein et al., 2019).

No Brasil, a incidência de podridões descendentes causadas por fungos do gênero *Lasiodiplodia* foi bem estudada no Vale do São Francisco, uma região de marcante produção de uvas de mesa no nordeste do país. Nessa região, *L. theobromae*, *L. crassispora*, *L. pseudotheobromae* e *L. parva* foram relatados em videira (Correia et al., 2016). O Estado de São Paulo também registra evidências de podridões descendentes em seus vinhedos causados por *Lasiodiplodia*, e trabalhos de controle biológico envolvendo isolamentos do patógeno têm sido realizados (Marraschi et al., 2019). Embora já anteriormente identificados em vinhedos da Serra Gaúcha, relatos iniciais de *L. theobromae* associados à podridão descendente no Rio Grande do Sul foram feitos por Berlatto et al. (2017). Entretanto, até o momento, não há registros de informações a respeito da caracterização molecular de isolados identificados na Serra Gaúcha.

O presente estudo teve por objetivo confirmar a identificação de *Lasiodiplodia theobromae*, por meio de análise das variações genéticas presentes em sequências de três regiões do DNA genômico: ITS(1/2), EF1- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina. Adicionalmente, foram analisados polimorfismos presentes em produtos de PCR dos isolados, pela técnica de PCR-RFLP (CAPS; *Polymerase Chain Reaction – Random Fragment Length Polymorphism/Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), empregando-se as endonucleases HaeIII e CfoI.

Por fim, escolha de iniciadores de PCR e configurações de otimização e termociclagem foram realizados para os trabalhos de obtenção de produtos de PCR passíveis para uso em ensaios de detecção, bem como para consecução dos objetivos supracitados.

## Material e Métodos

As linhagens de *Lasiodiplodia theobromae* utilizadas na pesquisa foram fornecidas pelo Laboratório de Fitopatologia do Instituto Federal do Rio Grande do Sul (IFRS – Campus Bento Gonçalves) e pela Embrapa Uva e Vinho, através da Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial (CMIA) (Tabela 1). O material biológico foi fornecido em três replicadas de cultivos axênicos em placas de Petri, em meio BDA.

**Tabela 1.** Linhagens de *L. theobromae* disponibilizadas para o presente estudo

| Cód. LIPP | Cod. Linhagem | Local           | Genbank (ITS) | Procedência                    |
|-----------|---------------|-----------------|---------------|--------------------------------|
| 10IF      | TD323/2015    | A. Prado/RS     | MK00123       | Lab. Fitopatologia, IFRS-Bento |
| L124      | BRM004720     | B. Gonçalves/RS | MK00124       | CMIA<br>Embrapa Uva e Vinho    |
| L136      | BRM004725     | Jales/SP        | MK00125       | CMIA<br>Embrapa Uva e Vinho    |

### Subcultivo e produção de biomassa micelial

O subcultivo foi feito em erlenmeyers de 50 mL, onde se verteu meio BD (batata-dextrose), líquido, contendo antibiótico (estreptomicina 0,05 µg/mL). Neste meio se adicionou um disco do meio BDA ( $\varphi = 0,5$  cm) dos cultivos axênicos de *L. theobromae*, contendo micélio do fungo (Tabela 1). Os erlenmeyers foram transferidos e permaneceram em mesa agitadora (110 rpm) durante 5 dias a 25 °C, fotoperíodo de 12h, até obtenção de biomassa micelial. Posteriormente, a biomassa foi filtrada com um sistema trompa d'água, kitassato e papel com tamanho de poro de 11 µm. O filtrado foi estocado em tubos de 1,5 mL e armazenado a -20 °C para extração de DNA.

## Extração de DNA

O método utilizado para extrair o DNA dos isolados foi adaptado do protocolo clássico Fenol:Clorofórmio:Isoamílico (Sambrook et al., 1989). Dentro de um microtubo de 1,5 mL foi adicionada 100 mg de biomassa micelial, 5 mg de pérolas de vidro ( $\varphi = 1\text{mm}$ ), 200  $\mu\text{L}$  de tampão de extração [Triton<sup>1</sup> 2%, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM (pH 8,00)] e 200  $\mu\text{L}$  de fenol:clorofórmio:isoamílico. A mistura foi homogeneizada em vortex durante 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de tampão TE e a mistura foi centrifugada a 11.000 x g durante 6 minutos. Após a formação de duas fases, uma alíquota de aproximadamente 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL. A este sobrenadante foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de fenol:clorofórmio:isoamílico e novamente homogeneizado. Aproximadamente 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de 1,5 mL. Neste microtubo foram acrescentados 400  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, antes de ser submetido à centrifugação (11.000 x g por 6 minutos). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 mL, onde se adicionou 750  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto com nova centrifugação durante 10 minutos, a 11.000 x g. Dessa vez o sobrenadante foi descartado para a adição de 1 mL de etanol 75% aos tubos. Após nova centrifugação (11.000 x g por 3 minutos), o sobrenadante foi descartado e os tubos contendo DNA ficaram abertos em uma estufa a 37 °C durante 12 horas. Após a incubação, o DNA das amostras foi ressuspensionado em água ultrapura e estocado a -20 °C para análises.

## Métodos de PCR

Para cada reação foi utilizada uma mistura reacional contendo: 10,7  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, 5  $\mu\text{L}$  de tampão específico (10x) para a Taq polimerase (1000U), 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 4,5  $\mu\text{L}$  de dNTPs (100 mM), 1  $\mu\text{L}$  do iniciador direto, 1  $\mu\text{L}$  do iniciador reverso, 0,3  $\mu\text{L}$  de Taq polimerase e 1  $\mu\text{L}$  de DNA fúngico, em volume final de 25  $\mu\text{L}$  para a mistura reacional. As sequências dos iniciadores usados estão descritas na Tabela 2. A reação, após estar completa dentro de um tubo de 200  $\mu\text{L}$ , foi submetida a uma centrifugação rápida para homogeneização, e depois colocada em termociclador.

---

<sup>1</sup> A menção a esta marca é apenas para fins de registro das condições usadas, não havendo, por parte da Embrapa e autores desta publicação, qualquer tipo de conotação comercial ou de recomendação de uso

A primeira amplificação por PCR para os isolados estudados (região do rDNA 18S e 5,8S) foi realizada com os iniciadores ITS1/ITS4 e ocorreu nas

**Tabela 2.** Tabela de iniciadores usados para isolamento das regiões para identificação e caracterização

| Região  | Iniciador      | Sequência<br>(5' → 3')        | Temperatura<br>pareamento<br>(°C) |                  | Referência                   |
|---------|----------------|-------------------------------|-----------------------------------|------------------|------------------------------|
|         |                |                               | A <sup>(1)</sup>                  | B <sup>(2)</sup> |                              |
| ITS 1/2 | ITS 1          | TCCGTAGGTGACCTGCGG            | 68,5                              | 64,5             | White et al.,<br>1990        |
|         | ITS 4          | TCCTCCGCTTATTGATATGC          | 61,5                              | 57,8             |                              |
| β-tub   | Bt2a           | GGTAACCAAATCGGTGCTG-<br>CTTTC | 70,2                              | 66,8             | Glass;<br>Donaldson,<br>1995 |
|         | Bt2b           | CCCTCAGTGTAGTGACCCT-<br>TGGC  | 70,3                              | 66,8             |                              |
| EF1-α   | EF1-<br>-728F  | CATCGAGAAGTTCGAGAAGG          | 61,5                              | 57,6             | Carbone;<br>Kohn, 1999       |
|         | EF1-<br>-1567R | ACHGTRCCRATACCACCRA-<br>TCTT  | 53,7                              | 56               |                              |

<sup>(1)</sup> Sigma-Aldrich<sup>2</sup>

<sup>(2)</sup> Primer 3Plus<sup>2</sup>

seguintes condições: um ciclo de desnaturação de 95 °C por cinco minutos; 39 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por um minuto e 72 °C por um minuto; e um ciclo final de 72 °C por 10 minutos. Na segunda amplificação por PCR utilizou-se o par Bt2a/Bt2b para amplificar a região de β-tubulina dos fungos. Essa reação ocorreu na seguinte configuração: um ciclo de 94 °C por cinco minutos; 28 ciclos de 94 °C durante um minuto, 58,5 °C por um minuto e 72 °C por um minuto e meio; e um ciclo final de 72 °C por 10 minutos. A terceira e última reação, visando amplificação do EF-1a, foi feita com o par EF1-728F/EF1-1567R (Tabela 2), e ocorreu nas seguintes condições: um ciclo de 94 °C por cinco minutos; 28 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 56,3 °C por um minuto e 72 °C por um minuto; e um ciclo final de 72 °C por 10 minutos.

<sup>2</sup> A menção a esta marca é apenas para fins de registro das condições usadas, não havendo, por parte da Embrapa e autores desta publicação, qualquer tipo de conotação comercial ou de recomendação de uso

Os amplicons resultantes da PCR foram resolvidos em gel de agarose a 1,2% em solução de TBE 1X (Tris-base, Ácido bórico, EDTA 0,5 M). Em seguida, 4,5  $\mu$ L dos produtos da reação foram homogeneizados com 2,2  $\mu$ L de solução de carregamento ( $H_2O$ , azul de bromofenol, glicerol 30%), totalizando o volume de 6,7  $\mu$ L a ser depositado nos poços do gel.

## **Preparo para sequenciamento pelo método de Sanger**

Após a obtenção dos produtos de PCR, o DNA amplificado foi preparado para sequenciamento. Foram homogeneizados 5  $\mu$ L do produto de PCR, 1  $\mu$ L de fosfatase alcalina (SAP; 1000U, 1U/ $\mu$ L) e 1  $\mu$ L de exonuclease (EXO; 1000U, 10U/ $\mu$ L) em um tubo de 200  $\mu$ L e submetidos a uma reação de preparação em termociclador, cujas condições consistiram de um ciclo de 37 °C por 15 minutos e um ciclo de 80 °C por 15 minutos. O DNA tratado foi, então, quantificado em espectrofotômetro UV/Vis.

Após a leitura, foi calculada a quantidade necessária de DNA-molde para se atingir o valor de 60 ng de ácido nucléico, por diluição. Em um tubo de 0,5 mL, uma alíquota da massa obtida de DNA-molde foi adicionada a 1,8  $\mu$ L do iniciador direto utilizado na reação de PCR a 4,5 pmol. Por fim, as amostras foram liofilizadas para envio à empresa contratada, responsável pelo sequenciamento. Eletroferogramas foram retornados por e-mail, para os estudos de filogenia.

## **Padrões de fragmentação PCR-RFLP (CAPS) em DNA por enzimas de restrição**

Os produtos de PCR das duas regiões selecionadas para o estudo, ITS(1/2) e  $\beta$ -tubulina, foram digeridos individualmente por meio da ação de duas endonucleases de restrição: HaeIII (5' GG↓CC 3') e CfoI (5' C↓GCG 3'). As clivagens enzimáticas ocorreram em meio reacional específico, recomendado pelo fabricante, durante 2 horas e 30 minutos a 37 °C. A detecção dos fragmentos gerados pela ação das enzimas foi realizada via eletroforese em gel de agarose a 3% em solução tampão de TBE 1X (Tris-base, Ácido bórico, EDTA 0,5M), seguindo metodologia acima descrita para géis de PCR qualitativo (Sambrook et al., 1989).

## Estudos filogenéticos

As sequências e os eletroferogramas fornecidos foram visualizados e as sequências selecionadas foram apenas aquelas com escore PHRED > 20. Os tamanhos dos amplicons em gel foram calculados por aproximação logarítmica e tiveram correspondência confirmada com as respectivas sequências recebidas. As sequências depuradas no aplicativo acima foram preparadas em arquivo .txt, em formato FASTA. Depois, um arquivo maior foi criado a partir da adição de sequências baixadas do Genbank (NCBI), para reconstrução de árvores filogenéticas.

Em seguida, os arquivos FASTA construídos com as sequências selecionadas para filogenia foram submetidas ao pacote MEGA, versão 7.0 (Kumar et al., 2016), onde sofreram alinhamento com a interface ClustalW interna ao pacote. Como grupos externos para compor a árvore filogenética, foram selecionados duas linhagens de uma espécie chinesa de *Diaporthe*, adequada à análise de agrupamentos envolvendo fungos da família *Botryosphaeriaceae* e as duas regiões selecionadas para o estudo das sequências concatenadas (ITS1/2 e  $\beta$ -tubulina) mediante ferramenta online FaBox 1.5.

Para reconstrução da árvore, foi considerada uma seleção de acessos de patógenos causadores de podridão descendente da videira em outros países que tivessem disponibilizado, no NCBI, as duas regiões a serem concatenadas. Para isso, o método selecionado foi o da Máxima Parcimônia (MP, *Maximum Parsimony*), com o método de bootstrap gerando a estatística de desdobramento evolutivo, com deleção parcial (80%) de gaps, replicadas 900 vezes. Foram selecionados para esta AF apenas os isolados que continham as duas regiões apresentando eletroferogramas com boa qualidade. Nenhum valor de bootstrap foi omitido, pois foram reunidos poucos isolados e a preservação desta informação não interferiu na visualização dos clados. Em MP, foi selecionada a árvore 1 (de duas), com comprimento = 926. O índice de consistência obtido foi de 0,825, o índice de retenção foi de 0,924 e o de consistência foi de 0,772 (0,762 após a modificação de escala) para todos os sítios informativos para MP. O percentual de árvores reconstruídas (900 repetições) nas quais os taxa associados são desdobrados juntos estão apresentados rentes aos desdobramentos. A árvore MP foi obtida por meio do algoritmo *Subtree-Pruning-Regrafting* (SPR). A análise envolveu um total de 35 sequências concatenadas e todas as posições com menos de 80% de cobertura foram eliminadas.

## Resultados e Discussão

---

### Otimização da PCR para regiões marcadoras de *L. theobromae*

A região do espaçador interno transcrito (ITS), região conservada característica de fungos verdadeiros (*True Fungi*) e que possui informações específicas e úteis para identificar e diferenciá-los, é uma sequência do DNA ribossomal que pode sofrer transcrição primária e splicing onde as regiões ITS1 e ITS2 são removidas da fita produzida pela DNA polimerase I, dando origem a três rRNAs (Ciesniewska et al., 2020). As regiões ITS1 e ITS2 são importantes para estudos de filogenia e desenvolvimento de estratégias de identificação de espécies no diagnóstico de doenças (Korabecna, 2007). Essa região do rDNA é de especial interesse para estudos filogenéticos em fungos por evoluírem mais rapidamente entre gêneros, sendo conservadas o suficiente para permitirem a caracterização de espécies em populações (White et al., 1990; Ciesniewska et al., 2020).

A definição das temperaturas para a PCR da região ITS foi feita de acordo com abordagem interna ao Laboratório de Interação Planta-Patógeno (LIPP) do CNPUV, o qual leva em consideração as recomendações do fabricante dos iniciadores (*primers*) (Sigma-Aldrich) e a ferramenta online Primer3Plus, que analisa esses iniciadores e fornece as temperaturas adequadas ao seu uso. Os resultados da amplificação da região ITS dos isolados de *Lasiodiplodia theobromae* demonstraram que o fragmento possui entre 500 e 600 pares de bases, o que é esperado de fungos fitopatogênicos (Figura 1).

Para aprimorar a caracterização molecular dos isolados de *L. theobromae* e enriquecer a base de dados para as análises filogenéticas, foi feito estudo de mais duas regiões marcadoras do DNA genômico do fungo: a sequência parcial da região da  $\beta$ -tubulina e do fator de alongação 1- $\alpha$  (EF-1a). Para a região da  $\beta$ -tubulina foram utilizados os iniciadores Bt2a/Bt2b (Tabela 2), e a temperatura de pareamento obtida para os melhores resultados foi de 58,5 °C para todos os isolados de *L. theobromae*. Foram evidenciados fragmentos amplificados entre 400 a 500 pares de bases (Figura 2).

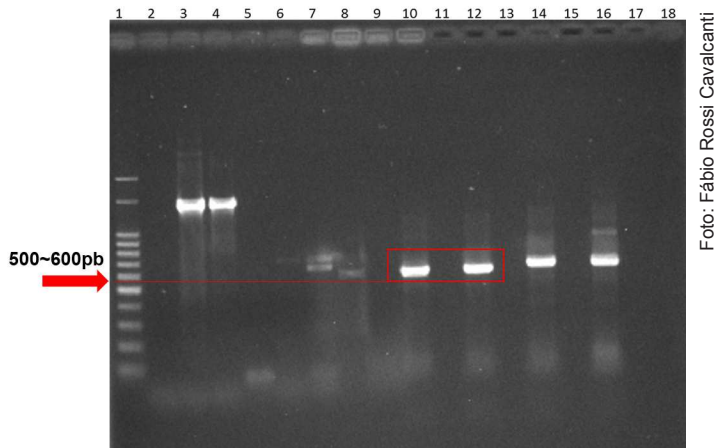


Foto: Fábio Rossi Cavalcanti

**Figura 1.** Gel de agarose (a 1,5% p/v) com produtos de PCR da região ITS(1/2) em isolados de *L. theobromae*, comparativamente a outros fungos. Ordem no gel: (1) Marcador de peso molecular - 100 pb; (2) Controle negativo (água ultra pura); (3 e 4) isolados de *Fusarium oxysporum* F295 e F627, respectivamente; (5) e (9), Controle negativo (água ultra pura); (10 e 12) *Lasiodiplodia theobromae* L124, L136 (bandas marcadas no box vermelho); (14 e 16) *Phaeomoniella chlamydospora*, 137 e 712; (11, 13, 15, 17 e 18) Poços vazios.

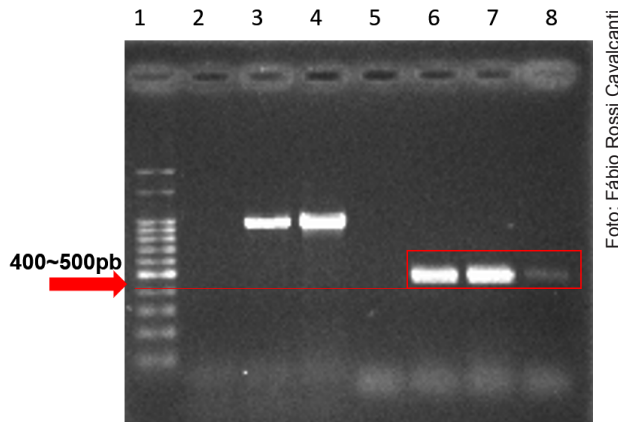
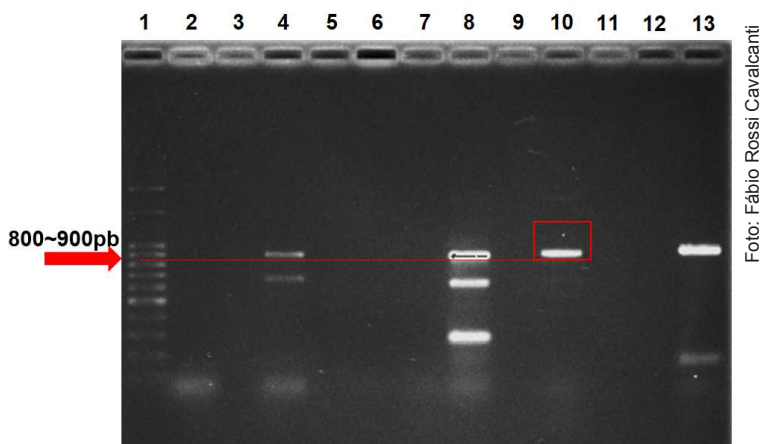


Foto: Fábio Rossi Cavalcanti

**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose (a 1,5% p/v) com os produtos de PCR relativos a fragmentos amplificados da  $\beta$ -tubulina. Ordem no gel: (1) Marcador de peso molecular - 100 pb; (2) Controle negativo (água ultra pura); (3 e 4) isolados de *Fusarium oxysporum*, F295 e F627, respectivamente; (5) Controle negativo (água ultra pura); (6,7 e 8) *Lasiodiplodia theobromae*, L124, L136 e 101F respectivamente.



Na região do fator de elongação 1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), Figura 3, apenas uma das linhagens de *Lasiodiplodia theobromae* (isolado L136) foi amplificado com sucesso, utilizando a temperatura de pareamento de 56,3 °C ; o amplicon resultante permitiu resolver fragmentos de 800 a 900 pares de bases. Os demais fungos de trabalho não responderam com produtos de PCR visíveis, por eletroforese em agarose. Essa inconsistência permanece como objeto de estudo, com relação à região do fator de elongação EF-1 $\alpha$  desses fungos.



**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose (a 1,5% p/v) com os produtos de PCR da região do fator de elongação (EF-1 $\alpha$ ). Ordem no gel: (1) Marcador de peso molecular - 100 pb; (2) Controle negativo (água ultra pura); (3, 5) Poços vazios; (4, 6, 7 e 8) respectivamente, *Botryosphaeria parva*, 04IF, *B. dothidea*, 16IF, dois isolados de *Neofusicoccum parvum*, 25IF e 94IF; (9) Controle negativo (água ultra pura); (9, 11 e 12) Poços vazios; (10) *Lasiodiplodia theobromae*, L136; (13) *Fusarium oxysporum*, F295.

## Estudos filogenéticos com as regiões ITS 1/2 e $\beta$ -tubulina

As sequências das regiões ITS,  $\beta$ -tubulina e EF-1 $\alpha$  obtidas dos isolados abordados para o estudo de *L. theobromae* (Tabela 1) foram submetidas ao BLASTn, para confirmação das espécies em alinhamentos feitos com entradas disponíveis no Genbank (NCBI). Exceto pela região do fator de elongação EF-1 $\alpha$ , as sequências obtidas permitiram um estudo filogenético circunstancial para indivíduos representativos de vinhedos com incidência de podridão descendente causado por *Lasiodiplodia*, em São Paulo e no Rio Grande do Sul. Para os estudos filogenéticos em sequências concatenadas, a região do

EF-1 $\alpha$  não foi incorporada porque o amplicon foi resolvido apenas na linhagem L136. Se, forçadamente, a região do EF-1 $\alpha$  fosse incluída na pesquisa, as análises iriam prosseguir com dados desbalanceados, acarretando um desnecessário aumento de incerteza nos resultados.

Informações de uma população representativa da família Botryosphaeriaceae (a qual pertence o patógeno em estudo) foram selecionadas em função da sua distribuição em regiões de produção e da disponibilidade das sequências de ITS1/2 e  $\beta$ -tubulina no NCBI. Também foram usados informações de outras espécies da família à qual o patógeno pertence.

A avaliação filogenética (AF) foi gerada com sequências concatenadas (ITS e  $\beta$ -tubulina), como mostra a Figura 4.

A AF com os dados concatenados obtidos expôs três cladogramas (A, B e C) para o grupo Botryosphaeriaceae que reúne todos os isolados de *L. theobromae* estudados, mais outras espécies de causadores de podridão descendente do mundo todo (Figura 4). Nesse estudo específico, o agrupamento (A) contém a maioria dos isolados selecionados, um agrupamento com isolados de *Botryosphaeria rhodina* do México. O desdobramento evolutivo principal possui baixo valor relativo de bootstrap, não sendo capaz de sustentar a hipótese de variação interespecífica.

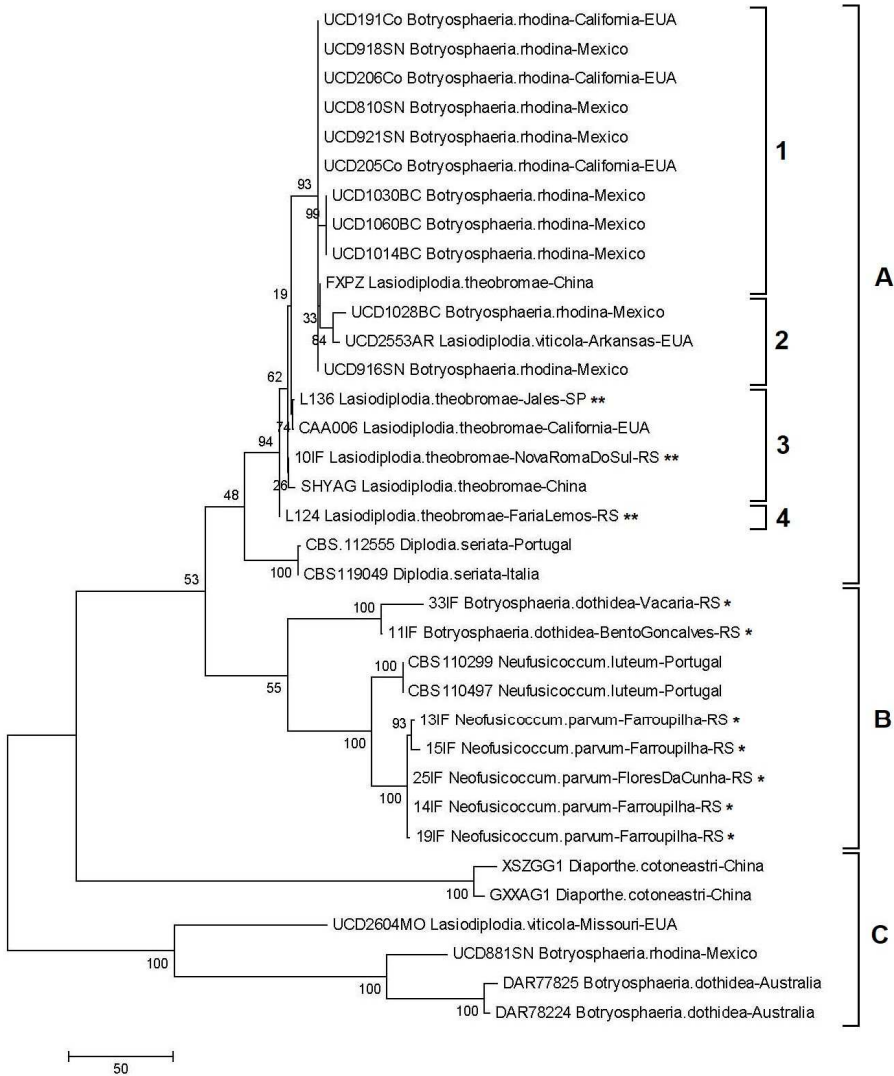
No entanto, o clado A3 pôde agrupar os isolados *L. theobromae* da China e da Califórnia (EUA) com os brasileiros, de Jales/SP (L136) e um dos encontrados no RS, o de Antônio Prado (10IF). Ao tempo em que o estudo filogenético em máxima parcimônia (MP), com as duas regiões concatenadas, pôde revelar um agrupamento comum aos isolados estudados, conjuntamente a indivíduos da China e EUA, foi evidenciada uma significativa divergência evolutiva do agrupamento contendo o isolado de Bento Gonçalves/RS, que, nesta árvore, se posicionou no clado (A4) com alto bootstrap relativo (Figura 4). De modo notável, um isolado chinês da mesma espécie no clado (A1), o FXPZ, divergiu dos agrupamentos (A3) e (A4)

De fato, Berlatto et al. (2017), em levantamentos feitos para podridão descendente em videira no Estado do Rio Grande do Sul, evidenciaram baixíssima prevalência de fungos *Lasiodiplodia* como agentes causadores desse tipo de doença, no Rio Grande do Sul. No estudo mais recente, foi encontrada uma prevalência de apenas 1 a 2% do *L. theobromae* associado a podri-

dões descendentes, em vinhedos comerciais da Serra Gaúcha (Berlatto et al., 2017). Estudos específicos sobre *Lasiodiplodia* em videira, no Brasil, são considerados escassos. Uma referência foi um levantamento de espécies de *Lasiodiplodia* associados à podridão descendente da videira em parreirais de uva de mesa do Vale do São Francisco (VSF), no nordeste brasileiro (Correia et al., 2016). Neste trabalho foram selecionados 112 isolados obtidos de 14 vinhedos em três localidades do Vale, sugerindo uma maior prevalência do fungo no VSF do que o observado no RS, e mesmo em São Paulo. Estudos filogenéticos de *Lasiodiplodia* foram realizados considerando as regiões ITS e EF-1a, que, neste caso, se mostraram elucidativas para caracterizar parcialmente populações (Correia et al., 2016). Uma das hipóteses para explicar a maior prevalência do patógeno na região nordeste é que lá este fungo dispõe de maior gama de hospedeiros (outras fruteiras, inclusive) como reserva de parasitismo e/ou sobrevivência (Netto et al., 2017).

Outros estudos com coleções de *Lasiodiplodia* ou outros patógenos fúngicos envolvendo as regiões EF-1a,  $\beta$ -tubulina e RPB2, além do ITS foram executados a fim de obter-se grupos diferenciais para caracterização de patógenos presentes em uma determinada região. Por exemplo, em *Neonectria ditissima*, agente causador do cancro europeu da macieira, foi possível discriminar populações brasileiras, americanas, canadenses e européias usando sequências de EF-1a e ITS (Stein et al., 2019). Por outro lado, resultados pouco conclusivos foram encontrados em combinações de ITS com RPB2, no mesmo fungo (Castlebury et al., 2006; Zhao et al., 2011).

No estudo filogenético apresentado neste trabalho, foi possível observar que os isolados gaúchos de *Neofusicoccum parvum* (*Botryosphaeria parva*) e *Botryosphaeria dothidea* construíram um agrupamento (B), por desdobramento de (A). Como acima comentado, o clado (A) foi considerado principal, por conter a maior parte dos isolados de *L. theobromae*, tanto os em estudo quanto os comparativos (Figura 4). Curiosamente, dois isolados australianos de *Botryosphaeria dothidea* (DAR77824 e DAR78225, clado C) demonstraram ter considerável distanciamento evolutivo com relação aos isolados da mesma espécie encontrados na Serra Gaúcha, agrupados no clado (B) (Figura 4). Também digno de nota, o isolado UCD881SN de *B. rhodina* (clado C), bastante divergente do agrupamento do mesmo Botryosphaeriaceae (clado A1) encontrado em vinhedos do México (Figura 4).



**Figura 4.** Árvore filogenética reconstruída a partir de alinhamentos concatenados de sequências das regiões do ITS1/2 e  $\beta$ -tubulina de *Lasiodiplodia* e fungos Botryosphaeriaceae causadores de podridões descendentes em videira. As distâncias evolutivas são dispostas nas unidades do número de diferenças de bases por sítio. A árvore é 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. (CI = 0,835676; RI = 0,923695).

## PCR-RFLP das regiões ITS 1/2 e $\beta$ -tubulina

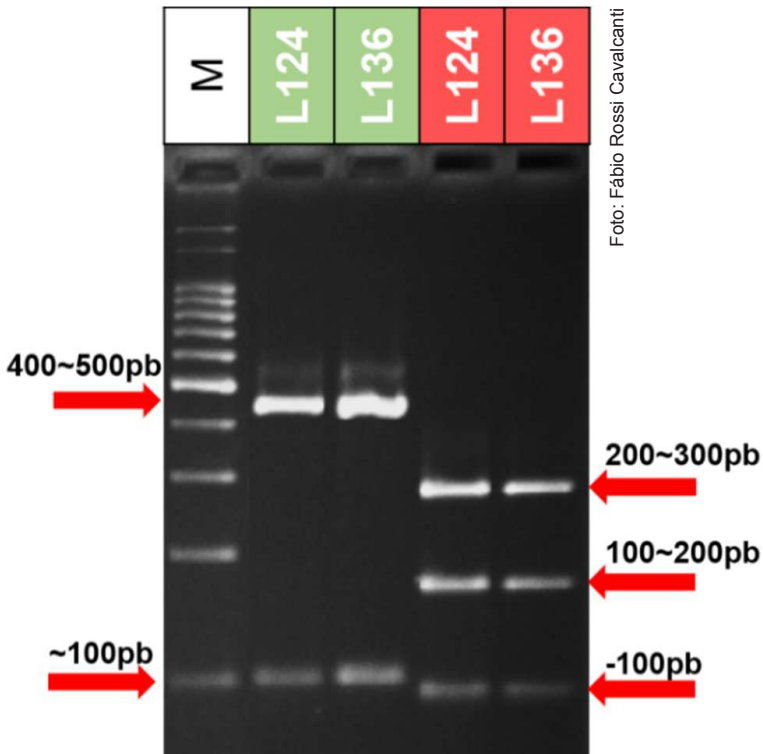
Neste estudo, foram realizados ensaios de PCR-RFLP para buscar informações sobre a fragmentação dos produtos de PCR de duas das regiões estudadas, ITS(1/2) e  $\beta$ -tubulina. A marcação específica de *Lasiodiplodia theobromae* com relação a outros patógenos isolados de tecidos de videira com podridão descendente pode fornecer uma solução tecnológica para a detecção específica deste patógeno, em meio a um extrato heterogêneo de DNA, típico dos obtidos em amostras contaminadas, em condições de campo. Nas figuras 5 e 6, é possível a observação dos padrões de restrição dos produtos de PCR obtidos das duas regiões selecionadas para o estudo dos isolados de *L. theobromae* em análise.

Com relação aos ensaios de restrição na região ITS em *L. theobromae*, nota-se um padrão de fragmentação comum entre todos os isolados (10IF não mostrado), para cada enzima de restrição, HaeIII e CfoI. Com relação ao perfil obtido por incubação com HaeIII, duas bandas marcadoras foram evidenciadas, de 476 e 100pb. Com relação ao perfil por incubação com CfoI, três bandas marcadoras foram obtidas: 287, 163 e aprox. 88pb (Figura 5).

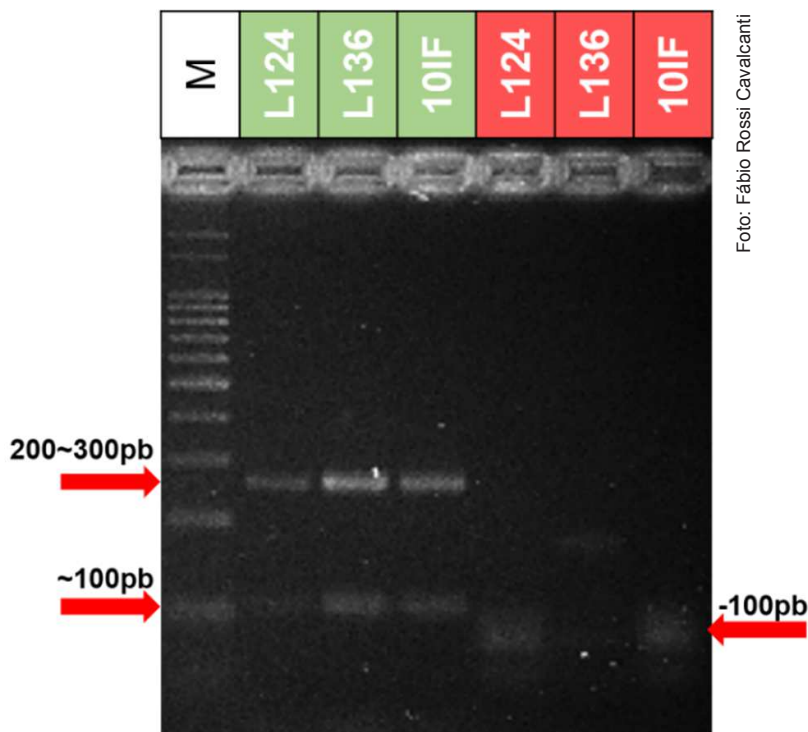
Considerando os produtos de PCR da região da  $\beta$ -tubulina de *L. theobromae* submetidos a enzimas de restrição, também foi evidenciado um padrão de fragmentação comum entre todos os isolados, por HaeIII (Figura 6). Com relação ao perfil obtido por incubação com essa enzima, duas bandas marcadoras, de 265 e 110pb, foram evidenciadas (Figura 6). Por outro lado, diferentemente do observado pela abordagem com a região do ITS, não foi possível evidenciar um padrão de fragmentação consistente para amplicons de  $\beta$ -tubulina, que pudesse marcar um perfil de *L. theobromae* para essa região, com a enzima CfoI (Figura 6). No entanto, as sequências geradas pela amplificação do gene da  $\beta$ -tubulina podem ser usados para identificar enzimas de restrição para a geração dos marcadores CAPS buscados, em pesquisa subsequente.

A adoção de clivagem de fragmentos de produtos de PCR por enzimas de restrição se apóia na hipótese de que existam diferenças detectáveis de polimorfismo entre as espécies e/ou indivíduos, a depender do tipo e tamanho de fragmento estudado. Trabalhos acerca de fragmentação de produtos de PCR visando à identificação de microrganismos, diferenciação de espé-

cies fúngicas e diversidade genética intraespecífica são relatados na literatura (Mahoney et al., 1999; Felix et al., 2019). Por exemplo, Crockard et al. (1998) utilizaram a técnica de PCR-RFLP (CAPS) com a enzima EcoRI após amplificarem a região SSU (subunidade menor) do rDNA de *N. ditissima*. Um trabalho análogo foi repetido na Embrapa Uva e Vinho, para incorporação do método (Stein et al., 2016). A técnica de PCR-RFLP (CAPS) é uma metodologia rápida, sensível e com menor custo do que o seqüenciamento, em caso da indisponibilidade de instrumentos (Stein et al., 2019).



**Figura 5.** Perfil de fragmentação dos produtos de PCR associados à região ITS com as enzimas HaeIII e CfoI. Eletroforese em gel de agarose (a 3% p/v). Legenda: (M) Marcador de peso molecular - 100pb; Colunas grifadas em verde: amplicons clivados com HaeIII; Colunas grifadas em vermelho: amplicons clivados com CfoI.



**Figura 6.** Perfil de fragmentação utilizando os produtos da amplificação da região  $\beta$ -tubulina com as enzimas HaeIII e CfoI. Eletroforese em gel de agarose 3%. Legenda: (M) Marcador de peso molecular - 100pb; Colunas grifadas em verde: isolados clivados com HaeIII; Colunas grifadas em vermelho: ambos isolados não demonstraram um padrão de restrição consistente com CfoI atuando em seus produtos de PCR de  $\beta$ -tubulina.

## Conclusões

---

1. Os iniciadores ITS1 e ITS4; Bt2a e Bt2b; e EF-1 $\alpha$  728 e EF-1 $\alpha$  1567 permitem a amplificação do DNA dos isolados gaúchos de *Lasiodiplodia theobromae*, assim como o obtido em Jales/SP;

2. Os produtos de PCR obtidos são de, aproximadamente, 600pb para a região ITS, 500pb para a região de  $\beta$ -tubulina e 900pb para a região de EF-1 $\alpha$ ;

3. Para *L. theobromae*, há padrões de restrição específicos após digestão das regiões amplificadas de ITS e  $\beta$ -tubulina com as enzimas HaeIII e CfoI, capazes de promover a identificação do fungo;

4. Sequências nas regiões ITS(1/2) e  $\beta$ -tubulina do DNA genômico de *L. theobromae*, obtidas de amostras de videira com podridão descendente no Rio Grande do Sul e Jales/SP, mostram alta similaridade a entradas depositadas no GenBank (NCBI) do mesmo taxon;

5. A abordagem de filogenia em máxima parcimônia (MP), com as duas regiões em estudo concatenadas, revela um agrupamento comum aos isolados de Antônio Prado/RS e Jales/SP conjuntamente a isolados da China e EUA. A mesma abordagem sugere uma divergência filogenética significativa do agrupamento com relação ao isolado de Bento Gonçalves/RS, dando um indicativo de que pode haver diversidade genética desses patógenos em vinhedos gaúchos, a despeito de sua baixíssima prevalência na região.

## Referências

---

ALMANÇA, M. A. K.; ABREU, C. M. de; SCOPEL, F. B.; BENEDETTI, M.; HALLEEN, F.; CAVALCANTI, F. R. **Evidências morfológicas da ocorrência de *Phaeomonilla chlamydospora* em videiras no estado do Rio Grande do Sul**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 134). Doi: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/856487>. Acesso em 03. ago. 2020.

BERLATO, 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. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON GRAPEVINE TRUNK DISEASES, 10., 2017, Reims, Fr. **Book of abstracts**... Reims, FR: ICGTD, poster session 1., PO.15, 4 a 7 July 2017..

BERTSCH, C.; RAMÍREZ-SUERO, M.; MAGNIN-ROBERT, M.; LARIGNON, P.; CHONG, J.; ABOU-MANSOUR, E.; SPAGNOLO, A.; CLÉMENT, C.; FONTAINE, F. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. **Plant Pathology**, v. 62, n. 2, p. 243–265, April 2013. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02674.x>.



BURRUANO, S.; MONDELLO, V.; CONIGLIARO, G.; ALFONZO, A.; SPAGNOLO, A.; MUGNAI, L. Grapevine decline in Italy caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytopathologia Mediterranea*, v. 47, n. 2, p. 132-136, Aug. 2008. Doi: [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-2616](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-2616).

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, 1999. Doi: <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>.

CASTLEBURY, L. A.; ROSSMAN, A. Y.; HYTEN, A. S. Phylogenetic relationships of *Neonectria/Cylindrocarpon* on fagus in North America. *Canadian Journal of Botany*, v. 84, p. 1417-1433, 2006. Doi: 10.1139/B06-105.

CAVALCANTI, F. R.; BUENO, C. J.; ALMANÇA, M. A. K. **Declínio e morte de plantas de videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 82). Doi: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/859270>. Acesso em 03. ago. 2020

CIESNIEWSKA, A. B.; PUSZ, W.; PATEJUK, K. Problems, limitations and challenges in species identification of Ascomycota members on the basis of ITS regions. *Acta Mycologica*, v. 55, n. 1, artigo 5512, 2020. Doi: <https://doi.org/10.5586/am.5512>.

CORREIA, K. C.; SILVA, M. A.; MORAIS Jr, M. A. de; ARMENGOL, J.; PHILLIPS, A. J. L.; CAMARA, M. P. S.; MICHEREFF, S. J. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. *Plant Pathology*, v. 65, n. 1, p. 92–103, 2016. Doi: 10.1111/ppa.12388.

DÍAZ, G. A.; LATORRE, B. A. Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against pathogens associated with grapevine trunk diseases in Chile. , v. 46, p. 106–112, April 2013. Doi: 10.1016/j.cropro.2013.01.001.

FELIX, C.; MENESES, R. S.; GONÇALVES, M. F. M.; TILLERMAN, L.; DUARTE, A. S.; JORRIN-NOVO, J. V.; PEER, Y. V. de; DEFORCE, D.; NIEUWERBURGH, F. V.; ESTEVES, A. C.; ALVES, A. A multi-omics analysis of the grapevine pathogen *Lasiodiplodia theobromae* reveals that temperature affects the expression of virulence- and pathogenicity-related genes. *Scientific Reports*, v. 9, n. 13144, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49551-w>.

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

GRAMAJE, D.; ÚRBEZ-TORRES, J. R.; SOSNOWSKI, M. R. Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant Disease*, v. 102, n. 1, p. 12-39, Jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0512-FE>.

KORABECNA, M. The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA gene): its biological meaning and application in medical mycology. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**. Badajoz: Formatex, 2007. p. 783–787.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, jul. 2016. Doi: 10.1093/molbev/msw054.

MAHONEY, E. M.; MILGROOM, M. G.; SINCLAIR, W. A.; HOUSTON, D. Origin, genetic diversity and population structure of *Neectria coccinea* var. *faginata* in North America. *Mycologia*, v. 91, n. 4, p. 583–592, Jun. 1999. Doi: <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061056>.

- MARRASCHI, R.; FERREIRA, A. B. M.; BUENO, R.N. da S.; LEITE, J. A. B. P.; LUCON, C. M. M.; HARAKAVA, R.; LEITE, L. G.; PADOVANI, C. R.; BUENO, C. J. A protocol for selection of *Trichoderma* spp. to protect grapevine pruning wounds against *Lasiodiplodia theobromae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 213–221, 2019. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s42770-018-0029-y>.
- NETTO, M. S. B.; LIMA, W. G.; CORREIA, K. C.; DA SILVA, C. F. B.; THON, M.; MARTINS, R. B.; MILLER, R. N. G.; MICHEREFF, S. J.; CAMARA, M. P. S. Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Biology**, v. 121, n. 4, p. 437–451, April 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.006>.
- REHNER, S. A.; BUCKLEY, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **The Mycological Society of America**, v. 97, n. 1, p. 84–98, 2005.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SOSNOWSKI, M. R.; MUNDY, D. C. Pruning Wound Protection Strategies for Simultaneous Control of Eutypa and Botryosphaeria Dieback in New Zealand. **Plant Disease**, v. 103, n. 3, p. 519–525, March 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0728-RE>.
- 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: Embrapa Uva e Vinho, 2016 (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 185).
- STEIN, D. L.; AGUSTINI, B. C.; TORMENTE, F. V.; ALVES, S. A. M.; CAVALCANTI, F. R. Estudos de caracterização molecular de *Neonectria ditissima* no Rio Grande do Sul. In: ALVES, S. A. M.; CZERMAINSKI, A. B. (Ed.). *O Cancro Europeu no Brasil*. Brasília, DF: Embrapa, 2019. cap. 4, p. 60–75.
- STRANGE, R. N. **Introduction to plant pathology**. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd, 2003. 497p. ISBN: 978-0-470-84973-6.
- ÚRBEZ-TORRES, J. R.; LEAVITT, G. M.; GUERRERO, J. C.; GUEVARA, J.; GUBLER, W. D. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of Bot canker disease of grapevines in Mexico. **Plant Disease**, v. 92, n. 4, p. 519–529, April 2008. Doi: [doi:10.1094/PDIS-92-4-0519](https://doi.org/10.1094/PDIS-92-4-0519).
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, p. 315–322, 1990.
- ZANUS, M. C. **Safra da Uva 2020 na Serra Gaúcha**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, abril 2020. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/en/uva-e-vinho/busca-de-noticias/-/noticia/51405680/artigo-safra-da-uva-2020-na-serra-gaucha>>. Acesso em: 20 abr. 2020.
- ZHAO, P.; LUO, J.; ZHUANG, W.; LIU, X.; WU, B. DNA barcoding of the fungal genus *Neonectria* and the discovery of two new species. **Science China. Life Sciences**. v. 54, n. 7, p. 664–674, June 2011. Doi: [10.1007/s11427-011-4184-8](https://doi.org/10.1007/s11427-011-4184-8)
- ZHANG, W.; YAN, J.; LI, X.; XING, Q.; THILINI CHETHANA, K.W.; ZHAO, W. Transcriptional response of grapevine to infection with the fungal pathogen *Lasiodiplodia theobromae*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 5387 March 2019. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41796-9>.

**Embrapa**

---

*Uva e Vinho*