

**Contribuição para o estudo da
Caracterização Molecular de isolados de
Erysiphe necator nas Vinhas do Alentejo**

VERA MARIA GARCEZ MOREIRA

Dissertação apresentada à Universidade de Évora para
obtenção do Grau de Mestre em Viticultura e Enologia



Orientadora: Professora Doutora Maria do Rosário Fernandes Félix

Co-orientadores: Professor Doutor Yvon Bugaret e Engenheiro Jorge Silva

**Contribuição para o estudo da
Caracterização Molecular de isolados de
Erysiphe necator nas Vinhas do Alentejo**

VERA MARIA GARCEZ MOREIRA

Dissertação apresentada à Universidade de Évora para
obtenção do Grau de Mestre em Viticultura e Enologia

Orientadora: Professora Doutora Maria do Rosário Fernandes Félix
Co-orientadores: Professor Doutor Yvon Bugaret e Engenheiro Jorge Silva

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE QUADROS	viii
ABREVIATURAS GERAIS UTILIZADAS	ix
AGRADECIMENTOS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Oídio	3
2. O Organismo Causal	4
3. Ciclo Biológico	9
4. Sintomas e Desenvolvimento do oídio na Videira	11
5. Factores Ambientais que afectam o desenvolvimento e a Propagação do fungo	
<i>E. necator</i>	17
5.1 <u>Temperatura</u>	17
5.2 <u>Humidade</u>	18
5.3 <u>Vento</u>	19
5.4 <u>Luz</u>	19
6. Estratégias de Controlo e meios de protecção contra o oídio da Videira	20
6.1 <u>Técnicas de Cultivo</u>	20
6.2 <u>Plantação de Novas Espécies de <i>Vitis</i></u>	20
6.3 <u>Meios de Luta Biológica</u>	23
6.4 <u>Meios de Luta Química – Fungicidas</u>	23
6.4.1 <u>Fenómenos de Resistência a Fungicidas</u>	26
6.4.2 <u>Mecanismos Moleculares de Resistência a Fungicidas</u>	27
A <u>Resistência ao Benzimidazol</u>	28
B <u>Resistência aos DMIs –Inibidores de Demetilação</u>	29
B.1) <u>Mutações no gene codificado eburicol 14α-demetilase (<i>CYP51</i>)</u>	29
6.5 <u>Métodos Previsionais de Aparecimento do Oídio</u>	31
6.6 <u>Tomadas de Decisão na Gestão dos Tratamentos Fitossanitários Anti-Oídio</u>	33

7. Influência do Oídio na Qualidade Final dos Vinhos	35
7.1 Vinhos Brancos e Rosés	37
7.2 Vinhos Tintos	39
8. Métodos de Detecção Molecular em <i>E. necator</i>	41
8.1 PCR – Reacção de Polimerase em Cadeia	41
8.2 Detecção por CAPS – ‘Cleaved Amplified Polymorphic Sequence’ de diferentes grupos genéticos de isolados de <i>E. necator</i>	42
8.3 Detecção por NAS-PCR – ‘Nested Allele-Specific PCR’ de mutações no gene <i>CYP51</i> de <i>E. necator</i>	43
8.4 Detecção por RAPD (‘Random Amplification Polymorphic’ de DNA) de grupos genéticos de <i>E. necator</i>	45
III. MATERIAIS E MÉTODOS	47
1. Material Vegetal	47
1.1 Preparação do Material Vegetal	49
2. Extracção do DNA	49
3. Identificação de isolados do Grupo A e do Grupo B	50
3.1 Amplificação por Reacção de Polimerase em Cadeia (PCR) de um fragmento do gene da β-tubulina	50
3.2 Polimorfismo da sequência amplificada e cortada (‘Cleaved Amplified Polymorphism Sequence’ – CAPS)	51
4. Identificação de isolados resistentes aos DMIs	52
4.1 Amplificação por Reacção de Polimerase em Cadeia (PCR) do gene da 14α-demetilase (<i>CYP51</i>) de <i>E. necator</i>	52
4.2 ‘Nested Allele-Specific PCR’ – NAS-PCR	53
IV. RESULTADOS E DISCUSÃO	54
1. Observações realizadas à lupa binocular durante a preparação do Material Vegetal	54
2. Quantificação do DNA Total	55
3. Identificação de isolados do Grupo A e do Grupo B	57
3.1 Amplificação de um fragmento do gene da β-tubulina por Reacção de Polimerase em Cadeia (PCR)	57

3.2 Análise do Polimorfismo da sequência amplificada e cortada ('Cleaved Amplified Polymorphism Sequence' – CAPS).....	65
4. Identificação de isolados resistentes aos DMIs.....	68
4.1 Amplificação por Reacção de Polimerase em Cadeia (PCR) do gene da 14 α -demetilase (<i>CYP51</i>) de <i>E. necator</i>	68
4.2 'Nested Allele-Specific PCR' – NAS-PCR.....	71
V. CONCLUSÕES.....	76
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II.1: – Fotos de cleistotecas de <i>E. necator</i> - observação ao microscópio óptico (FOTOS: a partir do site: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm , 2010).	5
Figura II.2: – Fotos de cleistotecas de <i>E. necator</i> - observação ao microscópio electrónico (FOTOS: a partir do site: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm , 2010).	5
Figura II.3: – Ciclo Biológico do Oídio (adaptado de AGRIOS, 2005; GOHEEN <i>et al.</i> , 2001; SILVA, 2008 e S.A., 1998);	10
Figura II.4: – Foto de um ‘drapeau’ com sintomatologia de Oídio (FOTO: YVON BUGARET).	11
Figura II.5: –Foto de uma inflorescência com sintomatologia de Oídio (FOTO: a partir do site: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm , 2010).	12
Figura II.6: – Foto de página superior de folha de videira deformada pelo ataque de Oídio (FOTO: YVON BUGARET).	13
Figura II.7: – Foto de página superior de folha de videira com formação de cleistotecas no final do Verão (FOTO: YVON BUGARET).	13
Figura II.8: – Foto de bagos de uvas com sintomatologia de Oídio ao estado fenológico de bago de ervilha; (FOTO: YVON BUGARET).	14
Figura II.9: – Foto de bagos de uvas com sintomatologia de Oídio - ruptura dos bagos; (FOTO: YVON BUGARET).	14
Figura II.10: – Fotos de bagos de uvas com sintomatologia de Oídio ao estado fenológico de fecho dos cachos (FOTO: YVON BUGARET).	14
Figura II.11: – Foto de um ramo com sintomatologia de Oídio na Primavera (FOTO: a partir do site: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm , 2010).	15
Figura II.12: – Foto de ramo de videira com sintomatologia de Oídio (FOTO: YVON BUGARET).	15
Figura II.13: – Foto de um ramo com sintomatologia de Oídio no Outono (FOTO: a partir do site: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm , 2010).	16

Figura II.14: – Esquema de 5 videiras seleccionadas no meio de uma parcela susceptível ao oídio. A cepa do meio tem uma vara que foi conduzida até ao chão onde se deixaram 3 gomos. (A) rede para manter as folhas caídas; A seta a rosa indica a queda das folhas sobre o ramo deixado no chão.....	32
Figura II.15: – Tomada de decisão para o tratamento do oídio (SILVA, 2008 – Fonte YVON BUGARET).....	34
Figura II.16: – Cacho de uva tinta atacado pelo oídio (SVA, 2008).....	36
Figura II.17: – Sequência de aminoácidos do gene P-450 _{14DM} de <i>E. necator</i> . A sequência nucleótida está numerada relativamente à primeira base do codão de iniciação ATG, e o número à direita de cada linha representa a posição do último nucleótido ou resíduo de aminoácido nessa linha. O truncamento da sequência é indicada por asterisco. A parte conservada do gene CR2, está sublinhada, e as posições dos ‘primers’ de PCR C14, C14R, U14DM e MUT1 estão indicados acima da sequência do nucleótido. O codão modificado e a respectiva sequência de aminoácidos encontrada nos genes P-450 _{14DM} mutantes de isolados resistentes é dada acima da sequência. O nucleótido substituído está indicado a negrito ([1] DÉLYE <i>et al.</i> , 1997);.....	43
Figura II.18: – Produtos de amplificação NAS-PCR do gene P-450 _{14DM} de DNAs extraídos a partir de isolados sensíveis e resistentes ao triadimenol de <i>E. necator</i> , usando os ‘primers’ U14DM e MUT1. Amostras: 1 – marcador (1-kb DNA ladder; Gibco-BRL); 2 – (H ₂ O) controlo negativo sem DNA; 3 – vários fungos, de folhas de videira colhidas no campo, que cresceram em placas de agar com dextrose da batata; 4 a 8 – isolados sensíveis ao triadimenol; 9 a 12 – isolados resistentes com nível de resistência inferior a 5; 13 a 19 - isolados resistentes com nível de resistência superior a 5.....	44
Figura IV.1 – Foto de micélio de <i>E. necator</i> numa folha de videira.....	54
Figura IV.2: – Foto em que se observam hifas do fungo <i>E. necator</i> numa folha de videira.....	55
Figura IV.3 – Foto de uma folha de videira com sintomatologia de oídio. Podem observar-se conidióforos (A) e conídios em cadeia (B);.....	55
Figura IV.4: – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação de um fragmento de 450 pb do gene da β -tubulina. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 55 e 56 – amostras em que se utilizou DNA total; CN – controlo negativo de PCR; CP ₃ – controlo positivo gentilmente cedido pelo Dr. Delmotte do INRA. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (450 pb).....	57
Figura IV.5: – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação de um fragmento de 450 pb do gene da β -tubulina. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 15 – amostra em que se utilizou DNA total; CN – controlo negativo de PCR; CP ₂ e CP ₃ – controlos positivos gentilmente cedidos pelo Dr. Delmotte do INRA. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (450 pb).....	58
Figura IV.6: – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene β -tubulina cujo fragmento tem aproximadamente 450 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 5 e 16 – amostras em que se utilizou DNA total; CN – controlo negativo de PCR; CP ₂ e CP ₃ – controlos positivos gentilmente cedidos pelo Dr. Delmotte do INRA. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (450 pb).....	59

- Figura IV.7:** – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene β -tubulina cujo fragmento tem aproximadamente 450 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 17, 19, 27, 41, 42, 43, 49, 52, 58 e 59 - amostras em que se utilizou DNA total; CN – controlo negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (450 pb). 60
- Figura IV.8:** – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene β -tubulina cujo fragmento tem aproximadamente 450 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 31, 57, 9, 11, 14, 53, 35, 4, 18, 55 e 41 - amostras em que se utilizou DNA total; CN – controlo negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (450 pb). 61
- Figura IV.9:** – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene β -tubulina cujo fragmento tem aproximadamente 450 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 22, 48, 17 e 41 – amostras em que se utilizou DNA total não diluído; 22_{/3}, 48_{/3}, 17_{/3} e 41_{/3} – amostras em que se utilizou DNA total em solução diluída 1:3 (v/v); 22_{/10}, 48_{/10}, 17_{/10} e 41_{/10} – amostras em que se utilizou DNA total em solução diluída 1:10 (v/v); CN – controlo negativo de PCR. 62
- Figura IV.10:** – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene β -tubulina cujo fragmento tem aproximadamente 450 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 1, 2, 3, 4 e 5 – amostras em que se utilizou DNA total em solução diluída 1:3 (v/v); CN – controlo negativo de PCR. 63
- Figura IV.11:** – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene β -tubulina cujo fragmento tem aproximadamente 450 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 1, 2, 3, 12, 13, 27, 35, 36, 39, 41, 52, 55 e 58 – amostras em que se utilizou DNA total em solução diluída 1:3 (v/v); CN – controlo negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (450 pb). 64
- Figura IV.12:** – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene β -tubulina cujo fragmento tem aproximadamente 450 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 17, 18, 43 e 52 - amostras. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (450 pb). 66
- Figura IV.13:** – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene β -tubulina cujo fragmento tem aproximadamente 450 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 41 - amostra. As setas indicam as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (281 pb e 168 pb). 67
- Figura IV.14:** – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene β -tubulina cujo fragmento tem aproximadamente 450 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 17, 18, 43 e 52 - amostras. As setas indicam as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (168 pb, 281 e 449 pb). 67
- Figura IV.15:** – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene *CYP51* cujo fragmento após amplificação é de 1756 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); CPA e CPB – controlos positivos gentilmente cedidos pela Dr^a. Marie-France Corio-Costet do INRA; 5, 6, 7, 17, 18, 35, 37, 41, 43, 52 e 53 - amostras; CN – controlo negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (1756 pb). 69

- Figura IV.16:** – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene *CYP51* cujo fragmento após amplificação é de 1756 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); CPB – controlo positivo gentilmente cedido pela Dr.^a Marie-France Corio-Costet do INRA; 49, 50, 51, 54, 55, 56, 57, 58, 59 e 60 - amostras; CN – controlo negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (1756 pb)..... 69
- Figura IV.17:** – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene *CYP51* cujo fragmento após amplificação é de 1756 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); CPB – controlo positivo gentilmente cedido pela Dr.^a Marie-France Corio-Costet do INRA; 25, 26, 27, 28, 29, e 30 - amostras; CN – controlo negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (1756 pb)..... 70
- Figura IV.18:** – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene *CYP51* cujo fragmento após amplificação é de 1756 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); CPB – controlo positivo gentilmente cedido pela Dr.^a Marie-France Corio-Costet do INRA; 37, 38, 39, 40, 42, 44, 45, 46 e 47 - amostras; CN – controlo negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (1756 pb)..... 70
- Figura IV.19:** – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene *CYP51* cujo fragmento após amplificação é de 1756 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); CPB – controlo positivo gentilmente cedido pela Dr.^a Marie-France Corio-Costet do INRA; 20, 21, 22, 23, 24, 31, 32, 34 e 36 - amostras; CN – controlo negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (1756 pb)..... 71
- Figura IV.20:** – Análise dos produtos amplificados por NAS-PCR, para amplificação de um fragmento com 476 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); CPA e CPB – controlos positivos gentilmente cedidos pela Dr.^a Marie-France Corio-Costet do INRA; 5, 6, 7, 17, 18, 41, 43, 52 e 53 - amostras; CN – controlo negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (476 pb)..... 72
- Figura IV.21:** – Análise dos produtos amplificados por PCR, para amplificação de um fragmento com 476 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); CPB – controlo positivo gentilmente cedido pela Prof. Marie-France Corio-Costet do INRA; 49, 50, 51, 54, 55, 56, 57, 58, 59 e 60 - amostras; CN – controlo negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (476 pb)..... 73
- Figura IV.22:** – Análise dos produtos amplificados por PCR, para amplificação de um fragmento com 476 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); CPB – controlo positivo gentilmente cedido pela Prof. Marie-France Corio-Costet do INRA; 37, 38, 39, 40, 42, 44, 45, 46 e 47 - amostras; CN – controlo negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (476 pb)..... 73

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO II.1: Resumo das substâncias activas de fungicidas anti-óidio permitidos comercializar actualmente em Portugal (S.A., 2010);.....	24
QUADRO II.2: Modos de acção das substâncias activas de fungicida anti-óidio (S.A. a partir da Internet: http://membres.multimania.fr/ipmvigne/Maladies/oidium.htm , 2010);.....	24
QUADRO III.1: Identificação de Amostras;.....	47
QUADRO IV.1: Quantificação de DNA das Amostras por Qubit™ Fluorometer (INVITROGEN);.....	56
QUADRO IV.2: Amostras em que se obteve amplificação do fragmento de 450pb do gene da β -tubulina.....	65
QUADRO IV.3: Amostras analisadas quanto ao grupo genético a que pertencem.....	68
QUADRO IV.4: Amostras em que se obteve amplificação do gene <i>CYP51</i> de <i>E. necator</i>	71
QUADRO IV.5: Resultados obtidos na análise dos isolados sensíveis e resistentes aos DMI's.....	74
QUADRO IV.6: Resumo dos resultados das amplificações realizadas ao gene da β -tubulina, e do <i>CYP51</i>	75

ABREVIATURAS GERAIS UTILIZADAS

CAPS – ‘Cleaved Amplified Polymorphic Sequence’

CYP51 - gene codificado 14 α -demetilase

D.M.I. - inibição de demetilação

DNA – ácido desoxiribonucleico

dNTPs – deoxinucleótidos trifosfatos

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

Entub - gene β - tubulina de *E. necator*

EPA - ‘Environmental Protection Agency’

E.U.A. – Estados Unidos da América

HR – humidade relativa

I.B.E. - inibição de biossíntese de esteróis

INRA – ‘Institute Scientifique de Recherche Agronomique’

NAS-PCR - ‘Nested Allele-Specific PCR’

RAPD - (‘Randomly Amplified Polymorphic DNA’)

pb – pares de bases

PCR –Reacção da Polimerase em Cadeia (‘Polymerase Chain Reaction’)

PCR-RFLP – PCR ‘Fragment Length Polymorphism’

PVP – polivinil pirrolidone

PVPP – polivinilpolipirrolidona

P-450_{14DM} - citocromo P-450 estero 14 α -demetilase

SNP – ‘single nucleotide polymorphism’

Taq – *Thermus aquaticus*

Tris – Tris (hidroximetil) aminometano

E. necator - *Erysiphe necator*

B. cinerea - *Botrytis cinerea*

E. graminis - *Erysiphe graminis*

Muscadinia rotundifolia. - *M. rotundifolia*

Kishmish vatkana - *K. vatkana*

V. vinífera – *Vitis Vinífera*

g – grama

°C – grau centígrado

h – horas

L – litro

> - maior que

± - mais ou menos

≤ - menor ou igual que

µm – micrómetros

µl – microlitro

mL – mililitro

mm – milímetro

mm² – milímetro quadrado

mM – milimolar

min. – minuto

% - por cento

rpm – rotações por minuto

seg. – segundo

v/v – volume/volume

Bases nucleotídicas:

A – Adenina

C – Citosina

G – Guanina

T – Timina

U - Uracilo

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas (ICAM) e do Departamento de Fitotecnia da Universidade de Évora, o qual me proporcionou todas as condições de trabalho experimental.

Para a realização deste trabalho foi importante todo o apoio e boa vontade que me foram dirigidos. Todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho um reconhecido, OBRIGADA! Assim, gostaria de agradecer:

À minha Orientadora, Professora Doutora Maria do Rosário Fernandes Félix, que sempre me apoio e incentivou neste projecto, sempre acreditando em mim, e sobretudo pela sua disponibilidade e amizade. A sua constante boa disposição e alegria no trabalho, fez-me superar diversos desafios e adversidades. Foi com enorme prazer que trabalhei consigo, e que recebi todos os ensinamentos que me transmitiu, bem como pela forma como me mostrou um mundo novo para mim, sobre a Biologia Molecular.

Ao meu Co-Orientador, Professor Yvon Bugaret, com quem aprendi tudo o que sei sobre viticultura e fitossanidade da vinha. Agradeço toda a amizade e disponibilidade a mim dirigidas ao longo destes anos que nos conhecemos, e neste meu projecto, o meu muito obrigada pelo forte apoio e incentivo.

Ao meu Co-Orientador, Eng.º Jorge Silva (BAYERCROPSCIENCE), responsável pelo delinear inicial deste projecto. Faço votos de que no futuro tenhamos oportunidades de trabalhar mais em conjunto, quer consigo, quer com a empresa que representa.

Ao Eng.º João Torres, pela sua enorme disponibilidade na recolha de amostras de campo. Sem a sua ajuda este projecto não teria sido possível. Um carinhoso e sentido muito obrigada.

Ao Eng.º Nuno Chegadinho da ATEVA e ao amigo Rui Flores, a quem agradeço também a disponibilidade pela recolha de algumas das amostras de campo.

À equipa do Laboratório de Virologia e do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Évora, Professora Maria Ivone Clara, Eng.^a Carla Varanda, D. Maria Mário Azedo, Dr.^a Ana Alexandre, Professora Solange Oliveira e Dr.^a Marta Laranjo, que em muito me ajudaram nas inúmeras tarefas de laboratório, bem como pela amizade, alegria e simpatia de todos os dias.

Ao Professor Fernando Rei, o meu muito obrigada pela sua disponibilidade no trabalho fotográfico desenvolvido sobre as amostras recolhidas no campo, em que se conseguiu recolher imagens lindíssimas do fungo.

Ao Eng.^o Luís Antunes (BAYERCROPSCIENCE), sempre disponível e pronto a ajudar nas minhas inúmeras solicitações e sobretudo pela simpatia e amizade demonstradas.

E por fim, um obrigada muito especial ao meu marido e aos meus pais pelo apoio incondicional em todas as horas, e ao meu pequenino filho, que acompanhou todo este processo desde o início da sua vida, e que teve o carinho enorme de me conceder algumas horas das suas brincadeiras, para que eu concluísse este meu projecto.

RESUMO

Contribuição para o estudo da Caracterização Molecular de isolados de *Erysiphe necator* nas Vinhas do Alentejo

Este trabalho é o primeiro a ser realizado em Portugal, no sentido de otimizar técnicas de caracterização molecular de isolados do fungo *Erysiphe necator* e no sentido abordar a evolução deste fungo numa das mais importantes regiões vitivinícolas do nosso País, o Alentejo.

Utilizaram-se 60 amostras de videiras infectadas com *E. necator*, provenientes de videiras de diferentes castas representativas do Alentejo.

A amplificação por PCR do fragmento de 450 pb do gene da β -tubulina foi conseguido em 11 amostras, tendo estas sido posteriormente sujeitas a análise CAPS para identificação dos grupos genéticos A e B. Destas 11 amostras, obtiveram-se 5 do grupo genético B, sendo 2 delas obtidas de 'drapeaux', e em 4 dessas amostras aparentam coexistir também isolados do grupo genético A.

Na análise por NAS-PCR, obteve-se um fragmento de 1756 pb que contém o gene *CYP51* em 9 amostras, mostrando 1 isolado sensível e 8 resistentes aos fungicidas DMI's. Apesar do baixo número de resultados obtidos, o facto da maioria dos isolados ser resistente aos DMI's pode ser um dado indicativo para a gestão dos tratamentos contra o oídio.

Palavras-chave: *Erysiphe necator*; Oídio; Vinha; Resistência aos DMI's; Grupo genético A e B.

ABSTRACT

Contribution for the study of Molecular Characterization of *Erysiphe necator* isolates in Alentejo vineyards

This work is the first one reported in Portugal, in the matter of optimization of molecular characterization techniques of *Erysiphe necator* isolates and in the approaching the evolution of this fungus in one of the most important wine region of our country, Alentejo.

We analyzed 60 *E. necator* infected samples collected from different grapevines in the Alentejo region. The PCR amplification of a 450 bp fragment from β -tubuline gene was obtained only in 11 of these samples, that were then subjected to CAPS analysis for identification of the different genetic groups, A and B. From those 11 samples, 5 belonged to B group, and 2 of those samples were obtained from 'flag shots'. Four of these 5 samples seem to have simultaneously isolates from the two genetic groups.

The amplification of the 1756 bp fragment that contain the *CYP51* gene was obtained only in 9 samples, but the NAS-PCR analysis was applied to all 60 samples. The obtained results show 1 sensitive isolate and 8 resistant isolates to DMI's fungicides. Although the low amount of results obtained, the majority are DMI's resistant, which indicate that attention is required in powdery mildew management.

Key words: *Erysiphe necator*; Powdery mildew; vineyards; DMI's resistance; genetic group A and B

I. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos as paisagens do Alentejo mudaram radicalmente de longas e extensas planícies cobertas pela plantação de cereais, passando a praticar-se a cultura da vinha. Para além da paisagem, as mudanças soci-económicas também decorreram a vários níveis. Neste sentido, e porque o investimento inicial por parte do viticultor é elevado, e este espera tirar partido desses custos de implantação durante, pelo menos, cerca de 25 anos da vida útil de uma vinha, é importante que as videiras sejam plantas saudáveis e capazes de frutificar para originar vinhos de qualidade. Todos os anos, o viticultor tenta assegurar a sanidade da vinha e das suas uvas, gerindo práticas culturais e aplicando produtos agro-químicos. Destes últimos, os produtos fitossanitários representam o maior custo por parte do viticultor, que não quer descuidar o bom estado sanitário das suas vinhas, pois sabe que se as suas videiras não forem saudáveis, não poderá produzir boas uvas para consumo em fresco ou produzir um bom vinho.

De entre as diversas doenças da vinha que o viticultor tem de gerir, encontra-se o oídio.

O oídio da vinha tornou-se, a nível mundial, a principal doença da viticultura (CORIO-COSTET, 2007). O seu organismo causal *Erysiphe necator* (sin. *Uncinula necator*) foi introduzido na Europa durante o século XIX, provindo da América do Norte em 1840, e rapidamente ocupou novas áreas geológicas propagando-se por toda a Europa (KISS, s.d.). Os profissionais da viticultura encontraram-se na obrigação de tratar e tentar controlar este fungo patogénico dependendo das variáveis condições meteorológicas favoráveis. Actualmente devido às alterações climáticas e ao mais que provado aquecimento do planeta, as zonas vitícolas temperadas arriscam-se a pressões parasitárias cada vez mais fortes por parte dos microorganismos, em especial do fungo *E. necator*, sendo que, as condições de tempo quente e seco favorecem o seu desenvolvimento (CORIO-COSTET, 2007). Conhecer melhor este patógeno e saber como o controlar, são necessidades que se impõe para bem do futuro da viticultura.

Em Portugal ainda não existem estudos aprofundados acerca dos grupos genéticos de *E. necator* existentes nas nossas vinhas. Se por um lado, pelos artigos estudados, e até porque em alguns deles existiam cepas provenientes de Portugal, tudo indica que a

similaridade dos grupos genéticos A e B seja igual em toda a Europa, como estarão as nossas vinhas quanto à resistência aos I.B.E.s.? Teremos *E. necator* maioritariamente sensíveis ou resistentes? Obviamente os resultados terão repercussão quanto à gestão dos tratamentos ao longo da campanha vitícola, e sobretudo, na escolha dos fungicidas a usar.

Com este trabalho pretende-se dar um contributo inicial para o melhor conhecimento molecular de isolados do fungo *E. necator*, obtidos de videiras na Região do Alentejo, nomeadamente identificar os grupos genéticos, A ou B, presentes nas vinhas desta região e verificar a altura do ano em que predominam. Paralelamente, com este trabalho, também nos propomos a identificar isolados com sensibilidade ou resistência aos fungicidas que contenham substâncias inibidoras da demetilação (DMI's), verificar quais as castas mais sensíveis e época do ano em que ocorre o aparecimento desses isolados.

2. O Organismo Causal

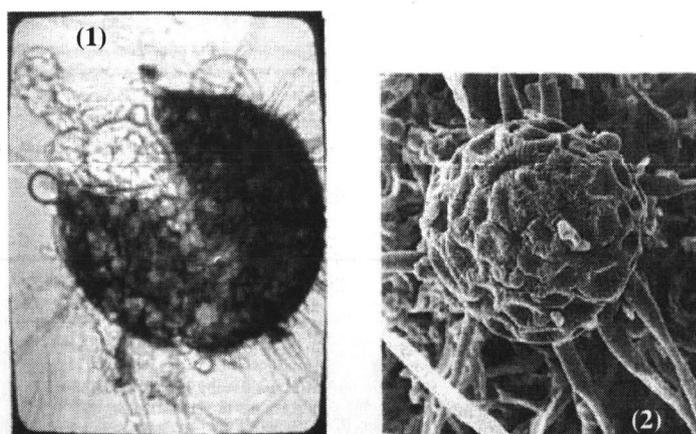
Os oídios de várias culturas são causados por muitas espécies de fungos diferentes pertencentes ao grupo dos *Ascomycetes* filamentosos e a diferentes géneros da ordem *Erysiphales*. Estes géneros são distinguíveis uns dos outros pelo número (1 versus vários) de ascos por cleistoteca e pela morfologia do crescimento das hifas dos apêndices, fora da parede da cleistoteca (AGRIOS, 2005 e HOFFMAN *et al.*, 2007).

O fungo causador do oídio na videira foi descoberto por Schweinitz na América do Norte no ano de 1834 ao qual dado o nome de *Erysiphe necator*, (sins. *Uncinula necator* Schw., *E. tuckeri* Berk., *U. americana* Howe, *U. spiralis* Berk. & Curt., *U. subfusca* Berk. & Curt.; anamorfo *Oidium tuckeri* Berk.) (GOHEEN *et al.*, 2001). A doença causava danos sem importância nas videiras nativas americanas e não adquiriu notoriedade até 1845, ano em que foi observada pela primeira vez na Inglaterra. É um parasita obrigatório nos géneros da família *Vitaceae* *Ampelopsis*, *Cissus*, *Parthenocissus* e *Vitis* (GOHEEN *et al.*, 2001). Hoje em dia podemos encontrar esta doença na maioria de todas as regiões vitícolas do mundo. Quando não é controlado, o oídio reduz a colheita e afecta a sua qualidade, para além de reduzir a capacidade de crescimento vegetativo da planta e a sua resistência ao frio de Inverno (GOHEEN *et al.*, 2001).

O micélio do fungo *E. necator* é constituído por hifas hialinas de 4 a 5 µm de diâmetro, superficiais mas semipersistentes e septadas (GOHEEN *et al.*, 2001). A infecção começa com a germinação dos conídeos na epiderme, formando-se em primeiro lugar o apressório multilobulado. O fungo rompe a parede celular das células epidérmicas com a penetração de um órgão, que emerge a partir do apressório. (HOFFMAN *et al.*, 2007). Depois da penetração na cutícula e na membrana celular, forma-se dentro da célula epidérmica um órgão de alimentação - haustório globuloso (GOHEEN *et al.*, 2001), que se torna intimamente associado com a membrana plasmática do hospedeiro. Os nutrientes são absorvidos pelo haustório que os utiliza para se desenvolver e formar hifas. A hifa alonga-se e desenvolve outros apressórios e outros haustórios, dando lugar á formação de conifióforos e posteriormente conídios. Estes esporos são os responsáveis pela repetição da doença por via assexuada, e subsequente aparecimento de contaminações secundárias. A formação de um primeiro haustório funcional bem sucedida é o principal requisito para o fungo se instale e possa entrar nas subseqüentes fases de desenvolvimento (HOFFMAN *et al.*, 2007).

Na hifa prostrada forma-se conidióforos multiseptados, com 10 a 400 μm de comprimento, em intervalos frequentes e perpendiculares. Os esporos são conídios hialinos e cilindro-ovoides, que medem 27-47 x 14-21 μm , e que se agrupam-se em cadeias. O conídio mais antigo encontra-se no extremo distal da cadeia. Em condições de campo, as cadeias são muito curtas, com 3 a 5 conídios (GOHEEN *et al.*, 2001).

As cleistotecas (FIG(S). II.1 e II.2) são formadas por fusão de hifas de diferente sexo (reprodução sexuada), apresentam um corpo esférico globuloso com 70 a 130 μm de diâmetro quando totalmente desenvolvido e podem encontrar-se na superfície de todas as partes infectadas do hospedeiro (S.A., a partir da internet: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm, 2010). As cleistotecas têm apêndices largos, flexíveis e multiseptados que têm uma curvatura característica no ápice quando maturam (GOHEEN *et al.*, 2001). As cleistotecas mudam de cor hialina para amarelo, e depois para castanho-escuro a preto à medida que amadurecem. A parede externa da cleistoteca é constituída por 3 a 4 camadas de células. No caso de *E. necator*, contêm 4 a 6 ascos (raras vezes mais) que têm forma de ovada a subglobosa e medem 50-60 x 25-40 μm . Os ascos contêm de 4 a 7 ascósporos hialinos (sendo o mais frequente 4 na maturação), ovados ou elipsóides e medem 15-25 x 10-14 μm . De forma parecida aos conídios, germinam com um ou mais curtos tubos germinativos, rapidamente formando, cada um, um apressório multilobulado (GOHEEN *et al.*, 2001).



FIG(S). II.1 e 2 – Fotos de cleistotecas de *E. necator*. (1) observação ao microscópio óptico; (2) observação ao microscópio electrónico (FOTOS: a partir do site: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm, 2010);

Os isolados deste ascomiceta causador do oídio na vinha, *E. necator*, dividem-se em dois grupos genéticos diferenciados (A e B) que coexistem no mesmo hospedeiro (MONTARRY *et al.*, 2008).

Existem vários exemplos bem documentados de populações de patógenos das plantas que podem ser diferenciados geneticamente em completa ou parcial reprodução isolada, incluindo *Leptosphaeria maculans* (WILLIAMS e FITT, 1999), *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (LEBRETON *et al.*, 2004), *Botrytis cinerea* (FOURNIER *et al.* 2005), e *E. syringae* (SEKO *et al.* 2008). A descoberta de existência de diferenciação genética, mas morfológicamente indistinguíveis, levanta questões importantes acerca da coexistência destas espécies. De acordo com a teoria da competição, duas espécies ocupando o mesmo nicho ecológico não podem coexistir indefinidamente. Esta teoria, levou à sugestão, de que algumas espécies podem coexistir num nicho de modo fraccionado, apesar dos seus elevados graus de afinidade fenotípica. Para subgrupos do patógeno da planta, coexistir no mesmo hospedeiro (isto é, na mesma fonte), as diferenças ecológicas que conduzem a um nicho fraccionado, podem resultar numa separação espacial e/ou temporal destes subgrupos (MONTARRY *et al.*, 2008).

E. necator providencia um bom modelo para investigar os efeitos das estruturas genéticas dos patógenos das plantas. Durante a epidemia, populações deste fungo estão estruturadas em dois grupos genéticos diferenciados (A e B) que foram previamente identificados num número considerável de países vitícolas, incluindo França, Austrália, Itália, e Espanha (MONTARRY *et al.*, 2008). DÉLYE *et al.* ([1] - 1997) sugerem que os isolados do grupo A, sobrevivem ao Inverno na forma de micélio nos gomos dormentes, e que o seu desenvolvimento é reactivado após a rebentação, levando à colonização dos jovens rebentos – ‘drapeaux’; em contraste, os isolados do grupo B, são originários de ascósporos libertados pelas cleistotecas após o fim do Inverno. Foi também encontrada uma associação entre os sintomas em ‘drapeaux’ e uma infecção com isolados do grupo A (AMRANI e CORIO-COSTET, 2006). Contudo, a associação entre o grupo genético e a estratégia pós Invernal indica que os sintomas em ‘drapeaux’ podem ser causados por ambos os grupos genéticos (CORTESI *et al.*, 2005). Comparações entre os graus de agressividade dos diferentes grupos genéticos de *E. necator*, conduziram a resultados parcialmente conflituosos. Assim: PÉROS *et al.* em 2006, reportaram que o índice de infecção, isto é, a proporção de lesões por esporulação geradas por inoculação local, eram mais baixas, e que o diâmetro da lesão era inferior para isolados do grupo genético A, do que para isolados do grupo B. Contudo, WILLOCQUET *et al.* em 2007, descobriram que os isolados do grupo B eram mais agressivos que os isolados do grupo A para certas características tais como, o rácio da germinação e eficiência da infecção. O oposto era verificado para outras características tais como, o período de latência, o diâmetro da lesão e a intensidade da esporulação.

As frequências dos grupos genéticos de *E. necator* varia consideravelmente ao longo das vinhas, e os dois grupos podem coexistir na mesma vinha. Os isolados do grupo A, encontram-se presentes no início do crescimento vegetativo da planta, desaparecendo ao longo do percurso do ciclo epidémico. Por outro lado, os isolados do grupo B encontram-se presentes ao longo de todo o ciclo epidémico. Desta forma, estas observações sugerem que a reprodução sexuada de *E. necator* (formação de cleistotecas) envolve apenas isolados do grupo B. Esta descoberta sugere que a manutenção de uma elevada diferenciação da estrutura genética em populações de *E. necator*, pode resultar a partir de um isolamento temporal de grupo genéticos. O isolamento temporal dos grupos genéticos mostrou que desta forma se previne a recombinação entre os isolados do grupo A e B, importante para a manutenção das estruturas genéticas altamente diferenciadas em populações de *E. necator* (MONTARRY *et al.*, 2008). STUMMER e SCOTT, em 2003, realizaram estudos que demonstraram existir infertilidade entre estes grupos em experiências controladas de cruzamento.

De um ponto de vista evolutivo, esta diferença numa estratégia de sobrevivência entre os dois grupos genéticos deveria conferir uma vantagem aos isolados do grupo B, uma vez que estes isolados beneficiam de ambos os tipos de reprodução clonal e sexuada. A presença a longo termo dos isolados do grupo A levanta questões acerca da competição entre os grupos genéticos de *E. necator* para infecção dos rebentos no início da estação da rebentação (MONTARRY *et al.*, 2008).

O padrão temporal existente, pode por sua vez resultar a partir de diferenças a nível de agressividade entre isolados dos diferentes grupos genéticos. A comparação das características da história de vida que determinam a agressividade entre os dois grupos genéticos, mostrou que o grupo A era menos agressivo que o grupo B em termos de rácio de germinação e eficiência de infecção. O grupo A demonstrou ser mais agressivo que o grupo B em termos de período de latência, diâmetro da lesão, e número de esporos por lesão. Desta forma, as características de agressividade de *E. necator* podem ser classificadas em dois grupos independentes: um primeiro grupo incluindo variáveis monocíclicas associadas com a infecção (o rácio da germinação e a eficiência da infecção) e um segundo grupo incluindo variáveis associadas com processos epidemiológicos seguindo a infecção (período de latência, produção de esporos e tamanho da lesão). Na epidemia do oídio, os dois grupos genéticos podem adoptar diferentes estratégias ecológicas para colonizar e usar a mesma fonte. Isolados do grupo genético A produzem um grande número de conídios com baixa eficiência de infecção, contudo isolados do grupo genético B produzem um reduzido número de conídios com uma eficiência de

infecção elevada. De um ponto de vista ecológico, os isolados do grupo A podem ser considerados como tendo uma estratégia de vida como sendo invasores do nicho ecológico, enquanto isolados do grupo B têm uma estratégia de vida como competidores, ocupando nichos. Este padrão é consistente com as observações em isolados do grupo A em que se encontravam mais activos no início do período vegetativo da planta, desaparecendo subseqüentemente, e neste aspecto, a frequência dos isolados do grupo B aumentava ao longo do tempo (MONTARRY *et al.*, 2008).

A agressividade entre os dois grupos genéticos não aumenta ao longo do decurso da epidemia. Este resultado contrasta com aqueles obtidos previamente para outros fungos patogénicos das plantas. VILLAREAL e LANNOU demonstraram, em 2000, que uma selecção direccionada para um aumento de agressividade tomou lugar em populações de *E. graminis* e de *Phytophthora infestans*, durante o ciclo epidémico. Alguns fungos patogénicos das plantas alternam a sua agressividade, nas suas diferentes fases de vida. Outros fungos, como a *Mycosphaerella graminicola* (COWGER e MUNDT, 2002) e *E. necator*, permanecem estáveis quanto á sua agressividade.

O isolamento temporal dos grupos genéticos de populações de *E. necator* não explica contudo a predominância do grupo A no início do período vegetativo. Contudo, os resultados apresentados por MONTARRY *et al.*, 2008, mostraram que o desaparecimento dos isolados do grupo A durante a epidemia não estava associada a um efeito de aplicação de fungicida, conforme se observou nas amostras que foram colhidas de locais não tratados. A data dos componentes de agressividade mostrou que as diferenças numéricas entre os grupos genéticos eram pequenas e potencialmente insuficientes para serem tidas em conta, no que respeita ao desaparecimento dos isolados do grupo A durante o ciclo epidémico. Segundo FICKE *et al.*, 2002, este mecanismo de aparente desaparecimento dos isolados do grupo A pode envolver os efeitos de temperatura e/ou a resistência ontogénica das folhas.

As estratégias de sobrevivência dos isolados do grupo A e B parecem ter maiores consequências para o subseqüente desenvolvimento da doença e sua severidade. O grau de severidade da doença é mais elevada, em folhas ou bagos, nas vinhas em que a frequência dos isolados do grupo B aumenta mais rapidamente, sugerindo uma associação entre o nível doença e a frequência dos grupos genéticos, no início do período vegetativo da planta. Os danos encontrados são maiores naqueles em que a epidemia começou com isolados do grupo B (MONTARRY *et al.*, 2008).

3. Ciclo Biológico

E. necator pode hibernar como hifas no interior dos gomos dormentes ou como cleistotecas na superfície dos sarmentos da cepa e nos restos de material vegetal caídos no solo, folhas e restos de podas. No Inverno ou em climas tropicais, os micélios e os conídios podem sobreviver a uma ou outra estação nos tecidos dos órgãos verdes presentes na planta (GOHEEN *et al.*, 2001).

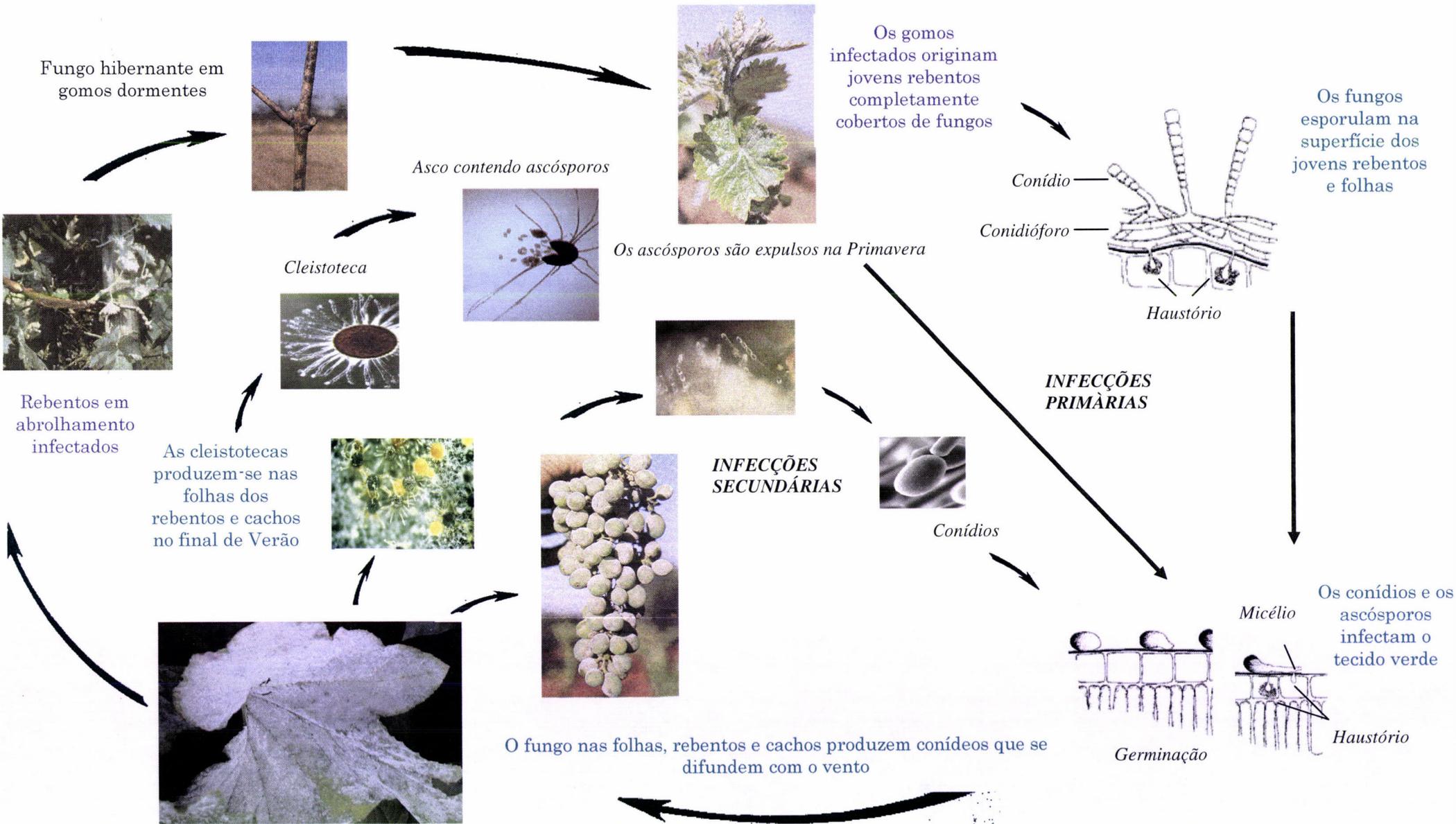
O fungo *E. necator* pode reproduzir-se de duas maneiras diferentes: via sexuada e via assexuada.

Por via sexuada: Nas regiões vitícolas em que as cleistotecas (forma de conservação Invernal) são uma fonte importante de inoculo primário, podem-se observar as primeiras infecções como colónias individuais na superfície das folhas que crescem envoltos no ritidoma. Os rebentos que se desenvolvem envoltos no ritidoma, isto é, os rebentos do pé da videira vulgarmente chamados de ladrões, são frequentemente os primeiros a infectar-se, presumivelmente porque estão perto das cleistotecas que ficaram agarradas às fendas do ritidoma, depois de terem sido arrastadas desde as folhas, sarmentos e pedicéolos dos cachos das uvas, por chuvas outonais (GOHEEN *et al.*, 2001). Na Primavera, com temperaturas superiores a 11°C (S.A., a partir do site: <http://membres.multimania.fr/ipmvigne/Maladies/oidium.htm>, 2010), as cleistotecas rasgam-se ao serem humedecidas pela chuva e libertam os ascósporos (GOHEEN *et al.*, 2001) responsáveis pelas infecções primárias (S.A., a partir do site: <http://membres.multimania.fr/ipmvigne/Maladies/oidium.htm>, 2010). Estes germinam e infectam os tecidos verdes, formando colónias que produzem conídios como disseminação secundária (GOHEEN *et al.*, 2001).

Por via assexuada: No abrolhamento, os gomos são infectados durante o início do período de crescimento. O fungo desenvolve-se dentro do gomo, onde permanece em estado latente no interior das escamas do gomo até à estação seguinte. Pouco tempo depois do abrolhamento, o fungo é reactivado e cobre o rebento com micélio branco. Os conídios produzem-se abundantemente nestes jovens rebentos infectados, chamados de rebentos indicadores ('drapeaux') e são rapidamente disseminados pelo vento e pela água para os órgãos vizinhos (GOHEEN *et al.*, 2001).

A figura seguinte (FIG. II.3) esquematiza a interacção do desenvolvimento do fungo *E. necator* ao longo da sua epidemia, com a planta – videira.

Fig. II.3: Ciclo Biológico do Oídio (adaptado de AGRIOS, 2005; GOHEEN *et al.*, 2001; SILVA, 2008 e S.A., 1998);



Na maioria das regiões vitícolas, o fungo produz nas suas estruturas sexuais, cleistotecas na superfície dos órgãos vegetais infectados, folhas, pâmpanos e ramos, durante a última parte do período de crescimento vegetativo (GOHEEN *et al.*, 2001 e S.A., 1998). Nos trópicos, onde a vegetação é contínua, o micélio permanece activo ao longo do ano e é produzido sem interrupção (S.A. a partir da Internet: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm, 2010).

4. Sintomas e Desenvolvimento do Oídio na Videira

Os sintomas sobre os diversos órgãos da planta varia em função do período do ano e portanto da fase do estado vegetativo da videira.

1) Jovens rebentos de gomos infectados no ano anterior ('drapeaux');

Todas as superfícies das pequenas folhas são sensíveis à infecção. O jovem rebento apresenta um aspecto branco acinzentado pulverulento que corresponde à presença do micélio. As folhas jovens, ainda em desenvolvimento, quando infectadas ficam em tensão, atrofiam, deformam-se, e o crescimento dos ramos é retardado (**FIG. II.4**) (S.A. a partir da Internet: <http://membres.multimania.fr/>, 2010).

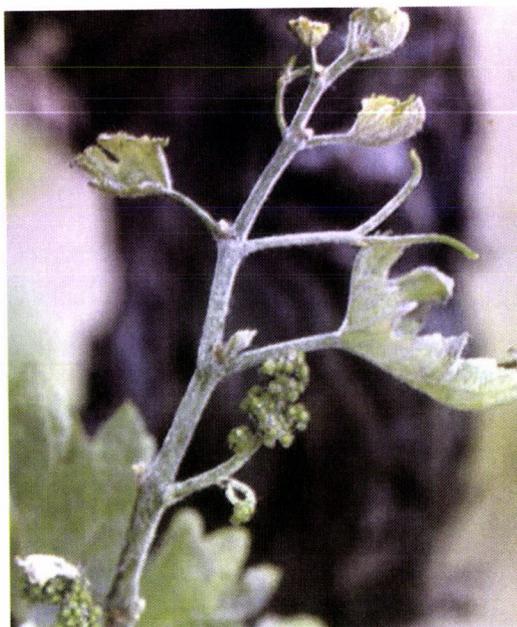


FIG. II.4 – Foto de um ‘drapeau’ com sintomatologia de Oídio (FOTO: YVON BUGARET);

2) Inflorescências;

Apresentam um aspecto seco e pulverulento com um pó branco fino (**FIG. II.5**), oleoso ao toque, transformando-se rapidamente em acinzentado, com um granuloso. Ao microscópio, destacam-se facilmente os conidióforos e são visíveis inúmeros conídios (S.A. a partir da Internet: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm, 2010).



FIG. II.5 – Foto de uma inflorescência com sintomatologia de Oídio (FOTO: a partir do site: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm, 2010);

3) Nas Folhas;

A presença de micélio com as estruturas reprodutivas assexuadas conidióforos e conídios na superfície do tecido hospedeiro, confere um aspecto branco acinzentado pulverulento (**FIG. II.6**). Ambas as superfícies das folhas são sensíveis à infecção. Por vezes na página superior das folhas infectadas aparecem manchas cloróticas brilhantes parecidas às vulgarmente chamadas “manchas de óleo” do míldio (GOHEEN *et al.*, 2001). No final do Verão as estruturas de resistência, cleistotecas, começam a colonizar as folhas infectadas (**FIG. II.7**).



FIG. II.6 e 7 – Fotos de páginas superiores de folhas de videira. **(6)** deformada pelo ataque de Oídio; **(7)** com formação de cleistotecas no final do Verão (FOTOS: YVON BUGARET);

4) Nos Bagos;

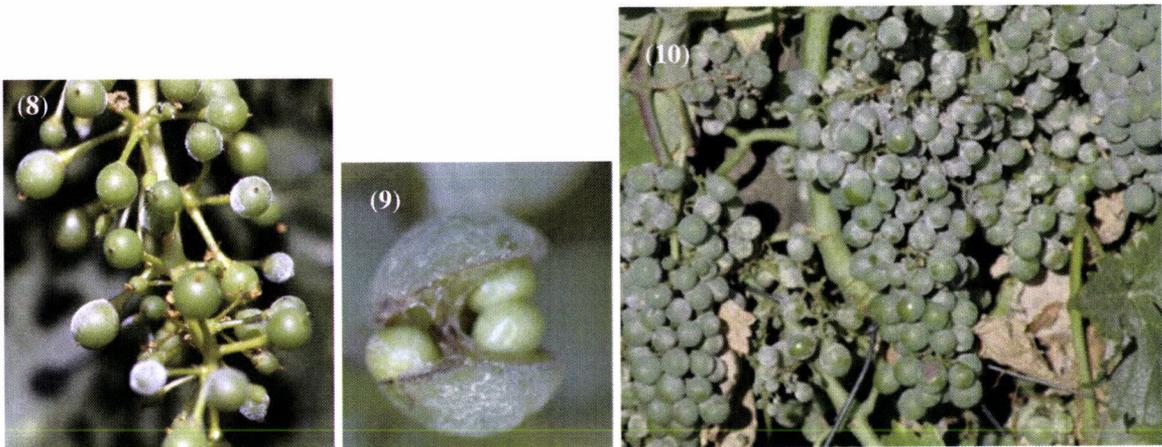
Os bagos são sensíveis à infecção (**FIG. II.10**) até que o seu conteúdo em açúcares seja aproximadamente de 8%, podendo no caso de infecções já estabelecidas, continuar a produzir-se esporos até atingir os 15% (GOHEEN *et al.*, 2001).

No estado fenológico bago de ervilha (**FIG. II.8**), quando contaminados, os pequenos bagos apresentam rugas, murcham e geralmente caem perdendo-se toda a colheita (S.A. a partir da Internet: http://www.muller-koerberle.fr/odidium_2.htm, 2010).

Se os bagos são infectados antes de alcançar o seu tamanho definitivo, as células epidérmicas morrem, impedindo o crescimento da epiderme. Por seu lado, como a polpa continua a desenvolver-se, a película rasga-se devido à pressão interna (**FIG. II.9**). Os bagos com películas quebradas desidratam ou apodrecem sendo frequentemente infectados pelo fungo *B. cinerea* (GOHEEN *et al.*, 2001). Um ataque provocado pelo fungo *B. cinerea* pode também ocasionar uma grande perda na colheita. Para além disso, quando aparece por altura do pintor, provoca uma diminuição na qualidade os futuros vinhos devido à degradação das matérias corantes, destruição da película que contém os precursores responsáveis pela qualidade aromática, aumenta a fixação do SO₂ nos vinhos e aumenta acidez volátil (S.A., 1998).

Na fase do pintor, quando os bagos das castas tintas são infectados por *E. necator*, não adquirirão a cor que lhes é própria. Na superfície dos bagos infectados, podem observar-se cicatrizes que adquirem um aspecto em forma de

malha. No caso de uva de mesa, esta torna-se incomercializável, e na uva para vinho vai originar características gustativas desagradáveis (GOHEEN *et al.*, 2001).



FIG(S). II.8, 9 e 10 – Fotos de bagos de uvas com sintomatologia de Oídio.; **(8)** ao estado fenológico de bago de ervilha; **(9)** ruptura dos bagos; **(10)** ao estado fenológico de fecho dos cachos (FOTOS: YVON BUGARET);

5) Nos Ramos;

Os pecíolos e os pedicéolos do ramo são sensíveis à infecção durante o período de crescimento vegetativo (GOHEEN *et al.*, 2001).

Durante a Primavera, os ramos são parasitados principalmente por pequenas manchas brancas que vão crescer com a extensão do micélio, tornando-se confluentes e formando grandes manchas que cobrem toda a superfície do ramo, tendo um aspecto cinzento azulado ou cinza (**FIG. II.11**) (S.A. a partir da Internet: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm, 2010). Uma vez infectados tornam-se quebradiços e podem facilmente partir-se à medida que decorre o período vegetativo (GOHEEN *et al.*, 2001). A infecção dos ramos antes ou imediatamente após a floração pode originar uma perda considerável na colheita. A parte superior dos ramos pode ser totalmente contaminada e as folhas jovens tornam-se atrofiadas (S.A. a partir da Internet: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm, 2010).



FIG. II.11 – Foto de um ramo com sintomatologia de Oídio na Primavera (FOTO: a partir do site: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm, 2010);

Antes do atempamento, nos pâmpanos infectados, aparecem manchas pulverulentas de cor castanha escuro a negras (**FIG. II.12**), que, mais tarde, aparecem castanho arroxeadas na superfície dos sarmentos durante a fase de repouso vegetativo (**FIG. II.13**). Neste período apenas se podem encontrar resíduos de fragmentos de hifas colapsadas (GOHEEN *et al.*, 2001).

Os ataques fortes originam um mau atempamento dos sarmentos, com a consequente diminuição da acumulação de reservas nos gomos (GOHEEN *et al.*, 2001 e S.A., 1998). Os gomos dormentes destes ramos contêm em si o micélio em estado latente, que se irá desenvolver na Primavera seguinte (S.A. a partir da Internet: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm, 2010).



FIG. II.12 – Foto de ramo de videira com sintomatologia de Oídio (FOTO: YVON BUGARET)



FIG. II.13 – Foto de um ramo com sintomatologia de Oídio no Outono (FOTO: a partir do site: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm, 2010);

O processo de contaminação da planta é dado por uma contaminação inicial – primária, e subsequentemente a partir desta dão-se uma série de contaminações em cadeia – secundárias.

A contaminação primária caracteriza-se pela seguinte sintomatologia: manchas oleosas na superfície da página superior das folhas, sendo facilmente confundido com a sintomatologia do míldio, escurecimento das nervuras na página inferior da folha e, aparecimento de manchas branca-acinzentadas e pulverulentas na superfície das folhas (S.A., a partir do site: <http://membres.multimania.fr/ipmvigne/Maladies/oidium.htm>, 2010).

As contaminações secundárias decorrem no período de Maio a Agosto. Caracterizam-se pela seguinte sintomatologia: leve contracção e crispação da folhagem e aparecimento de zonas pulverulentas de cor branca-acinzentada na parte inferior da planta. Em Agosto, a vinha aparenta uma tonalidade cinza clara na superfície das folhas (S.A., a partir do site: <http://membres.multimania.fr/ipmvigne/Maladies/oidium.htm>, 2010).

O retardar o desenvolvimento dos órgãos afectados devido á diminuição da actividade fotossintética, a destruição dos bagos e cachos, e consequentes perdas significativas de rendimento, são os principais danos provocados na videira, quando esta é atacada pelo oídio (S.A., a partir do site: <http://membres.multimania.fr/ipmvigne/Maladies/oidium.htm>, 2010).

5. Factores Ambientais que afectam o Desenvolvimento e a Propagação do fungo *E. necator*

Os efeitos dos factores ambientais na sobrevivência e germinação dos conídeos e no desenvolvimento da doença têm sido objecto de amplos estudos. A temperatura, a humidade e a luz, são os factores climáticos que condicionam o desenvolvimento do fungo (GOHEEN *et al.*, 2001 e S.A., 1998).

5.1 Temperatura

A temperatura parece ser o parâmetro ambiental mais limitante para o desenvolvimento do fungo. Temperaturas perto dos 15°C começam a ser favoráveis para o início do desenvolvimento vegetativo da planta, e ao mesmo tempo, também para a propagação do fungo, sendo as temperaturas de 20-28°C consideradas óptimas para a infecção e desenvolvimento da doença, embora, no entanto, o crescimento do fungo possa produzir-se desde os 6 até os 32°C. As temperaturas acima dos 35°C inibem a germinação dos conídios e acima dos 40°C estes morrem (GOHEEN *et al.*, 2001 e S.A., 1998). O fungo é destruído aos 45°C, o que explica a estagnação do seu desenvolvimento nos trópicos e nos ramos em contacto com o solo (S.A. a partir da Internet: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm, 2010). A 25°C, os conídios germinam em aproximadamente 5 horas. Existem estudos que demonstram que a 23-30°C o tempo decorrido desde a inoculação até à esporulação pode ser tão curto como de 5 a 6 dias, sendo a 7°C superior a 32 dias. Há também registos que as colónias de oídio morrem depois de serem expostas a 36°C durante 10 horas ou a 39°C durante 6 horas (GOHEEN *et al.*, 2001 e S.A., 1998).

JAILLOUX *et al.* (1999) durante 5 anos consecutivos (de 1993 a 1997) seguiram a projecção dos ascósporos de *E. necator* em campos vitícolas da região de Bordéus. Os ascósporos começavam a ser libertados após a rebentação da planta e esteve sempre associada a períodos de pluviosidade superiores a 2 mm, com um tempo de humedecimento de no mínimo 2,5 h e uma temperatura média geralmente acima dos 11°C. As temperaturas médias acumuladas diurnas, depois de 1 de Novembro, até à libertação dos ascósporos foi superior a 1100°C. Não foi observada uma relação entre a precocidade, número de ascósporos libertados, e severidade da doença em videiras da casta estudada – ‘Merlot’. A infecção primária não pareceu ser determinante para o desenvolvimento da

população de oídio. Por outro lado, as condições climáticas do mês de Abril (pluviometria e temperatura) parecem influenciar fortemente a severidade da doença nos bagos, possibilitando a instalação do parasita nas folhas. As informações recolhidas neste estudo, poderão servir de grande utilidade para determinar o posicionamento temporal da primeira intervenção anti-oídio na vinha, em função das condições climáticas.

5.2 Humidade

A humidade ambiental também é um factor determinante no desenvolvimento da doença, embora em menor grau que a temperatura. A água corrente, por exemplo da chuva, produz uma germinação pobre e anormal dos conídios, assim como no rebentamento dos mesmos, devido presumivelmente à excessiva pressão de turgescência. A chuva pode ser prejudicial para o desenvolvimento da doença já que arrasta os conídios e desorganiza o micélio. A humidade atmosférica compreendida dentro dos valores de 40 a 100% de humidade relativa, é suficiente para a germinação dos conídios e para a infecção, existem também dados que referenciam a germinação a menos de 20% de humidade relativa (GOHEEN *et al.*, 2001 e S.A., 1998). Segundo alguns autores, a humidade influi mais a esporulação do que a germinação. Por exemplo, comprovou-se que se formou 2, 3 e 4 ou 5 conídios durante 24 h a 30-40, 60-70 e 90-100% de humidade relativa, respectivamente.

Os efeitos da humidade no desenvolvimento do oídio na vinha, e na germinação dos conídios de *E. necator* 'in vitro', foram examinados em estudos realizados em 2003 por CARROL e WILCOX. Estes estudos conduzidos a uma temperatura óptima de 25°C ± 2°C concluíram que a presença da doença em folhas era afectada pelos níveis de humidade relativa (HR) entre 39 e 98%. A incidência e severidade da doença aumentaram com o aumento da humidade até um óptimo de 85% de HR, decrescendo perante valores superiores de HR. A densidade dos conídios era também proporcional ao aumento da HR, embora a sua influência não fosse tão demarcada. Com estes estudos, demonstrou-se uma forte relação entre os níveis de humidade e a frequência da germinação dos conídios, para valores de HR ≤ 84%. Contudo, a frequência de germinação decrescia perante valores de HR > 87%. Assim, a humidade parece ter um papel relevante na epidemiologia do oídio, confirmando os benefícios das práticas culturais que evitam a presença de humidades elevadas na canóplia da videira

5.3 Vento

O vento tem um efeito favorável no sentido de garantir a disseminação de conídios (S.A. a partir da Internet: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm, 2010).

FALACY *et al.* (2007) realizou ensaios usando PCR ('Polymerase Chain Reaction') e 'primers' específicos para diferenciar o fungo *E. necator*, de outros fungos comuns, a partir de amostras do ar no Norte dos E.U.A., em locais onde existiam vinhas. Na fase de dormência da planta, ou em períodos em que o desenvolvimento da vinha estava activo mas o fungo *E. necator* permanecia dormente, não foram obtidas amplificações, ou seja, não existia nas amostras de ar a presença deste patogéne. Contudo, durante a época sazonal em que ocorria libertação de ascósporos, causada por períodos de precipitação, entre os estados fenológicos da videira, da rebentação até à floração, os resultados das amplificações por PCR deram positivos, indicando assim a presença deste fungo nas amostras de ar. Os mesmos autores, verificaram simultaneamente por observações realizadas ao microscópio, que ao fim de 7 a 11 dias após a libertação dos ascósporos, aparecia a presença de sintomas de oídio na vinha. Os resultados deste estudo representam sobretudo um passo inicial, no sentido de criar modelos previsionais para o aparecimento do oídio.

5.4 Luz

Quanto à luminosidade, vários estudos referem que, a luz baixa e difusa favorece o desenvolvimento da doença (GOHEEN *et al.*, 2001). Existem mesmo dados de que a luz do sol brilhante inibe a germinação dos conídios (S.A., 1998). GOHEEN *et al.*, (2001) verificaram, por exemplo, que a germinação dos conídeos foi de 47% com luz difusa e somente de 16% com luz solar.

6. Estratégias de Controlo e Meios de Protecção contra o Oídio da Videira

6.1 Técnicas de Cultivo

As técnicas de cultivo podem reduzir a severidade da doença e aumentar a efectividade do controlo químico. É benéfico estabelecer a plantação da vinha em zonas com bom arejamento, assim como boa exposição solar e adequada orientação das linhas. O emprego de sistemas de condução que permitem uma boa circulação do ar através da vegetação da copa e impedindo o excesso de sombra é também muito benéfico. Uma copa vegetativa aberta não só mantém um microclima menos favorável para o desenvolvimento da doença, com também permite uma melhor penetração dos fungicidas (GOHEEN *et al.*, 2001).

Os tratamentos fitossanitários devem ser efectuados com maquinaria adequada, cobrindo bem toda a vegetação e em especial os ramos, empregando volumes adequados de calda a cada tratamento. Em plantações vigorosas é aconselhável fazer poda em verde para facilitar a penetração dos produtos (S.A., 1998).

6.2 Plantação de Novas Espécies de *Vitis*

A sensibilidade das espécies de *Vitis* é altamente variável e é determinada pelo número e extensão das manchas, e também pela extensão do dano provocado pelo fungo. As causas da resistência são muitas e algumas ainda mal compreendidas. De entre elas destacam-se a necrose dos apressórios e a resistência à necrose das células do hospedeiro. Pensa-se também que há resistências por causas relacionadas com a acção da nutrição fisiológica do parasita, ou razões ordem botânica, como é o caso da influência da vilosidade das folhas com o seu aspecto lanoso na Primavera, formando como que uma barreira à penetração dos haustórios (S.A. a partir da Internet: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm, 2010).

As espécies americanas são geralmente resistentes, outras são um pouco sensíveis. Em videiras europeias, existem diferenças na sensibilidade da espécie *V. vinifera*: ‘Carignan’, ‘Chardonnay’, ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Cabernet Franc’, entre outras são

consideradas espécies muito sensíveis; 'Pinot', 'Semillon', 'Syrah', entre outras são consideradas pouco sensíveis (S.A. a partir da Internet: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm, 2010).

As fontes naturais de doenças de resistência são normalmente encontradas em localizações geográficas onde as populações de patógenos e plantas evoluem em conjunto. Paralelamente à viticultura, as bases genéticas de resistência ao oídio, foram também estudadas em diversas espécies *Vitis*, incluindo *V. cinerea* e *V. rupestris*, e também em híbridos complexos como *V. aestivalis*, *V. berlandieri*, *V. cinerea*, *V. labrusca*, *V. lincecumii*, *V. riparia* e *V. rupestris* (HOFFMAN *et al.*, 2007).

Mais recentemente, espécies selvagens de *Vitis* do Oriente, principalmente na China, despertaram atenção da viticultura para a resistência. O tipo de resistência contra o patógeno não nativo, encontrado nestas espécies, com uma substancial variação quanto à resistência e susceptibilidade entre os genótipos de cada espécie, foi considerado um caminho para desenvolver mais investigações neste sentido (HOFFMAN *et al.*, 2007).

Todas as videiras de origem Mediterrânica e Ocidentais, que pertencem à espécie *V. vinifera*, presumem-se serem susceptíveis aos patógenos de origem Americana. Este facto foi assumido com base em observações correntes de muitas variedades, em diversos locais. Uma vez que o patógeno parece ser capaz de se desenvolver nestas espécies, tem sido discutido, que poderá existir a possibilidade de encontrar resistência ao oídio na *V. vinifera*, durante o um curto período de tempo, em que hospedeiro e o novo patógeno introduzido foram capazes de co-evoluir. Da mesma forma, deve ter sido em conta o efeito da propagação clonal da cultura. Contudo, a essência das fontes genéticas que contribuiriam para as modernas variedades de *V. vinifera*, encontram-se ainda dispersas pela América, Irão, e ainda nas regiões à volta do Mar Negro e República Central da Ásia. Parte deste germoplasma, propaga-se sexualmente fora das culturas, podendo ter evoluído depois da chegada do patógeno, mais do que nas cultivares da Europa Ocidental. As especificidades das resistências dirigidas a patógenos não nativos podem ter evoluído debaixo de condições naturais na *V. vinifera* e nas espécies Asiáticas. Devido ao isolamento histórico e geográfico, a maior parte do germoplasma de *V. vinifera* mantido no Oriente, tem estado fora do alcance dos viticultores Europeus e do Novo Mundo, tendo sido apenas estudadas e utilizadas apenas pelos viticultores locais (HOFFMAN *et al.*, 2007).

Na viticultura tradicional, foram cultivadas vinhas de várias espécies *Vitis*, que foram hibridizadas, e novamente cruzadas com *V. vinifera*, no sentido de introduzir

resistência nos genótipos que produzem frutos. Algumas destas descendências férteis, foram também obtidas a partir de cruzamentos entre *V. vinifera* e *M. rotundifolia*, desmistando o facto da hibridização ser normalmente impedida pelo diferente número de cromossomas dos genomas da *Vitis* e da *Muscadinia*. O nível elevado de heterozigossidade do genoma da videira, torna impossível o restauro de muitas das características originais dos parentes da *V. vinifera*, mesmo quando os alelos que causam danos, não são herdados dos parentes não domesticados (HOFFMAN *et al.*, 2007).

As espécies *Kishmish vatkana* e *Dzhandzhal kara*, demonstraram ter resistência ao oídio, sendo a primeira mais robusta (HOFFMAN *et al.*, 2007). Folhas e bagos permaneceram assintomáticos à doença, durante o período de desenvolvimento da planta, apenas com algumas folhas senescentes, em que ocasionalmente se observou a instalação e desenvolvimento de pequenas colónias de oídio. A *K. vatkana* tem enormes cachos soltos com antocianinas, contendo frágeis restos de sementes abortadas. É frequentemente cultivada para uva de mesa na parte Este do Uzbequistão. Por virtude das características domesticadas, as características do fruto e a inata resistência ao oídio da *K. vatkana* poderá tornar-se numa importante fonte genética para a resistência cultural (HOFFMAN *et al.*, 2007).

Os fenótipos de resistência, são livres de uma substancial infecção de oídio ao longo de vários anos em estufa, e em condições de campo, por conseguinte exploráveis para propostas práticas de viticultura. A ocorrência de um gene com resistência a fungos, naturalmente entalhado numa pura bagagem genética da *V. vinifera*, abre a porta a novas oportunidades na viticultura convencional (HOFFMAN *et al.*, 2007).

O parasitismo do oídio nas videiras é um problema com uma pressão crescente para a uva e para a indústria do vinho. A doença é frequentemente controlada pela aplicação de fungicidas orgânicos e inorgânicos. Contudo, a actividade anti microbiana de algum destes químicos tornou-se parcialmente ultrapassada pela ocorrência de forças de resistência do patogéne. A percepção do público em geral de que os fungicidas têm um impacto negativo no ambiente e que colocam em risco a saúde humana acrescenta mais uma pressão no sentido de reduzir o uso de produtos químicos. Num futuro próximo, a exploração de recursos naturais poderá contribuir para um conjunto de práticas no sentido de se tornar uma viticultura mais sustentável (HOFFMAN *et al.*, 2007).

6.3 Meios de Luta Biológica

Experimentalmente, o oídio foi também controlado com produtos à base de soluções de sal de fosfato e detergentes ou óleos ultra finos (AGRIOS, 2005).

Na vertente do biocontrolo, foi conseguido a título experimental controlar o oídio usando micoparasitas. Os mais citados são o fungo antagonista *Ampelomyces quisqualis* Ces. (sin. *Cicinnobolus cesatii* De Bary) cujo uso já é permitido como luta biológica nos Estados Unidos da América (S.A. a partir da Internet: <http://membres.multimania.fr/ipmvigne/Maladies/oidium.htm>, 2010), e o *Tilletiopsis* sp. que teve sucesso de aplicação em estufa, contudo nunca foi usado em condições de campo (AGRIOS, 2005 e GOHEEN *et al.*, 2001).

Em estufa, foi também experimentado o controlo usando como material de construção, laminado de polietileno azul fotossensível (AGRIOS, 2005)

6.4 Meios de Luta Química - Fungicidas

O controlo do oídio nas vinhas baseia-se normalmente no emprego de fungicidas, sendo portanto o meio químico, aquele que actualmente se considera como o mais eficaz (GOHEEN *et al.*, 2001, e S.A., 1998).

Existem seis principais modos de acção anti-fungicos: Dentro dos preventivos temos aqueles que actuam por inibição da germinação de esporos e aqueles que actuam por inibição do crescimento ou a formação de haustórios. No campo dos curativos temos os seguintes modos de acção: acção sobre o micélio instalado, acção anti-esporulante, acção nos haustórios e efeito vapor (S.A. a partir da Internet: <http://membres.multimania.fr/ipmvigne/Maladies/oidium.htm>, 2010).

As substâncias activas dos produtos fitofarmacêuticos permitidos usar actualmente em Portugal, no âmbito da Protecção Integrada, para a gestão preventiva e/ou curativa do oídio apresentam-se no **QUADRO II.1:**

QUADRO II.1: Resumo das substâncias activas de fungicidas anti-óidio permitidos comercializar actualmente em Portugal (S.A., 2010);

Substância Activa	Grupo Químico	Observações
Azoxistrobina	estrobilurina	
Crexoxime	estrobilurina	
Dinocape	derivado dinitrofenólico	(Em esgotamento de existências)
Enxofre		
Espiroxamina	espiroquetalaminas	Segundo o fabricante é um inibidor da biossíntese dos esteróis com um modo de acção diferente dos triazóis
Fusilazol	triazol	Inibidor da biossíntese dos esteróis
Miclobutanil	triazol	Inibidor da biossíntese dos esteróis
Penconazol	triazol	Inibidor da biossíntese dos esteróis
Proquinazida	quinazolinonas	
Quinoxifena	quinolinas	
Stroby WG	estrobilurina	
Tebuconazol	triazol	Inibidor da biossíntese dos esteróis
Tetraconazol	triazol	Inibidor da biossíntese dos esteróis
Trifloxistrobina	estrobilurina	

Cada uma destas substâncias activas tem um modo de acção no seu combate ao óidio, como referido no **QUADRO II.2.**

QUADRO II.2: Modos de acção das substâncias activas de fungicidas anti-óidio (S.A. a partir da Internet: <http://membres.multimania.fr/ipmvigne/Maladies/oidium.htm>, 2010);

Fungicida (substância activa/grupo químico)	Acção	Modos de Acção					
		Inibição da germinação de esporos	Inibição do crescimento ou a formação de haustórios	Sobre o micélio instalado	anti- esporulante	nos haustórios	efeito vapor
Enxofre molhável	Contacto						
Enxofre em pó	Contacto						
Dinocape	Contacto						
I.B.E.s	Sistémico						
Estrobilurinas	Penetrante						
fenoxiquinolinas	Penetrante						

O enxofre foi o primeiro agente químico a ser utilizado como fungicida efectivo no controlo do oídio da videira, e é usado acerca de 150 anos (YPEMA *et al.*, 1997). O tratamento contra o oídio foi encontrado acidentalmente em 1846 por KYLE, um jardineiro inglês que trabalhava em estufas. A colocação de enxofre nas tubagens de aquecimento central, com o intuito de repelir as formigas e lesmas, favoreceu a emissão de gases de enxofre. Em França, GONTIER em 1851, foi o primeiro a aplicar enxofre nas vinhas. Nos E.U.A., W. PRINE, em 1829, relatava o uso adequado de enxofre, utilizado seco ou em solução, contra o oídio, e usado pela primeira vez em 'Massachusetts' por SAMUEL JOHNSON (S.A. a partir da Internet: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm, 2010). Devido à sua eficácia tanto preventiva como curativa, e também pelo seu baixo preço, continua a ser o fungicida mas utilizado para este fim (GOHEEN *et al.*, 2001). O enxofre aplica-se geralmente em pó ou em pó molhável. Em climas secos é preferível o enxofre em pó, ao contrário das regiões onde as chuvas são mais frequentes durante o período de crescimento vegetativo, em que o enxofre molhável ou sublimado, é preferencial dado a sua qualidade de retenção (GOHEEN *et al.*, 2001, e S.A., 1998).

A maior actividade fúngica do enxofre tem lugar na fase de vapor. A produção de vapores e sua efectividade depende do tipo de enxofre, assim como dos factores ambientais, fundamentalmente a temperatura. A banda de temperatura óptima para a actividade do enxofre é de 25-30°C. Abaixo dos 18°C este fungicida pode não ser eficaz e acima dos 30°C o risco de fitotoxicidade aumenta consideravelmente, não sendo recomendável a sua aplicação a temperaturas iguais ou superiores a 35°C. O enxofre é menos activo em ambiente húmido do que em ambiente seco, no entanto, os tratamentos realizados a partir do Verão podem afectar a qualidade organoléptica dos futuros vinhos (GOHEEN *et al.*, 2001, e S.A., 1998).

Os vapores de enxofre elementar entram em contacto com o fungo e entram nas células lipídicas do plasma periférico, uma vez que o enxofre é solúvel em gorduras. Dentro das células, um complexo de reacções químicas, resultando na formação de sulfato de hidrogénio, funciona como um veneno tóxico para as células do fungo. O enxofre comporta-se como um aceitador de electrões na cadeia respiratória e, assim, entra em concorrência com o oxigénio (S.A. a partir da Internet: http://www.muller-koeberle.fr/odium_2.htm, 2010).

Os fungicidas orgânicos mantêm a sua actividade a temperaturas mais elevadas que o enxofre, e com a excepção da substância activa dinocape, são menos fitotóxicos (GOHEEN *et al.*, 2001, e S.A., 1998). Dos produtos apresentados no QUADRO II.1, alguns

são de contacto, pelo que a sua acção é essencialmente preventiva. Outros, como os inibidores da biossíntese de esteróis (I.B.E.s), para além de terem uma acção preventiva, podem ter uma acção curativa, devido a serem penetrantes. A sua rápida penetração na planta que faz com que não sejam lavados pelas águas da chuva, se esta ocorrer de uma a algumas horas após a sua aplicação. Tem também a capacidade de actuar sob temperaturas relativamente baixas, factor importante para as regiões mais frias, sobretudo no que diz respeito às primeiras aplicações. Como inconveniente, tem a facilidade de criar resistências, pelo que não devem ser usados com frequência.

6.4.1 Fenómenos de Resistência a Fungicidas

Os fungicidas são essenciais para manter saudáveis, viáveis e com boa qualidade os produtos agrícolas. Antes dos anos 70, todos os fungicidas usados para o controlo dos patogénos das plantas eram inibidores de acção multi-localizados, actuando como protectores de doenças. Apesar do seu uso amplamente dispersado, a resistência a estes compostos era um evento raro. Contudo, desde a introdução de fungicidas com acção específica durante os anos 60, os fenómenos de resistência em fungos fitopatogénicos, tornou-se num problema grave para a gestão da protecção das plantas (BRENT, 1995).

A resistência a fungicidas, é um ajustamento, na procura da estabilidade, inerente do próprio fungo ao fungicida, resultando numa redução de sensibilidade do fungo, a esse fungicida. A resistência pode resultar numa mutação genética simples ou múltipla por parte do patogéne (KOENRAADT *et al.*, 1992).

Fungicidas com inibição de biossíntese de esteróis (I.B.E.) que afectam a demetilação (fungicidas DMI [inibição de demetilação]) têm uma importância crucial nos programas de controlo do oídio (YPEMA *et al.*, 1997).

O fungicida benomil foi registado para o controlo do oídio em 1994 pela 'Environmental Protection Agency' (EPA) em 1994. O benomil tem vindo a ser usado nas vinhas da Califórnia desde 1972, para controlo da *B. cinerea*, agente causal da podridão cinzenta das uvas (YPEMA *et al.*, 1997).

O triadimefão foi introduzido em 1982 e foi a mais importante ferramenta de controlo da doença ao longo de vários anos. Em 1989, dois fungicidas DMI adicionais, o miclobutanil e o fenarimol foram introduzidos no controlo do oídio (YPEMA *et al.*, 1997). A diminuição da sensibilidade ao triadimefão foi suspeitada em 1985 e confirmada em

1986 e 1990. A sensibilidade de culturas de *E. necator* para o triadimefão era considerada baixa, para o miclobutanil intermédia e elevada para o fenarimol (YPEMA *et al.*, 1997).

A resistência a fungicidas DMI é generalizada, mas, nem sempre geneticamente correlacionada. Existem indicadores de existência de resistência cruzada em *E. necator*, e as correlações acerca da sensibilidade para os diferentes fungicidas DMI não foram ainda determinadas (YPEMA *et al.*, 1997).

Os isolados resistentes, provêm tipicamente de uma população com baixa diferenciação genética natural. Estes isolados, são menos afectados, ou não são inibidos, por uma determinada aplicação de fungicida. Em populações de patógenos que se encontram sob a pressão selectiva de um fungicida, este pode efectivamente controlar os isolados sensíveis, mas ao longo do tempo, os isolados resistentes podem tornar-se dominantes, conduzindo posteriormente à falha no controlo de doença (KOENRAADT *et al.*, 1992).

O bom estado ecológico dos isolados de fungos resistentes a fungicidas, irá determinar a persistência dos genótipos de resistência, após seleccionados. Em muitas circunstâncias, desde que os isolados de resistência tenham um débil estado ecológico, relativamente aos isolados sensíveis aos fungicidas, não poderão sobreviver, na ausência da pressão da selecção provocada pelo fungicida. Neste caso, a frequência dos isolados de resistência nas populações de patógenos, irá diminuir, a partir do momento em que cesse a aplicação do fungicida. Por outro lado, isolados resistentes, em tão bom estado ecológico como os isolados sensíveis, persistem por um longo período de tempo, mesmo sem qualquer uso de fungicidas. Isto foi exemplificado, pela resistência a fungicidas de vários fungos fitopatogénicos, a substâncias activas como benzimidazol e estrobilurinas (KOENRAADT *et al.*, 1992).

6.4.2 Mecanismos Moleculares de Resistência a Fungicidas

A resistência a fungicidas pode ser conferida por vários mecanismos, incluindo:

- Alternância do local alvo de acção, que reduz a ligação do fungicida;
- Síntese de uma enzima alternativa capaz de substituir o local de ligação da enzima;
- Superprodução do local de ligação da enzima;
- Um efluxo activo ou uma redução na quantidade de fungicida absorvido;

- Quebra da reacção metabólica do fungicida;

Além disto, alguns mecanismos não reconhecidos poderão também ser responsáveis pela resistência a fungicidas (MA e MICHAILIDES, 2005).

A. Resistência ao Benzimidazol

A resistência a fungicidas à base de benzimidazol, foi detectada em muitas espécies de fungos. Na maior parte dos casos, a resistência estava correlacionada com mutações no gene da β -tubulina, ocorrendo alteração da sequência de aminoácidos no local de ligação do benzimidazol. O envolvimento directo das mutações que conferem resistência ao benzimidazol, foi confirmada pela mutagenese do local directo, seguida pela substituição desse gene (LI *et al.*, 1996).

Foi demonstrado que mutações em diferentes codões no gene da β -tubulina, poderão resultar em diferentes níveis de resistência ao benzimidazol. Adicionalmente, diferentes substituições no mesmo codão, poderão também resultar em diferentes níveis de resistência (ALBERTINI *et al.*, 2003).

Os isolados de fungos resistentes ao benzimidazol, com mutações no gene da β -tubulina, poderão ter efeitos inibitórios no crescimento do micélio, a temperaturas elevadas ou baixas (YAN e DICKMSAN, 1996). Estes efeitos poderão interferir no bom estado ecológico dos isolados resistentes e impor uma desvantagem selectiva nestes isolados em condições de campo. Para além disto, a sensibilidade à temperatura dos isolados resistentes poderá ter impacto directo na estratégia de aplicação de fungicidas. Por exemplo, se os isolados resistentes mostrarem sensibilidade a temperaturas elevadas, os dias quentes poderão ser a altura mais apropriada para a aplicação de fungicida, em culturas em que este tipo de isolados resistentes fora detectado (YAN e DICKMSAN, 1996).

Algumas excepções foram também observadas, em diversos isolados resistentes e sensíveis ao benzimidazol, verificou-se que as sequências de aminoácidos do gene da β -tubulina eram idênticas. Estes resultados indicam que outros mecanismos poderão ser responsáveis pela resistência destes fitopatogénos ao benzimidazol, contudo, o exacto mecanismo para esta resistência permanece ainda desconhecido (KAWCHUCK *et al.*, 2002).

O mais antigo benzimidazol (benomil) foi retirado do mercado voluntariamente pelo próprio fabricante. Contudo, ainda existem outros fungicidas à base desta substância activa, que são ainda aplicados em diversas culturas (MA e MICHAILIDES, 2005). A

monitorização da resistência ao benzimidazol nos fungos patogénicos, deve continuar enquanto estes fungicidas fizerem parte da gestão de doenças das plantas.

B. Resistência aos DMIs – Inibidores da Demetilação

Os DMIs abrangem um vasto número de fungicidas com sucesso comercial, e foram primeiramente usados na agricultura nos anos 70. Desde os anos 80, problemas de resistência devido ao uso de DMIs foram referenciados em diversos fungos patogénicos, bem como foi identificado um vasto número de mecanismos de resistência (MA e MICHAILIDES, 2005).

Os DMIs inibem a α -demetilação do precursor do ergosterol nos fungos (BRENT, 1995). São compostos sistémicos de elevada acção preventiva e curativa contra doenças provocadas por fungos, que funcionam em pequenas doses, e graças ao seu modo de acção altamente selectivo. Contudo, e devido a esse seu modo de acção selectivo, o uso intensivo de DMIs, levou ao desenvolvimento de resistências num elevado número de fungos. Esta resistência, liderou uma série de problemas, no controlo de doenças, reduzindo consideravelmente a eficiência dos tratamentos ([1] DÉLYE *et al.*, 1997).

Outros ensaios conduzidos com outros fungicidas DMIs, em isolados altamente resistentes ao triadimenol, mostraram que estes tipos de isolados podem ser sensíveis a outras moléculas DMI. Em contraste, alguns isolados com fraca resistência ao triadimenol, aparentemente também oferecem baixa resistência a outros DMIs ([1] DÉLYE *et al.*, 1997). Assim, pode-se concluir que as bases de resistência aos DMIs em *E. necator* são complexas e mais estudos são necessários para perceber esta resistência.

B.1) Mutações no gene codificado 14 α -demetilase (CYP51)

No fungo *E. necator*, uma única mutação levando à substituição de uma fenilalanina por uma tirosina na posição do codão 136 (Y136F) do gene *CYP51* foi encontrada em todos os isolados resistentes ao triadimenol, cujo grau de resistência era classificado de igual ou superior a 5, numa escala de 0 a 10. Nos isolados resistentes em que o grau de resistência era inferior a 5, não se encontraram mutações no gene *CYP51*.

Estes dois aminoácidos têm estruturas moleculares similares, excepto no facto de que a tirosina tem um grupo hidroxilo que não existe na fenilalanina. A perda do grupo

hidroxilo no local activo do citocromo P-450 esteroide 14 α -demetilase (P-450_{14DM}), que é a única consequência da mutação, aumenta a sua hidrofobia no local activo sem afectar a sua configuração. Aumentando a sua hidrofobia no local activo do P-450_{14DM}, reduz a afinidade da enzima ao seu inibidor (molécula polar com esqueleto hidrofóbico) sem afectar significativamente o P-450_{14DM} que é a enzima chave da via biossintética do esteroide nos fungos ([1] DÉLYE *et al.*, 1997).

Estudos recentes usando análise RAPD ('Randomly Amplified Polymorphic DNA') mostraram que isolados de *E. necator* colhidos a partir de plantas com sintomatologia típica em 'drapeaux', ou seja, com contaminações a partir de conídios (isolados do grupo I) tinham padrões RAPD muito diferentes dos padrões RAPD dos isolados que provinham a partir de contaminações por ascósporos (isolados do grupo III). Isto foi verificado em amostras de campo colhidas na Europa e na Austrália. Na Índia, identificou-se a existência de um terceiro grupo genético (grupo II). A variação genética entre grupos é considerada maior que a variação genética nos grupos, sugerindo isolamento genético (DÉLYE *et al.*, 1999).

Usando NAS-PCR ('Nested Allele-Specific PCR') foram identificados os seguintes resultados: Amostras colhidas em Maio, com sintomatologia de oídio em 'drapeaux', foram associadas a isolados do grupo I. Amostras de campo colhidas em Junho, foram associadas a isolados do grupo III, e também a alguns isolados do grupo I. Em Julho e Setembro, apenas foram detectados isolados do grupo III, sugerindo que este grupo representa a maioria dos isolados de *E. necator* presentes no final do ciclo vegetativo da planta (DÉLYE *et al.*, 1999). Estes resultados são consistentes com a hipótese de que existem grupos geneticamente isolados, de isolados de *E. necator*, e que estes isolados, ocupam nichos distintos e especializados, como já anteriormente foi demonstrado para outros fungos (GIRAUD *et al.*, 1997). Esta subdivisão de grupos genético (I, II e III) é relativa a estudos efectuados no gene *CYP51* e portanto refere-se a subdivisão diferente à anteriormente referenciada no ponto 2 deste Capítulo.

No estudo efectuado por DÉLYE *et al.* (1999), comparando as sequências do *CYP51* em isolados de *E. necator*, foram identificados três pontos de mutação, que distinguem os grupos I e II, do grupo III. Identificaram-se mutações no codão 37, no codão 156 (região de elevada conservação, que se crê estar envolvida no reconhecimento do substrato enzimático), e no codão 493 'silent'. A ocorrência destas três mutações no *CYP51* foi surpreendente, uma vez que este gene está altamente conservado e é essencial para a sobrevivência do fungo. Assim, mutações no *CYP51* parecem ocorrer por duas

razões, adaptativas e neutrais. A mutação 'silent' no codão 493 é provavelmente neutral, mas o significado biológico das mutações no codão 37 e 156 nos grupos I e II não são conhecidas. Estas descobertas, foram identificadas após a identificação da mutação no *CYP51* associada a isolados de *E. necator* resistentes a fungicidas inibidores do *CYP51* (DÉLYE *et al.*, 1999).

6.5 Métodos Previsionais de Aparecimento do Oídio

A previsão do risco de ataque de oídio deve ser feita de acordo com vários critérios, sendo eles, histórico global da parcela (sanitário e fisiológico), sensibilidade da casta e dados climáticos, sobretudo de humidade relativa e temperatura.

A relação entre a vinha e as pragas e doenças é extremamente complexa, devido à natureza das interações planta-patógene/praga, mas também por causa do efeito do clima, sobre esses dois componentes deste ecossistema. Os modelos são ferramentas que tentam, tendo em conta essa complexidade, simular o desenvolvimento das populações dessas doenças/pragas em diferentes parâmetros. Estes modelos, pretendem assim fornecer um quadro geral, para a fundamentação da protecção fitossanitária da vinha que possa ser utilizado por técnicos e produtores.

Não existe actualmente nenhum sistema de previsão operacional do oídio. Os modelos propostos por CHELLEMI e MAROIS (1991), na Califórnia, e que hoje em dia fornecem a base de dados para o modelo do programa da 'Adcom', ou por EMMETT *et al.* (1994) prevêm as contaminações secundárias a partir de dados climáticos. Estes modelos, até agora, não demonstraram melhorar a gestão dos tratamentos. Um outro modelo, está a ser desenvolvido por STRIZYK INRA de Bordéus, no Departamento de Protecção das Plantas (modelo 'Chellemi') e testado em vários vinhedos franceses. De acordo com RAYNAL, este modelo tem grande potencial, no sentido de descrever a gravidade geral de uma epidemia, contudo ainda precisa ser refinado para a detecção de contaminação inicial (primária) (S.A. a partir da Internet: <http://membres.multimania.fr/ipmvigne/Maladies/oidium.htm>, 2010).

Na prática, os tratamentos começam geralmente cedo, antes da fase de floração e continuam muitas vezes, sem interrupção para além da fase do pintor. A falta de identificação de determinados eventos climáticos relacionados com o oídio é a razão pela

qual estes programas necessitam ainda de ser melhorados (s.A. a partir da Internet: <http://membres.multimania.fr/ipmvigne/Maladies/oidium.htm>, 2010).

À falta de um modelo, a detecção visual de surtos pode servir de orientação. A observação inicial da primeira mancha é difícil, mas leva a identificar as áreas de exploração vitícola, onde as uvas podem sofrer de ataques nocivos de oídio (YVON BUGARET comunicação pessoal).

Uma maneira de observar o aparecimento dessas manchas primárias, que funcionam tanto para o oídio como para o míldio, é seleccionar numa parcela (com as características edafo-climáticas e castas mais propensas ao aparecimento das doenças), uma zona de 5 videiras consecutivas e formular uma pequena área de observação biológica que se vai preparar da seguinte forma. Dessas 5 videiras escolhidas, à videira que fica na posição intermédia, baixa-se um ramo do ano até ao solo. A parte do ramo que fica em contacto com o solo deve ter um mínimo de 3 gomos dormentes que irão rebentar na Primavera. Esta condução da vara ao chão deve ser efectuada já na fase de atempamento mas antes da queda das folhas. Poder-se-á até circundar esta cepa com uma rede. O objectivo é que quando as folhas caírem, estas fiquem durante o Inverno depositadas sobre o ramo que se fez estender até ao chão, e assim garantir o contacto com o inoculo (**FIG. II.14**) (YVON BUGARET comunicação pessoal).

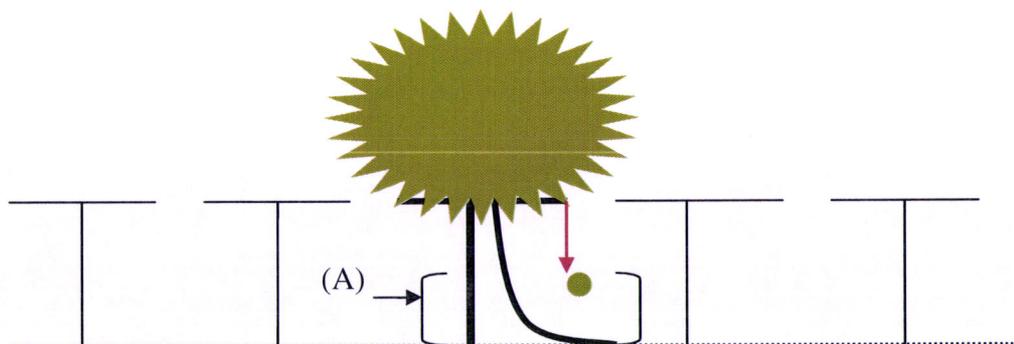


FIG. II.14 – Esquema de 5 videiras seleccionadas no meio de uma parcela susceptível ao oídio. A cepa do meio tem uma vara que foi conduzida até ao chão onde se deixaram 3 gomos. (A) rede para manter as folhas caídas; A seta a rosa indica a queda das folhas sobre o ramo deixado no chão.

Na Primavera, o agricultor começa a realizar uma série de tratamentos fitossanitários. A partir desta altura, estas 5 cepas deverão ser cobertas, em ambas as faces com um plástico a cada passagem do pulverizador, para que o produto fitossanitário não entre em contacto com elas e assim condicionar uma ambiente propício para o

desenvolvimento de doenças. Também é aconselhável não realizar nenhuma limpeza dos ramos por poda verde (YVON BUGARET comunicação pessoal).

Com as condições climáticas favoráveis, e estando o inoculo presente, estas cepas não tratadas serão as primeiras a acusar os sintomas de aparecimento de doenças como o oídio e o míldio, servindo desta forma como indicador para o viticultor, para saber qual a melhor altura para posicionar o primeiro tratamento. Se por um lado este método funciona com segurança para a detecção da primeira mancha de míldio, no caso do oídio não deve ser encarado com o mesmo grau de confiança, e portanto, iniciar os tratamentos anti-oídio antes da floração é regra de ouro, até que os conhecimentos científicos permitam conhecer melhor esta doença e sua interacção com o clima e a planta (YVON BUGARET comunicação pessoal).

6.6 Tomadas de Decisão na Gestão dos Tratamentos Fitossanitários Anti-Oídio

A luta contra o oídio deve ser preventiva, sistemática e realizada sem interrupções durante o período sensível da videira. Ela exige uma boa profilaxia e um controlo químico racional. Na verdade, devido ao surgimento de cepas resistentes a alguns I.B.E.s, especial atenção deve ser dada à escolha dos produtos químicos. A observação atenta e minuciosa semanalmente, é obrigatória no sentido de avaliar precocemente a estratégia a seguir, antes da instalação da doença. Os tratamentos chamados de “cura” são muitas vezes inúteis, no sentido de recuperar a boa qualidade da colheita. Após o estado fenológico de fecho dos cachos, a escolha dos fungicidas deve ser conduzida no sentido de evitar ataques nas folhas e evitar a formação de cleistotecas. A qualidade da protecção deve ser a mais rigorosa entre fase de pré-floração e fecho dos cachos e ser aplicada em cada lado da cepa (S.A. a partir da Internet: <http://membres.multimania.fr/ipmvigne/Maladies/oidium.htm>, 2010).

A justificativa para o controle químico tem como base o posicionamento do primeiro tratamento. A escolha dos produtos utilizados e sua taxa de aplicação (7 a 10 dias para os produtos de contactos e 12 a 14 dias para produtos penetrantes ou sistémicos). É aconselhado a renovação as aplicações dos produtos de contacto quando ocorre lixiviação por pluviosidade. Limitar a aplicação dos I.B.E.s para 2 ou 3 tratamentos é também

aconselhado devido ao risco de resistências (S.A. a partir da Internet: <http://membres.multimania.fr/ipmvigne/Maladies/oidium.htm>, 2010).

A tomada de decisão na gestão dos tratamentos para o oídio, prende-se sobretudo num programa de tratamentos relacionados com o estado fenológico da videira (FIG. II.15), no sentido de delimitar o período de maior sensibilidade à doença (SILVA, 2008).

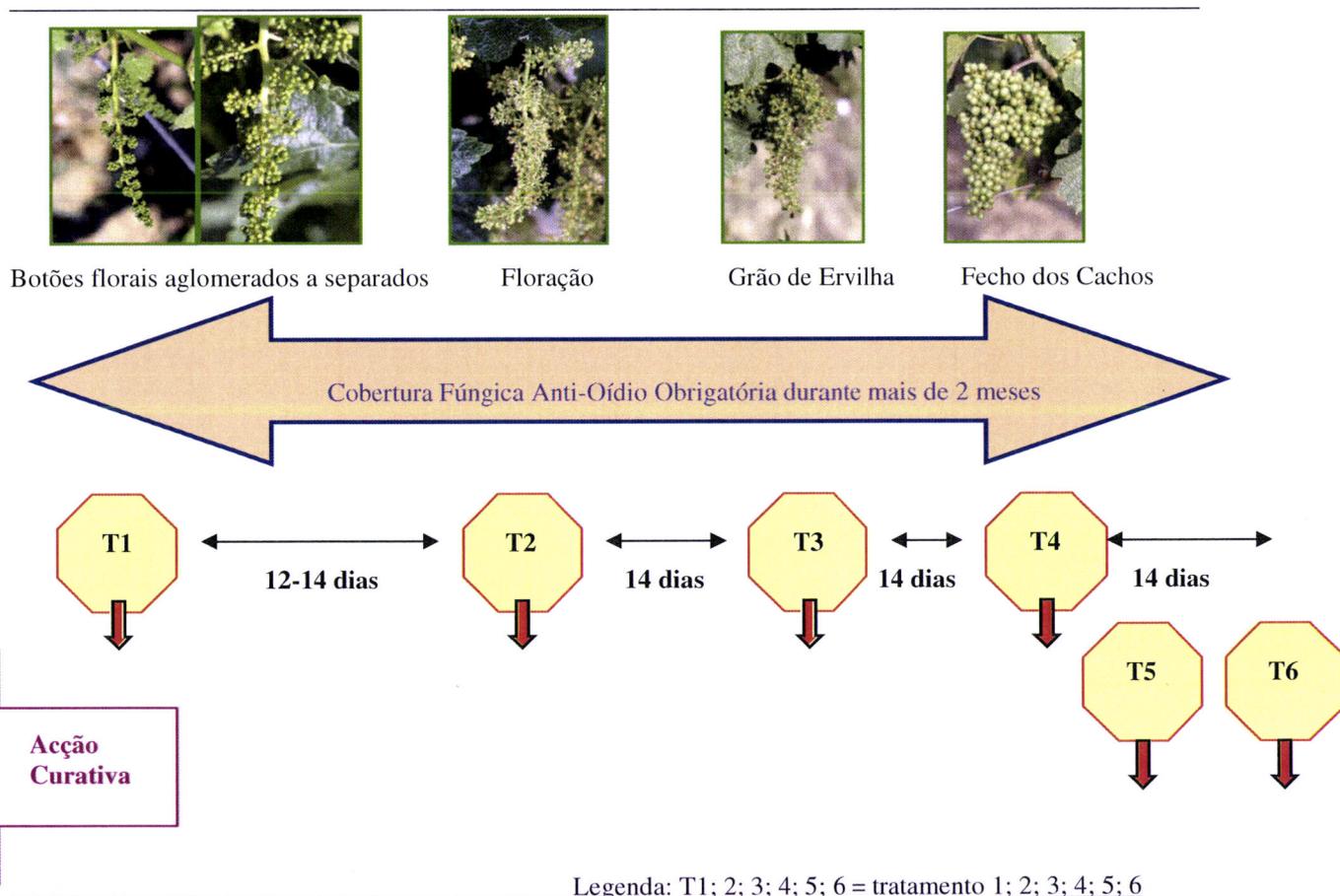


FIG. II.15: Tomada de decisão para o tratamento do oídio (SILVA, 2008 – Fonte YVON BUGARET).

A realização de um tratamento precoce com acção curativa, quando os ramos têm poucos centímetros de comprimento, estado fenológico de 2 a 3 folhas separadas, (*vide* FIG. II.15), deve ser realizado em vinhas com histórico de aparecimento de oídio e com histórico de aparecimento de oídio em 'drapeaux', a fim de destruir o micélio nos gomos infectados. Nesta fase, o oídio é particularmente vulnerável. Na vinha, com pouca vegetação, é muito fácil colocar o produto nas folhas jovens em processo de crescimento. Para vinhas sem este tipo de histórico, não haverá necessidade de o realizar. Em situações de vinhas normais e sem histórico de aparecimento de oídio, o primeiro e o segundo tratamentos são realizados no momento da floração, no sentido de proteger

adequadamente as inflorescências. O terceiro tratamento é feito após a frutificação, quando a planta se encontra no estado fenológico de bago de ervilha (*vide* **FIG. II.15**) e um quarto tratamento deverá ser realizado antes da interrupção do crescimento – fecho dos cachos (*vide* **FIG. II.15**). Os eventuais quintos e sexto tratamentos podem ser efectuados antes de pintar, para proteger as uvas contra ataques de oídio tardios, antes do desenvolvimento o fungo. Depois de pintar quando os bagos contêm mais de 8 % de açúcares o risco de aparecimento de doença é nulo. Estes últimos tratamentos só se justificam em casos de previsão de aparecimento de oídio elevados e portanto dependendo do desenvolvimento da doença (S.A. a partir da Internet: http://www.muller-koeberle.fr/odidium_2.htm, 2010).

As causas de uma protecção fracassada pode ser devida a vários factores, entre eles destacam-se o tratamento precoce e/ ou tardio, incumprimentos das doses a aplicar, má qualidade da pulverização e resistências aos I.B.E.s, por exemplo (S.A. a partir da Internet: <http://membres.multimania.fr/ipmvigne/Maladies/oidium.htm>, 2010).

7. Influência do Oídio na Qualidade Final dos Vinhos

Quando uma colheita é efectuada em vinhas que sofreram com a presença do oídio, obviamente existirão consequências a nível qualitativo no produto final, o vinho.

Os ataques precoces do oídio à floração, pode provocar queda dos botões florais e alterar a coloração dos pequenos bagos. O crescimento dos bagos é retardado, e os bagos atacados pelo fungo ficam pequenos e retraídos à maturação (**FIG. II.16**). Com o aproximar da fase do pintar e no decorrer da maturação, o oídio provoca fissuras na película dos bagos (**FIG. II.16**). Existindo uma intensidade de bagos atacados pelo fungo de 10%, as diminuições do peso do cacho são significativas, e poderão chegar à perda de peso na ordem dos 50%. No total de uma parcela, as perdas na colheita podem chegar a cerca de 30%. Da mesma forma é verificada uma diminuição no rendimento de mosto em uvas infectadas com oídio (SVA, 2008).

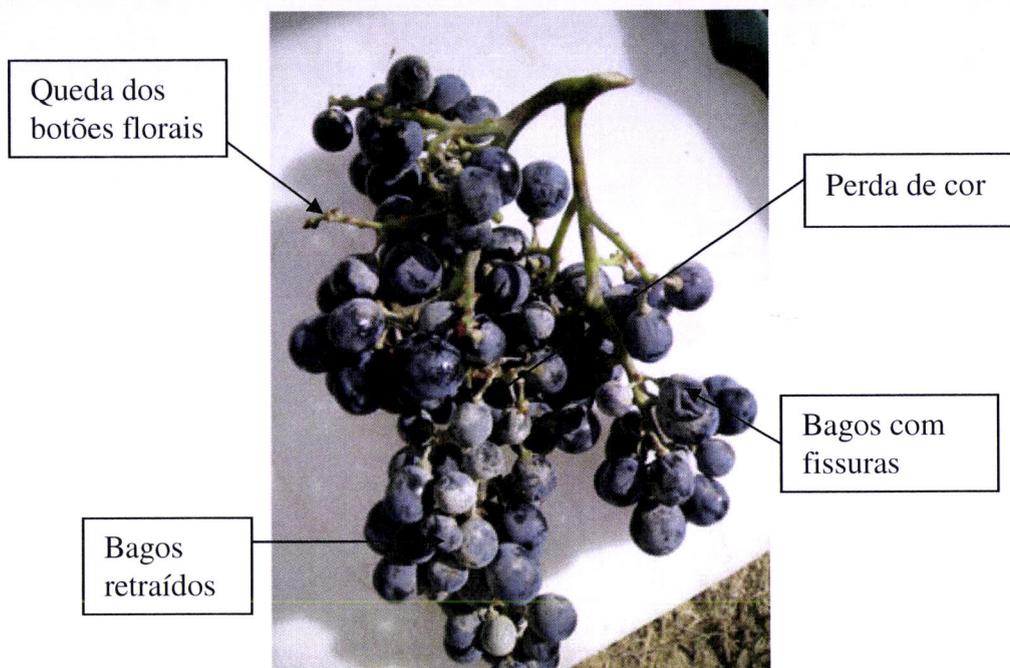


FIG. II.16: Cacho de uva tinta atacado pelo oídio (SVA, 2008).

Com a degradação da película, o oídio quebra a síntese de antocianinas. Segundo estudos efectuados pelo INRA de Bordéus, 1% de bagos atacados pelo oídio, corresponde a menos 0,6-0,9% de antocianinas na uva. A quantidade de antocianinas por bagos (ou por L) não é o único factor responsável pela cor final dos vinhos tintos, mas é sem dúvida o elemento mais importante. Aliás, existe até o facto de uvas atacadas pelo oídio originarem vinhos mais concentrados. Isto apenas está relacionado com o facto de o tamanho dos bagos ser reduzido, compensando a degradação provocada pelo fungo nos compostos responsáveis pela cor, originando desta forma mostos mais concentrados (SVA, 2008).

O oídio fragiliza as películas e favorece o aparecimento de fissuras nas películas. Se as condições meteorológicas forem favoráveis, pode desenvolver-se podridão ácida, provocada pelo fungo *B. cinerea* (SVA, 2008). As consequências foram já anteriormente abordadas no ponto 4 deste capítulo.

O oídio tem igual impacto negativo na composição aromática das uvas. Ele degrada um certo número de compostos aromáticos, e sobretudo está na origem da formação dos compostos chamados fenóis voláteis como o eugenol e a zingerona (SVA, 2008). Em uvas que sofreram esta doença, é verificado também um aumento da extractibilidade dos taninos. Em tinto, a extractibilidade aumenta significativamente nos primeiros dias de maceração (SVA, 2008).

Os vinhos provenientes de uvas afectadas com o oídio, sofrem aumentos de instabilidade tartárica e de pH. As películas da uva ao ficarem fragilizadas pelo ataque do

fungo responsável pelo oídio, favorece a libertação de potássio para o mosto. O potássio está localizado nos vasos liberolenhosos situados sob a película. As hifas do fungo degradam esses vasos, e potássio é desta forma libertado. O ácido tartárico fica mais instável do que em situações normais e tende a precipitar de forma considerável (SVA, 2008).

Num vinho pronto, provenientes de uvas infectadas com oídio, é constado um aumento regular do pH. Aumenta na ordem de 0,1 para um nível de ataque de oídio de 8%, e 0,2 para um nível de ataque de oídio de 23% (SVA, 2008).

Perante uma colheita afectada pelo oídio, a gestão das vinificações requer cuidado em algumas práticas.

Dependendo da organização e dos custos implícitos à vindima, a principal dificuldade pode advir da impossibilidade da separação de uvas infectadas e uvas sãs. Quando essa separação não possível, é aconselhável considerar que estamos perante uma colheita com uvas infectadas pelo oídio e tratá-las no seu todo como tal. O objectivo principal deverá ser extrair e estabilizar rapidamente os compostos interessantes das películas, provocando o menor número de acções que impliquem degradação das películas (SVA, 2008).

Quando o fenómeno de concentração aparece, as uvas analisadas durante o controlo de maturação, que aparentemente parecem ter azoto assimilável suficiente, tornam-se frequentemente deficitárias (SVA, 2008).

7.1 Vinhos Brancos e Rosés

Para uma boa gestão das vinificações de uvas que sofreram ataques de oídio, à que ter em conta determinados cuidados.

As fases pré-fermentativas são as mais importantes, quer devido ao seu impacto directo nas extracções, quer devido aos seus efeitos diferidos sobre o trabalho dos vinhos terminados. Os elementos principais giram ao redor dos seguintes aspectos:

- ✓ Proteger as uvas e mostos, contínua e fraccionadamente (SO₂), adaptando aos níveis de desenvolvimento dos ataques secundários (como por exemplo, podridão ácida – *B. cinerea*).
- ✓ Não realizar maceração pelicular.
- ✓ Privilegiar processos que triturem o mínimo possível as películas.

- ✓ Realizar tratamentos correctivos, como por exemplo, aplicação de PVPP (polivinilpolipirrolidona).
- ✓ Boa gestão do frio, para fermentar mostos límpidos.
- ✓ Separar precocemente os mostos de prensa (ICV, 2008).

A fermentação alcoólica é perturbada apenas no caso de concentração das uvas. Sobre ensaios realizados em 2007, em França, sobre a casta 'Chardonnay', as uvas infectadas com oídio originaram mostos mais concentrados e tiveram a necessidade de mais 4 a 6 dias para terminar a fermentação alcoólica, e no final apresentavam valores de acidez volátil mais elevados (ICV, 2008).

Comparando organolépticamente fermentações alcoólicas para diversos níveis de ataque de oídio nas uvas, os vinhos obtidos apresentavam todas as sensações aromáticas reduzidas, excepto os aromas provenientes de fenóis voláteis. Na boca apresentavam pouco volume e acidez (ISV, 2008).

Segundo ICV (2008), algumas regras de condução das vinificações podem ser levadas em conta no sentido de melhorar os vinhos, contudo, estas acções não vão no sentido da diminuição dos custos. Desse conjunto de acções pode-se destacar:

- ✓ Evitar aplicação de leveduras que favoreçam os aromas a compostos sulfurados e/ou aumentem a dureza de boca.
- ✓ Aplicar produtos enológicos que promovam mais redondeza de boca, de acordo com estilo de vinho procurado. O volume de boca também pode ser melhorado com a aplicação de produtos enológicos, associando a sua aplicação ao último quarto da fermentação alcoólica e promovendo acções de 'batonnage'.
- ✓ Fermentar os mostos a temperaturas mais elevadas que o habitual - 18°C, do que para valores próximos dos 15°C. A baixa temperatura, promove 'stress' nas leveduras e a sua produção de ésteres é frequentemente acentuada.
- ✓ Delimitar o risco de aparecimento a odores sulfurados, gerindo as aplicações combinadas de azoto-oxigénio. Privilegiar o azoto orgânico ou as misturas de sais de amónio.
- ✓ Estes vinhos requerem uma vigilância mais apertada para gerir as aplicações de oxigénio sobretudo até ao meio da fermentação alcoólica, os reajustamentos de PVPP e, principalmente, antecipar as operações subsequentes.

A partir do fim da fermentação alcoólica, é preferível trasfegar protegendo continuamente o vinho, para eliminar as borras grossas que possam favorecer os odores sulfurados e a dureza de boca. Em função da degustação (ausência de odores sulfurados e outros defeitos aromáticos), poderá realizar-se sobre borras finas, processos de ‘batonnage’ com regularidade, tendo por objectivo desenvolver o volume em boca e atenuar a sensação de amargura. É também uma fase onde se pode praticar ensaios colagem complementares e tomar decisões, por exemplo, quanto ao uso de madeira (ICV, 2008).

7.2 Vinhos Tintos

Nos vinhos tintos, a lógica continua a ser a mesma, e a maior parte dos aconselhamentos permanece inalterada. Os ensaios comparativos mostram que o impacto do oídio, começa a surtir efeito nos vinhos a partir de um nível de ataque de 8% em cachos, com perda das notas frutadas, aumento do aroma vegetal, diminuição do volume e da acidez (como nos vinhos brancos). Os efeitos sobre a dureza no fim de boca, com a vinificação ‘standard’, aparecem apenas com um nível de ataque nos cachos superior a 20% (ICV, 2008).

Sobre fases pré-fermentativas, ICV (2008) aconselha:

- ✓ Delimitar as acções que induzam a trituração das películas. Isto não significa que não é necessário pisar, pelo contrário, um processo de remontagem/ pisa bem regulado, exerce uma pressão suficiente para abrir a película sem a friccionar libertando-a da polpa, além disso, facilita a acção das enzimas.
- ✓ A adição de enzimas favorece as extracções da película, permitindo extrair mais cedo, enquanto há pouco álcool.

Durante fermentação alcoólica, mesmo em uvas afectadas pelo oídio, é importante libertar rapidamente a cor e os polifenóis. Devemos contudo privilegiar as seguintes acções:

- ✓ Realizar processos de extracção o mais cedo possível, privilegiando processos de ‘delástage’ em vez de remontagem, uma vez que as películas ficam mais bem homogeneizadas com o mosto extraído.
- ✓ Limitar o aumento das temperaturas para evitar ter demasiado cedo muito álcool - não excedendo um máximo de 25°C. Em todo caso, com a fragilidade das células

de tais uvas infectadas com oídio, e com o aumento das doses de enzimas aplicadas, não há necessidade de trabalhar a quente, além do mais, trata-se, em paralelo, de reduzir os riscos de paragem de fermentação alcoólica.

- ✓ Escolher uma levedura adaptada, com os mesmos critérios que em branco ou rosé.
- ✓ Realizar macerações curtas, durante 3 a 5 dias.
- ✓ Tratar sempre os vinhos de prensa à parte, até ao fim fermentação maloláctica.
- ✓ Gerir o oxigénio e o azoto, como se de uma vindima com risco de aparecimento forte de odores sulfurados e de dureza de boca se tratasse. Privilegiar a aplicação de azoto orgânico em vez de mineral. Aplicar oxigénio diariamente durante a primeira metade da fermentação alcoólica em função do perfil aromático (compostos sulfurados, vegetais, frutados, etc.) e das sensações tanínicas.
- ✓ Trasfegar 24 h após se verificar o abaixamento da manta, mesmo que a fermentação alcoólica ainda não tenha terminado. Este processo diminui quase sistematicamente as notas sulfuradas e a agressividade tanínica (ICV, 2008).

Usar madeira em maceração, económica e tecnicamente, não é uma solução realista para este tipo de uva. Quando as uvas têm um nível de ataque de oídio que excede os 15%, mesmo gerindo bem as vinificações, usar madeira não é o suficiente para cobrir os defeitos devidos à uva. Existem produtos enológicos claramente mais eficazes para estabilizar as notas frutadas e promover o volume de boca. Esta opção é até mais coerente, tendo em conta a fraca duração de maceração, e a desencuba realizada antes do fim da fermentação alcoólica (ICV, 2008).

No fim da fermentação alcoólica, é importante gerir a eliminação das borras grossas precocemente, para evitar os odores sulfurados e o reforço das sensações tanínicas. Na ausência de *Botrytis*, não há razão específica para alterar a estratégia de contributo de oxigénio entre a fermentação alcoólica e a fermentação maloláctica. Contudo é aconselhado fazer testes (ICV, 2008).

Em vários ensaios foi demonstrado que o oídio tem pouco impacto sobre a duração da fermentação maloláctica, sendo a levedura escolhida e a gestão das desencubas os factores que retardam claramente esta segunda fermentação. O custo das bactérias lácticas é frequentemente excessivo para tais uvas infectadas com oídio. Sem estar a negar esta realidade, é necessário julgar o valor acrescentado trazido pela inoculação, especialmente para os vinhos que têm já mercados predefinidos e remunerados, ou exigências de calendário. A não inoculação com bactérias lácteas, é aceitar o risco de desenvolvimento de micro-organismos contaminadores (incluindo *Oenococcus*, que tem a capacidade de

produzir aminas biogénicas) e aceitar 10 a 50 dias entre o fim da fermentação alcoólica e a fermentação maloláctica. Em ambos os casos, o risco de perda de valor é elevado, sobretudo se se investiu num procedimento pensado para reduzir os defeitos. Não se trata por conseguinte de privilegiar o consumo de produtos enológicos, mas, efectuar gastos onde de facto é relevante, tendo em conta igualmente o valor do produto final (IVC, 2008).

8. Métodos de Detecção Molecular em *E. necator*

Os métodos convencionais para detectar resistência a fungicidas requerem isolamento do patógeno em cultura pura e subsequente inoculação num meio de cultura contendo fungicida ou, inoculando a própria planta ou tecido vegetativo desta, tratada com fungicida (ANON, 1982). Os procedimentos destes métodos convencionais são de intenso trabalho laboratorial e consomem largo número de horas. Os avanços da biologia molecular providenciaram novas oportunidades de rapidamente detectar génotipos resistentes a fungicidas, desde que os mecanismos de resistência estejam perfeitamente elucidados a nível molecular (MA e MICHAILIDES, 2005).

Várias técnicas moleculares como amplificação por: PCR - Reacção da Polimerase em Cadeia; PCR-RFLP – PCR ‘Fragment Length Polymorphism’; ‘Allele-specific PCR’; e ‘Allele-specific real-time PCR’, têm vindo a ser usados com sucesso na detecção de génotipos resistentes a fungicidas em diversos patógenos das plantas (MA e MICHAILIDES, 2005).

Neste capítulo, iremos focar alguns exemplos do uso de métodos moleculares para detectar isolados de *E. necator*.

8.1 PCR – Reacção de Polimerase em Cadeia

A análise de PCR veio revolucionar a biologia molecular, tornando-se uma ferramenta para a rápida detecção de patógenos resistentes a fungicidas (MA e MICHAILIDES, 2005).

Este processo é uma ferramenta fundamental em muitos laboratórios de pesquisa genética. É usado para amplificar DNA de amostras, através de uma temperatura mediada por uma DNA polimerase e exige um grupo de dois ‘primers’ complementares às

extremidades do gene que se pretende analisar. Os produtos podem ser usados para sequenciação e análise.

FALACY *et al.* (2007) realizou ensaios de PCR, usando ‘primers’ específicos desenvolvidos para diferenciar *E. necator* de outros fungos de oídio comuns no Norte do E.U.A. O DNA foi extraído primeiramente a partir de micélio, conídios e/ou cleistotecas colhidos em folhas de videira. Para diferenciar *E. necator* de outros fungos da família *Erysiphe*, desenvolveu um par de ‘primers’ Uncin144 e Uncin511 para seleccionar sequências únicas de regiões internas do DNA de *E. necator*. Usando estes ‘primers’ em amplificações de PCR, foi gerada uma amplificação específica de *E. necator* de 367 pb, não sendo obtidas amplificações para os outros fungos.

Nos pontos seguintes serão abordadas outras análises subsequentes ao PCR, e que se aplicaram em estudos acerca do fungo fitopatogénico *E. necator*.

8.2 Detecção por CAPS – ‘Cleaved Amplified Polymorphic Sequence’ de diferentes grupos genéticos de isolados *E. necator*

Esta técnica funciona segundo o princípio de que as diferenças genéticas entre os indivíduos, podem criar ou suprimir locais de restrição, sendo essas diferenças detectáveis no comprimento de fragmentos de DNA após um processo de digestão enzimática. É portanto utilizada para identificar polimorfismos numa região específica de um gene. Esta região é primeiramente amplificada por PCR, e depois seguida por uma digestão com enzimas de restrição (a partir da Internet: www.everythingbio.com, 2010).

MONTARRY *et al.* em 2009, utilizou este método molecular para diferenciar grupos genéticos, amplificando primeiro por PCR, o gene da β -tubulina de *E. necator*. A diferença entre os grupos genéticos A e B exibiu um polimorfismo de um nucleótico (SNP – ‘single nucleotide polymorphism’) Timina/Citosina. Este SNP gera um local de reconhecimento à enzima de restrição *AccI*, permitindo caracterizar os isolados A e B por análise CAPS, obtendo-se após restrição, para os isolados do grupo A uma banda com cerca de 449 pb e para os isolados do grupo B, duas bandas, uma 168 pb e outra com 281 pb.

Ao relacionar os diferentes níveis de severidade da doença oídio, com o grupo genético a que cada isolado pertencia, foi possível caracterizar um conjunto de

semelhanças e diferenças, no modo como o fungo interagia com o seu hospedeiro, e portanto, melhor caracterizar a sua patogenicidade (*vide* ponto 2 anterior).

8.3 Detecção por NAS-PCR – ‘Nested Allele-Specific PCR’ de mutações no gene *CYP51* de *E. necator*

Esta reacção, envolve dois conjuntos de ‘primers’, utilizados em duas amplificações sucessivas de reacção em cadeia da polimerase, sendo a segunda destinada a amplificar um alvo secundário da primeira corrida do produto.

O DNA alvo sofre a primeira reacção de PCR com um primeiro par de ‘primers’ e apenas é obtido a sequência prevista. Este produto da primeira reacção, sofre uma segunda amplificação com um segundo par de ‘primers’. É muito improvável que qualquer produto de PCR obtido contenha os locais de ligação para ambos os ‘primers’ novos, garantindo desta forma que o segundo produto de PCR tenha pouca contaminação de produtos indesejados de dímeros de ‘primer’, como por vezes acontece utilizando apenas PCR (a partir da Internet: <http://wikipedia.org/>).

DÉLYE *et al.*, em 1997, ao estudar as mutações do gene 14 α -desmetilase de *E. necator* e a sua correlação a isolados resistentes a DMI’s (*vide* ponto 5.3.2 – B anterior), aplicou esta técnica. Primeiramente amplificou o gene *CYP51* por PCR utilizando um par de ‘primers’ C14 e C14R, e depois utilizando outro par de ‘primers’ MUT1 e U14DM, amplificou uma parte da sequência deste gene – ‘Allele-specific PCR’. A (FIG. II.17) ilustra como esta técnica funciona dentro do gene.

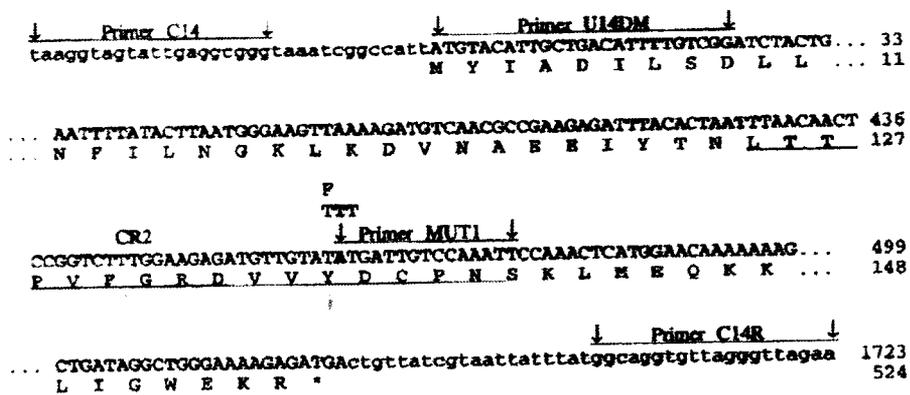


FIG. II.17 – Sequência de aminoácidos do gene P-450_{14DM} de *E. necator*. A sequência nucleótida está numerada relativamente à primeira base do codão de iniciação ATG, e o número á direita de cada linha representa a posição do último

nucleótido ou resíduo de aminoácido nessa linha. O truncamento da sequência é indicada por asterisco. A parte conservada do gene CR2, está sublinhada, e as posições dos 'primers' de PCR C14, C14R, U14DM e MUT1 estão indicados acima da sequência do nucleótido. O codão modificado e a respectiva sequência de aminoácidos encontrada nos genes P-450_{14DM} mutantes de isolados resistentes é dada acima da sequência. O nucleótido substituído está indicado a negrito ([1] DÉLYE *et al.*, 1997);

O fragmento obtido após amplificação com os 'primers' C14 e C14R tem 1756 pb. Este fragmento pode ser depois sujeito a uma nova reacção de PCR com os 'primers' U14DM e MUT1 e obtém-se um fragmento com cerca de 476 pb. Os isolados em que se obtinham amplificação com o segundo par de 'primers' eram considerados resistentes aos DMI's. Numa escala de 0 a 10 de factor de resistência, possuíam valores iguais ou superiores a 5. A (FIG. II.18) ilustra as amplificações desses isolados no estudo de DÉLYE *et al.*, em 1997.

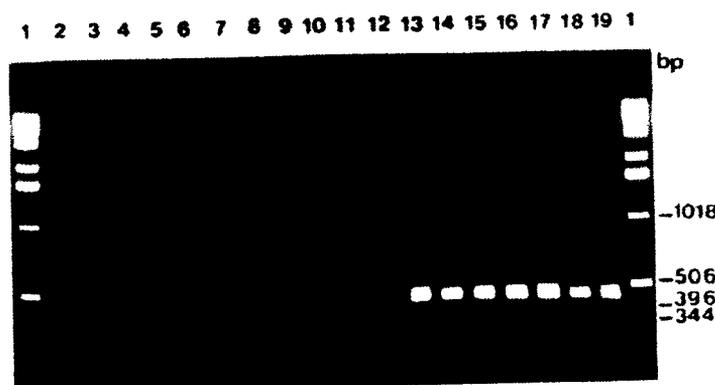


FIG. II.18 – Produtos de amplificação NAS-PCR do gene P-450_{14DM} de DNAs extraídos a partir de isolados sensíveis e resistentes ao triadimenol de *E. necator*, usando os 'primers' U14DM e MUT1. Amostras: 1 – marcador (1-kb DNA ladder; Gibco-BRL); 2 – (H₂O) controlo negativo sem DNA; 3 – vários fungos, de folhas de videira colhidas no campo, que cresceram em placas de agar com dextrose da batata; 4 a 8 – isolados sensíveis ao triadimenol; 9 a 12 – isolados resistentes com nível de resistência inferior a 5; 13 a 19 - isolados resistentes com nível de resistência superior a 5.

Esta mesma técnica foi usada num estudo realizado por AMRANI e CORIO-COSTET em 2006, para o fungo *E. necator*, em que foram descritos dois grupos genéticos em vinhas europeias (grupo A e B). Ao analisar a população deste patógeno com relação ao polimorfismo na sequência do gene β -tubulina, que distingue dois grupos de isolados, uma nova ferramenta foi desenvolvida por estes autores para estudos epidemiológicos e estudos de população, testados na vinha. Como em muitos ascomicetas, o gene β -tubulina de *E. necator* (Entub) codifica uma proteína com 447 aminoácidos. Um único polimorfismo de nucleótido (SNP) na região do intrão 3 do gene Entub permite distinguir os dois grupos genéticos (A e B). Este método foi utilizado para examinar as diferenças na

relação entre os dois grupos de um total de 289 isolados de oídio em amostras colhidas no início da estação do crescimento da videira, a partir de 'drapeaux' e de folhas com sintomatologia da doença em quatro vinhedos diferentes. O SNP na região intrão-3 do gene β -tubulina, semelhante ao de SNPs no gene *CYP51*, foi associado com os genótipos A e B de *E. necator* e confirmou a existência de duas populações simpátricas (isto é, populações de uma espécie parental única que habitam na mesma região geográfica, mas em que existe divergência genética, de modo a que essas populações de tornam espécies diferentes - a partir da Internet – <http://wikipedia.org/>) do patógeno nas vinhas francesas. As diferenças nas proporções relativas de cada grupo variou com a presença ou ausência dos sintomas em 'drapeaux' e com a região em que os isolados foram colhidos.

8.4 - Detecção por RAPD ('Random Amplification Polymorphic' de DNA) de grupos genéticos de *E. necator*

É um tipo de reacção de PCR, mas os segmentos de DNA que são amplificados são aleatórios. As reacções de RAPD são usadas para amplificar segmentos de DNA que normalmente são desconhecidos. A realização de um RAPD cria vários produtos arbitrariamente, pois a utilização de 'primers' curtos (8-12 nucleotídeos), e em seguida, com PCR, usando DNA genómico vai amplificar diferentes fragmentos. Revelando os padrões resultantes, um perfil semi-original pode ser obtido a partir de uma reacção de RAPD (a partir da Internet: <http://wikipedia.org/>).

Nenhum conhecimento da sequência do DNA para o gene alvo é necessária. Isso torna o método popular para comparar o DNA dos sistemas biológicos que não tiveram a atenção da comunidade científica, ou em um sistema no qual as sequências de DNA são relativamente poucas comparadas. Nos últimos anos, a técnica RAPD tem sido utilizada para caracterizar e traçar a filogenia de plantas e espécies animais diferentes (a partir da Internet: <http://wikipedia.org/>).

Porque a RAPD trabalha numa grande sequência de DNA, tem algumas limitações na utilização de amostras de DNA degradado. Para além disso, o seu poder de resolução é fraco. Muitas vezes, esta técnica é usada para amplificar uma sequência conhecida de DNA. Assim, os cientistas escolhem a sequência que querem ampliar, em seguida, projectam e fazem 'primers' que fortalecerá a sequência de interesse. Assim, o PCR leva à amplificação de um segmento específico do DNA (a partir da Internet: <http://wikipedia.org/>).

DÉLYE *et al.* ([3] 1997) analisaram 90 isolados de oídio da videira (*E. necator*) da Europa (62) e Índia (28). 10 dos 62 isolados europeus foram obtidos a partir de micélio presente nos gomos dormentes ('drapeaux'). Usando RAPD, foram amplificados tipos de isolados diferentes, evidenciando variação genética. 41 dos isolados europeus, incluindo 'drapeaux' eram do tipo +, e 21 do tipo -. Todos os isolados provenientes da Índia pertenciam ao tipo -. Análises baseadas em 414 'amplicons' revelaram a existência de 3 grupos principais. A maioria dos isolados europeus (53) foi agrupada em conjunto. 9 isolados de 'drapeaux' foram agrupados num segundo grupo distinto. Estes isolados, que coexistiam com outros isolados no campo, representavam um biótipo genético diferenciado de *E. necator*. Os isolados provenientes da Índia foram agrupados em 2 grupos – o primeiro grupo (15 isolados) pertencente a um subgrupo do grupo contendo isolados europeus não provenientes de 'drapeaux'; o segundo grupo (12 isolados) era distinto de todos os outros grupos. Estes dois grupos de isolados da Índia representam populações genéticas isoladas e com diferentes tolerâncias climáticas. Um par de 'primers' derivado de um fragmento específico de RAPD nos isolados Indianos, evidencia a importância de se efectuarem mais estudos no futuro.

DÉLYE *et al.* ([3] 1997), para além do objectivo de obter um número de marcadores genéticos desejável para se realizarem estudos acerca da epidemiologia do oídio, propuseram-se também analisar se existiam diferenças genéticas significativas entre isolados de *E. necator* na forma sexuada (micélio) e na forma assexuada (cleistotecas). Este facto é importante devido à ocorrência de recombinação genética durante a reprodução sexuada, e na forma como poderá contribuir na evolução das populações de oídio na videira, existindo consequências na sua evolução e comportamento perante os fungicidas. Os resultados obtidos, sugerem que a incompatibilidade sexual em *E. necator* pode resultar quer na ausência de formação de cleistotecas (facto paralelo com a maioria de um dos tipos de isolados), quer na formação de cleistotecas estéreis (facto paralelo aos isolados provenientes de 'drapeaux').

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Material Vegetal

Os isolados do fungo *E. necator*, utilizados neste trabalho, foram obtidos a partir de material vegetal (folhas e/ou bagos) com sintomatologia sugestiva da doença oídio da videira. Estes isolados foram colhidos a partir de plantas de *V. Vinífera* de diferentes castas, em vinhas de várias localidades, em diferentes fases do seu período vegetativo, ao longo do ano de 2009.

Destes isolados, 8 pertenciam à fase de 'drapeaux' e os restantes 52 a estados vegetativos mais avançados, tendo a colheita das amostras sido feita até à fase de cacho fechado. Todos os isolados foram recolhidos a partir de castas viníferas, à excepção de um dos isolados, que pertence a uma casta de uva de mesa – Dona Maria. Este isolado foi recolhido, pelo facto de esta parcela não ter sido sujeita a aplicação de nenhum fungicida, e com o objectivo de comparar a existência ou não de variabilidade genética, em relação aos restantes isolados que foram sujeitos a alguns tratamentos fitossanitários, sobre os quais não nos foi possível obter informações. Tendo por objectivo estudar os isolados na região do Alentejo, foram recolhidas as amostras das seguintes sub-regiões: 33 do Alentejo Central, 19 do Baixo Alentejo, 5 do Alto Alentejo, 2 do Alentejo Litoral e 1 da sub-região do Oeste. Estes 60 isolados foram identificados de acordo com que é referido no QUADRO III.1.

QUADRO III.1: Identificação de Amostras.

N.º da Amostra	Data de Colheita da Amostra	Casta	Local	Região
1	27/5/2009	Alicante Bouschet	S. Miguel de Machede	Alentejo Central
2	25/5/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central
3	27/5/2009	Roupeiro/Síria	S. Miguel de Machede	Alentejo Central
4	27/5/2009	Aragonez	S. Miguel de Machede	Alentejo Central
5	23/5/2009	Trincadeira	Vila Nova da Baronia	Baixo Alentejo
6	23/5/2009	Aragonez	Vila Nova da Baronia	Baixo Alentejo
7	25/5/2009	Aragonez	Évora	Alentejo Central
8	25/5/2009	Trincadeira	Alandroal	Alentejo Central
9	25/5/2009	Roupeiro	Orada – Borba	Alentejo Central
10	23/5/2009	Trincadeira	Pias	Baixo Alentejo

11	23/5/2009	Castelão	Pias	Baixo Alentejo
12	23/5/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo
13	23/5/2009	Aragonez	Souzel	Alentejo Central
14	6/5/2009	Periquita	Borba	Alentejo Central
15	6/5/2009	Periquita	Borba	Alentejo Central
16	6/5/2009	Carignan	Borba	Alentejo Central
17	6/5/2009	Carignan	Borba	Alentejo Central
18	6/5/2009	Carignan	Borba	Alentejo Central
19	6/5/2009	Castelão	Campo Maior	Alto Alentejo
20	16/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo
21	16/6/2009	Castelão	Pias	Baixo Alentejo
22	16/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo
23	18/6/2009	Trincadeira	S. Miguel de Machede	Alentejo Central
24	9/6/2009	Trincadeira	Torrão	Alentejo Litoral
25	18/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo
26	18/6/2009	Aragonez	S. Miguel de Machede	Alentejo Central
27	18/6/2009	Trincadeira	Pias	Baixo Alentejo
28	18/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo
29	18/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo
30	16/6/2009	Trincadeira	Pias	Baixo Alentejo
31	19/6/2009	Aragonez	Souzel	Alentejo Central
32	16/6/2009	Trincadeira	Pias	Baixo Alentejo
33	18/6/2009	Roupeiro/Síria	S. Miguel de Machede	Alentejo Central
34	19/6/2009	Trincadeira	Souzel	Alentejo Central
35	19/6/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central
36	18/6/2009	Roupeiro/Síria	S. Miguel de Machede	Alentejo Central
37	16/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo
38	18/6/2009	Trincadeira	Pias	Baixo Alentejo
39	17/6/2009	Trincadeira	Campo Maior	Alto Alentejo
40	17/6/2009	Trincadeira	Campo Maior	Alto Alentejo
41	24/6/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central
42	24/6/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central
43	24/6/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central
44	23/6/2009	Aragonez	Alenquer	Oeste
45	17/6/2009	Trincadeira	Campo Maior	Alto Alentejo
46	16/6/2009	Trincadeira	Matriz – Borba	Alentejo Central
47	16/6/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central
48	18/6/2009	Aragonez	S. Miguel de Machede	Alentejo Central
49	16/6/2009	Trincadeira	Estremoz	Alentejo Central

50	17/6/2009	Trincadeira	Campo Maior	Alto Alentejo
51	18/6/2009	Trincadeira	Pias	Baixo Alentejo
52	23/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo
53	23/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo
54	23/6/2009	Trincadeira	Torrão	Alentejo Litoral
55	25/5/2009	Aragonez	Reguengos	Alentejo Central
56	25/5/2009	Trincadeira	S. Miguel de Machede	Alentejo Central
57	4/7/2009	Dona Maria	Évora	Alentejo Central
58	26/6/2009	Trincadeira	Arcos - Estremoz	Alentejo Central
59	26/6/2009	Trincadeira	Rio de Moinhos – Estremoz	Alentejo Central
60	23/6/2009	Aragonez	Nora - Borba	Alentejo Central
CPA	Controlo Positivo de isolado <i>E. necator</i> do Grupo genético A enviado pela Dr. ^a Marie-France Corio-Costet do INRA			
CPB	Controlo Positivo de isolado de <i>E. necator</i> do Grupo genético B enviado pela Dr. ^a Marie-France Corio-Costet do INRA			
CP1	Controlo Positivo de isolado <i>E. necator</i> enviado pelo Dr. François Demotte do INRA			
CP2	Controlo Positivo de isolado <i>E. necator</i> enviado pelo Dr. François Demotte do INRA			
CP3	Controlo Positivo de isolado <i>E. necator</i> enviado pelo Dr. François Demotte do INRA			

1.1. Preparação do Material Vegetal

No campo, recolheu-se para sacos plásticos hermeticamente fechados, folhas e/ou cachos com sintomatologia sugestiva de infecção por *E. necator*. Cada planta foi considerada uma amostra, e identificada com o nome da casta, local e data de colheita. Todas as amostras foram transportadas para o laboratório numa arca refrigeradora.

Com a ajuda de uma lupa de bancada, foram observadas e fotografadas as manchas suspeitas de infecção por *E. necator*, para assim seleccionar e recolher pequenos fragmentos com áreas de cerca de 2mm² das folhas e/ou película de bagos, com a presença do fungo. Os pedaços de material vegetal obtidos, correspondentes a cada uma das amostras, foram colocados em microtubos de 1,5 mL.

2. Extracção do DNA

O protocolo utilizado resultou da optimização prévia de vários parâmetros, do método descrito por MONTARRY *et al.* (2009).

Para a extracção do DNA do fungo, adicionou-se 600 µl de tampão CTAB (Tris 2M pH8; EDTA 0.5M pH8; 41g NaCl) a 65°C, a cada uma das amostras contidas nos

microtubos de 1,5 mL. Após uma agitação rápida com 'vortex' (L46, LABINCO), mantiveram-se os microtubos a 65°C durante 1h no termobloco (THERMOSTAT PLUS, EPPENDORF). Após a incubação, adicionaram-se 400 µl de Clorofórmio-Alcoól Isoamílico (24:1) com agitação suave à mão, durante 10 min., e posteriormente foram colocadas numa centrifuga de bancada (CENTRIFUGE 5415 R DA EPPENDORF), a 4°C e a 13000 rpm durante 10 min.. Da fase aquosa, foram recolhidos cerca de 500 µl para um novo microtubo de 1,5 mL, para realização de uma segunda extracção no sentido de purificar a nossa amostra, removendo as suspensões sólidas ainda existentes. Assim, adicionou-se 400 µl de tampão CTAB, agitando suavemente à mão durante aproximadamente 30 seg. Adicionaram-se 400 µl de Clorofórmio-Alcoól Isoamílico (24:1) com agitação suave à mão durante 10 min. e posteriormente, foram colocadas na centrifuga de bancada a 4°C e a 13000 rpm a durante 10 min. Foi recolhida a fase aquosa, obtendo um volume de aproximadamente 900 µl, e colocada num novo microtubo de 1,5 ml. Adicionou-se 600 µl de Isopropanol frio (-20°C), agitando depois a mistura durante 10 min.. A precipitação do DNA foi feita a -20°C durante a noite. No dia seguinte, os tubos com o DNA precipitado foram centrifugadas a 13000 rpm e a 4°C durante 10 min., de modo a recolher todo o DNA no fundo do microtubo, tendo-se descartando o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 800 µl de etanol a 70%. Após nova centrifugação a 4°C e a 13000 rpm durante 10 min., o sobrenadante foi eliminado, e o precipitado obtido foi deixado a secar durante 1h à temperatura ambiente. Por fim, o precipitado obtido foi ressuspenso em 50 µl de água miliQ.

A concentração de DNA obtida foi medida com um fluorómetro da marca Qubit™ Fluorometer (INVITROGEN).

Os microtubos com a suspensão de DNA foram guardadas no congelador a -20°C.

3. Identificação de isolados do Grupo A e do Grupo B

3.1. Amplificação por Reacção da Polimerase em Cadeia (PCR) de um fragmento do gene da β -tubulina

O método utilizado para diferenciar os grupos genéticos A e B de *E. necator* foi baseado em PCR, tendo-se para isso amplificado uma região do gene da β -tubulina com cerca de 450 pb. O protocolo utilizado inicialmente (MONTARRY *et al.* 2009) não permitiu

resultados satisfatórios nas nossas condições e por isso optimizou-se um procedimento experimental diferente.

Num volume total de reacção de 50 µl contendo, 1 µl da amostra de DNA numa diluição de 1:3 (v/v), 5 µl de 10X Dream Taq Buffer (FERMENTAS), 0,2 mM de cada dNTP (FERMENTAS), 0,2 µM de cada 'primer' (EnTub-F: 5'-GCGAGATCGTAAGCTTGACAC-3' e EnTub-R: 5'-GGCACGAGGAACGTATTTGT-3') e 2,5 U Dream Taq DNA polymerase (FERMENTAS).

A reacção de amplificação no termociclador decorreu nas seguintes condições: com um primeiro passo de desnaturação a 96°C durante 3 min., seguido de 38 ciclos de 40 seg. a 96°C, 55 seg. a 58°C e 55 seg. a 72°C, a extensão final foi feita durante 5 min. a 72°C.

Os produtos amplificados foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1% e em 0,5x TBE (1x: 1M Tris-HCl, 0,83 M ácido bórico, 10 mM EDTA, pH7,5) e posteriormente observados num transiluminador com lâmpada UVsxt-20.M (UVITEC) depois de corados numa solução de 0,5 µg/ml de brometo de etídio (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Este protocolo resultou da optimização prévia de vários parâmetros, tais como: quantidades de DNA em solução diluída 1:3 (v/v) (1, 2, 3 e 5 µl); diferentes diluições de DNA (1:10 e 1:20 (v/v)); variação da concentração de cada dNTP (0,4 mM); variação da marca comercial de cada dNTP (INVITROGEN); variação da concentração de cada 'primer' (0,15 µM); desnaturação dos 'primers' a 96°C durante 10 min.; variação da marca comercial de Taq DNA polymerase (INVITROGEN); adição de MgCl₂ (0,9, 1 e 1,5 mM); adição de PVP-49 1x (5 µl); utilização de diferentes temperaturas de hibridação dos 'primers' (55, 56, 57, 62°C); variação da temperatura de desnaturação (94°C) e respectivo tempo (5 min.); variação do número de ciclos (35 ciclos); variação dos tempos de 'annealing' (30 seg. e 1 min.); variação do tempo final nos ciclos de amplificação (55 e 90 seg.) e variação do tempo final de extensão (5 min.).

3.2. Polimorfismo da sequência amplificada e cortada ('Cleaved Amplified Polymorphism Sequence' – CAPS)

De modo a poder distinguir quais os isolados de oídio pertencentes ao grupo A e ao grupo B, os produtos de amplificação obtidos, de cerca de 450 pb, foram novamente sujeitos a electroforese em gel de agarose 0,8% em 0,5x TAE low EDTA (40 mM Tris-

acetate, pH 8,0 0,1 mM Na₂EDTA) e visualizados como descrito no ponto 3.1 anterior. Este procedimento prévio teve como objectivo, aumentar a quantidade de DNA, uma vez que se juntou o produto de várias amplificações. Após a sua visualização, as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados, foram cortadas do gel com um bisturi e depois purificadas com o 'MinElute Gel extraction kit' (QIAGEN), seguindo-se as instruções do fabricante. A coluna foi eluída com 10 µl de água miliQ.

Após a purificação do fragmento de 450 pb, todo o volume obtido, 10 µl, foi sujeito a restrição com a enzima *Xmi I* (FERMENTAS). Para a reacção de restrição foi utilizada num volume total da reacção de 20 µl, 2 µl de tampão B 1x (FERMENTAS). A reacção decorreu durante 1h e 30 min. a 37°C tendo sido feita depois a inactivação da enzima durante 20 min. a 65°C. O produto da restrição foi depois sujeito a electroforese em gel de agarose nas condições descritas no ponto 3.1 anterior.

4. Identificação de isolados resistentes aos DMI's

4.1. – Amplificação por Reacção da Polimerase em Cadeia (PCR) do gene da 14α-demetilase (*CYP51*) de *E. necator*

De modo a identificar quais os isolados de oídio resistentes aos DMI's amplificou-se o gene da *CYP51*. Para isso utilizaram-se os 'primers' C14 (5'-TAAGGTAGTATTGAGGCGGG) e C14R (5'-TTCTAACCCCTAACACCTGC) (DÉLYE *et al.*, 1997), que correspondem às extremidades da sequência de 1683 pb do gene codificado P-450_{14DM} do fungo *E. necator*, com a utilização destes 'primers' obtém-se, após amplificação, um fragmento de 1756 pb. Neste estudo foi utilizado o método descrito por DÉLYE *et al.* (1997) com ligeiras alterações.

Num volume total de reacção de 50 µl contendo, 1 µl da amostra de DNA numa diluição de 1:3 (v/v), 5 µl de 10X PCR Rxn Buffer (- MgCl₂) (INVITROGEN), 0,2 mM de cada dNTP (INVITROGEN), 1,5 mM de MgCl₂ (INVITROGEN), 0,15 µM de cada 'primer' C14 e C14R 2,5 U Taq DNA Polymerase (INVITROGEN).

A reacção de amplificação no termociclador decorreu nas seguintes condições: com um primeiro passo de desnaturação a 94°C durante 3 min., seguido de 37 ciclos de 45 seg. a 94°C, 1 min. a 55°C e 2 min. a 72°C, a extensão final foi feita durante 10 min. a 72°C.

Os produtos amplificados foram submetidos a electroforese num gel de agarose (como descrito no ponto 3.1 anterior).

4.2. – ‘Nested Allele-Specific PCR’ (NAS-PCR)

O produto amplificado obtido no ponto 4.1 anterior, foi depois sujeito a uma reamplificação com a utilização de um par de ‘primers’ internos à sequência amplificada. O ‘primer’ reverso utilizado, MUT1 (5’-AATTGGACAATCAA) que foi desenhado especificamente para iniciar sequências do gene P-450_{14DM} exibindo uma mutação de A (Adenina) por T (Timina) no nucleótido 462 vai originar a alteração do aminoácido F (Fenilalanina) por T (Tirosina) na posição 136 (*vide* FIG. II.16 do capítulo anterior). Este ‘primer’ utilizado em reacções de amplificação de PCR juntamente com o ‘primer’ directo U14DM (5’-ATGTACATTGCTGACATTTTGTCTGG), que tem como alvo as primeiras 25 bases da sequência codificada do gene P-450_{14DM} do fungo *E. necator*, amplifica um fragmento de DNA de 476 pb.

O protocolo utilizado foi o descrito por DÉLYE *et al.* (1997), tendo-se realizado segundo o procedimento descrito no ponto 4.1 anterior, com excepção da temperatura de ‘annealing’ utilizada, que foi de 50°C. Os produtos amplificados foram submetidos a electroforese num gel de agarose (como descrito no ponto 3.1 anterior).

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Observações realizadas à lupa binocular durante a preparação do Material Vegetal

As folhas obtidas no campo e observadas à lupa binocular mostraram algumas das estruturas típicas do fungo *E. necator*. É possível observar o micélio do fungo (FIG. IV.1) e as estruturas observadas mostraram ser constituídas principalmente pelas hifas vegetativas (FIG. IV.2), pelas hifas reprodutivas assexuadas, conidióforos e pelos esporos, conídios (FIG. IV.3). Estas estruturas correspondem às descritas por vários autores, como as correspondentes ao início da fase vegetativa da videira, altura em que se fizeram as colheitas das amostras (GOHEEN *et al.*, 2001, AGRIOS 2005).

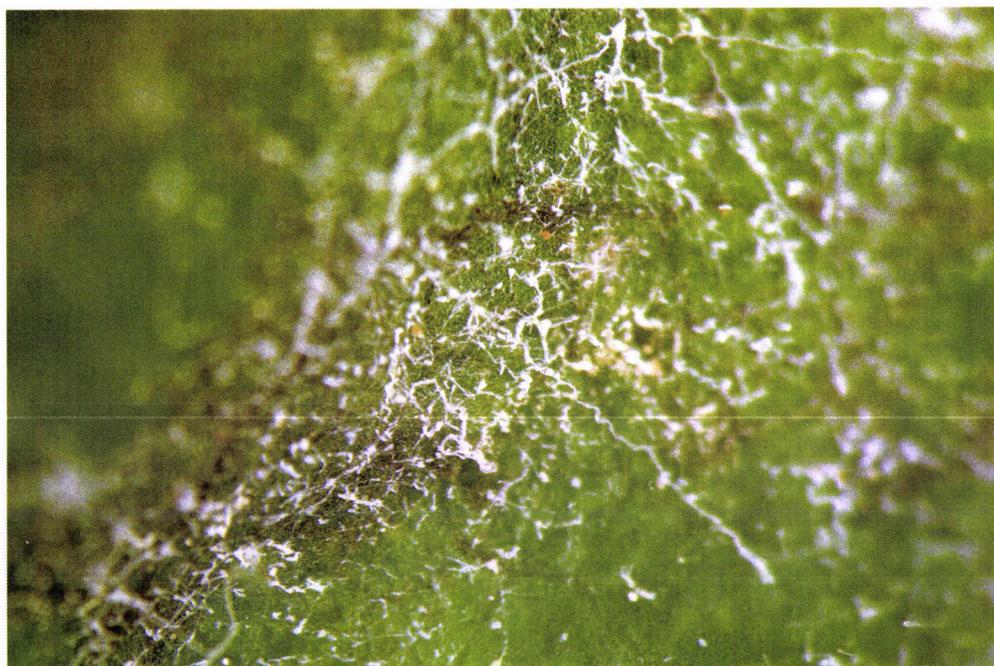


FIG. IV.1 – Foto de micélio de *E. necator* numa folha de videira

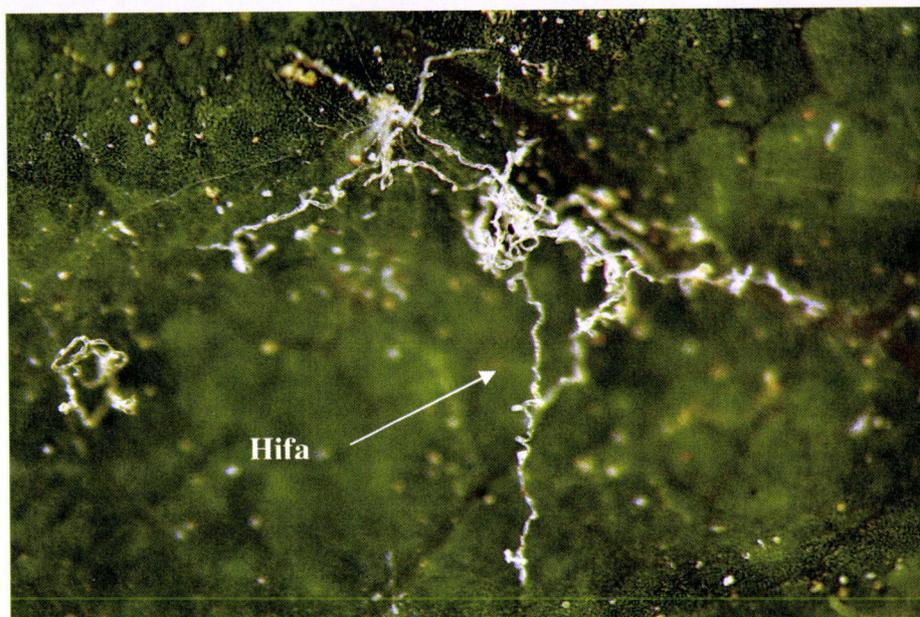


FIG. IV.2 – Foto em que se observam hifas do fungo *E. necator* numa folha de videira



FIG. IV.3 – Foto de uma folha de videira com sintomatologia de oídio. Podem observar-se conidióforos (A) e conídios em cadeia (B);

2. Quantificação do DNA Total

A quantidade de DNA total obtido a partir de cada amostra vegetal foi muito variável tendo-se obtido valores variáveis entre os 0,070 $\mu\text{g/mL}$, como no caso da amostra n.º 29, e 9,910 $\mu\text{g/mL}$, na amostra n.º 58 (QUADRO IV.1). A enorme variação nas

quantidades de DNA obtidas podem estar relacionadas com o nível de infecção, uma vez que algumas folhas estavam claramente mais infectadas do que outras. Pode também ter-se devido ao método de extracção, pois apesar do método não necessitar de maceração dos tecidos vegetais, estes foram cortados em pequenos pedaços a partir de folhas e de bagos verdes, o que permitiu libertar uma quantidade adicional de DNA de planta. Para além disso, e tratando-se de um método de extracção de DNA total, nele pode também estar contido DNA de outros fungos e microorganismos presentes na amostra.

QUADRO IV.1: Quantificação de DNA das Amostras por Qubit™ Fluorometer (INVITROGEN);

N.º da Amostra	Quantificação Real (µg/ml)	N.º da Amostra	Quantificação Real (µg/ml)
1	0,221	31	0,957
2	0,383	32	0,143
3	0,388	33	0,166
4	0,544	34	0,096
5	0,418	35	0,606
6	0,568	36	0,126
7	0,226	37	0,297
8	0,276	38	0,163
9	0,681	39	0,209
10	0,296	40	0,149
11	0,698	41	1,110
12	0,226	42	3,300
13	0,343	43	4,910
14	0,697	44	0,246
15	0,419	45	0,191
16	0,486	46	0,192
17	1,520	47	0,300
18	0,557	48	0,201
19	2,270	49	1,150
20	0,303	50	0,229
21	0,108	51	0,302
22	0,219	52	1,320
23	0,096	53	0,607
24	0,068	54	0,335
25	0,081	55	0,564
26	0,092	56	0,590
27	1,320	57	0,946
28	0,344	58	9,910
29	0,070	59	4,380
30	0,116	60	0,113

3. Identificação de isolados do Grupo A e do Grupo B

3.1. – Amplificação de um fragmento do gene da β -tubulina por Reacção da Polimerase em Cadeia (PCR)

A amplificação do fragmento de 450 pb do gene da β -tubulina apenas foi conseguida em 10 das 60 amostras disponíveis. Inicialmente, com a utilização de um protocolo semelhante ao descrito por MONTARRY *et al.* (2009) e que diferiu apenas na utilização da enzima Dream Taq (FERMENTAS) e o respectivo tampão obtiveram-se bons resultados, as bandas apresentaram o tamanho esperado e não eram visíveis, em gel de agarose, a presença de produtos inespecíficos. No entanto, das 12 amostras utilizadas apenas se obteve produto de amplificação na amostra n° 15 e no controlo positivo (FIG. IV.4).

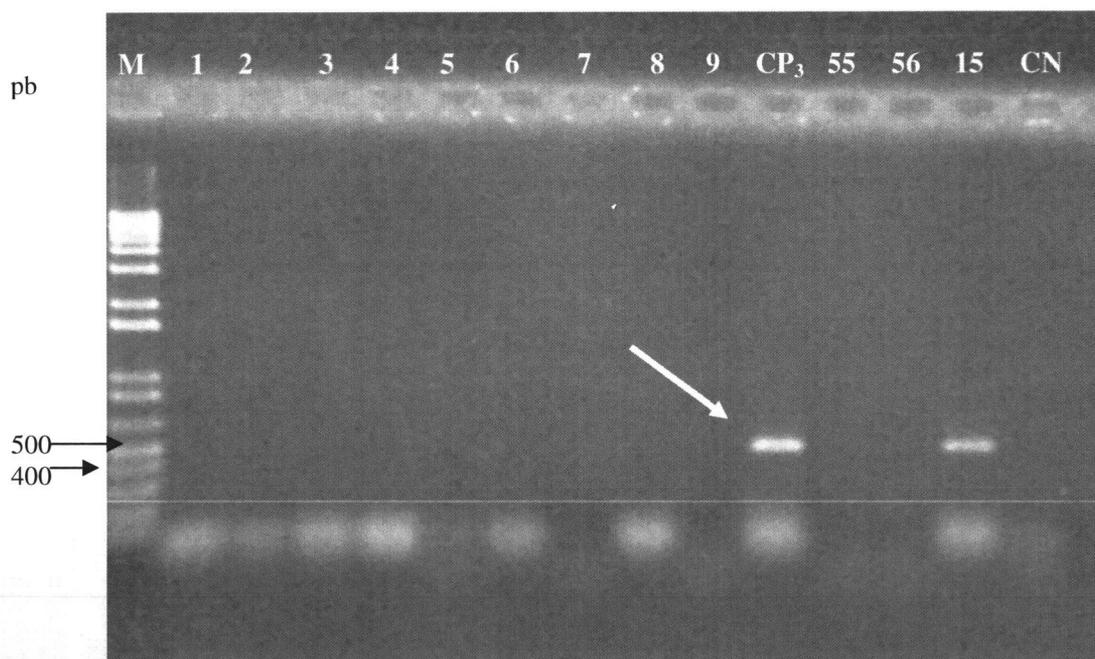


FIG. IV.4 – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação de um fragmento de 450 pb do gene da β -tubulina. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 55 e 56 – amostras em que se utilizou DNA total; CN – controlo negativo de PCR; CP₃ – controlo positivo gentilmente cedido pelo Dr. Delmotte do INRA. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (450 pb).

A partir desta reacção de amplificação, todas as outras que se seguiram utilizando este mesmo protocolo não revelaram a presença da banda de 450 pb. Os géis obtidos apresentaram grandes arrastamentos. Os resultados que se estavam a obter sugeriam a

insuficiência de $MgCl_2$, que poderia resultar de as amostras ainda conterem vestígios de EDTA, utilizado no protocolo de extracção, e de este quelatar o magnésio incluído no tampão da enzima (FERMENTAS). Também se optou por testar uma temperatura de hibridação dos ‘primers’ mais baixa, $56^\circ C$, de modo a diminuir a especificidade da ligação dos ‘primers’ à molécula de DNA, mas também não se obtiveram resultados satisfatórios, uma vez que apenas houve amplificação do controlo positivo e não se verificaram diferenças para a temperatura de hibridação dos ‘primers’ inicial os $58^\circ C$ (FIG. IV.5).

Pela observação do gel da FIG. IV.5 e de outros não apresentados em que apenas eram visíveis arrastamentos na zona compreendida entre os 100 e os 200 pb, pôs-se a hipótese do tempo de extensão final ser insuficiente e daqueles pequenos produtos serem resultados do produto esperado incompleto.

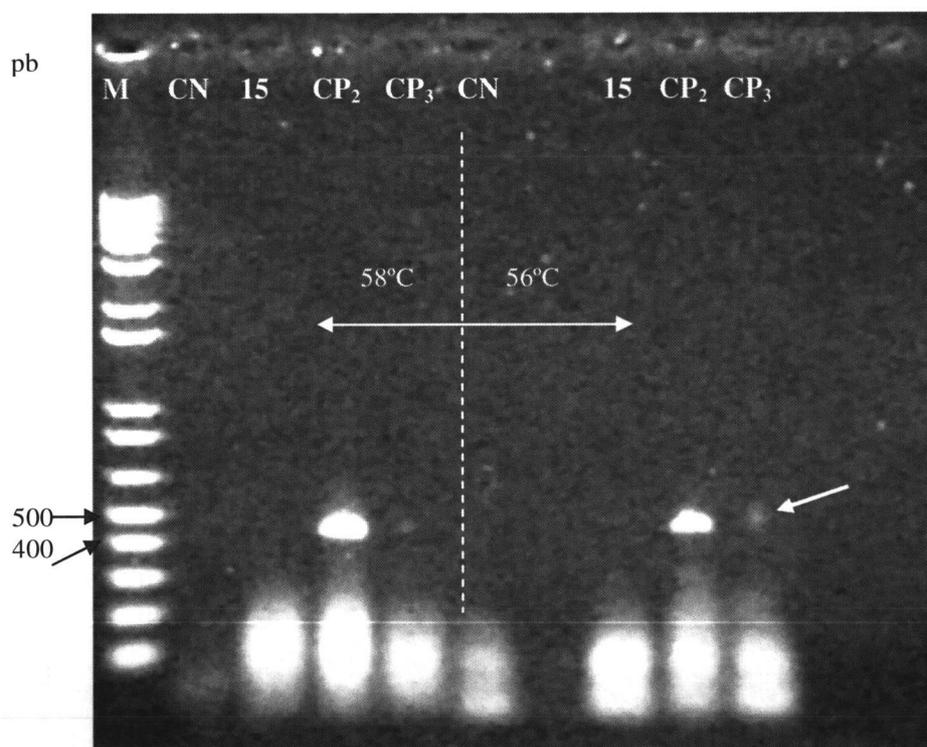


FIG. IV.5 – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação de um fragmento de 450 pb do gene da β -tubulina. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’(INVITROGEN); 15 – amostra em que se utilizou DNA total; CN – controlo negativo de PCR; CP₂ e CP₃ – controlos positivos gentilmente cedidos pelo Dr. Delmotte do INRA. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (450 pb).

Com o aumento do tempo de extensão final de 5 para 10 min. obteve-se amplificação uma vez mais apenas num dos controlos positivos CP₂ e obteve-se o mesmo

arrastamento em gel, só que desta vez também o controlo negativo constituído apenas por água MiliQ apresentava um arrastamento anormal (FIG. IV.6).

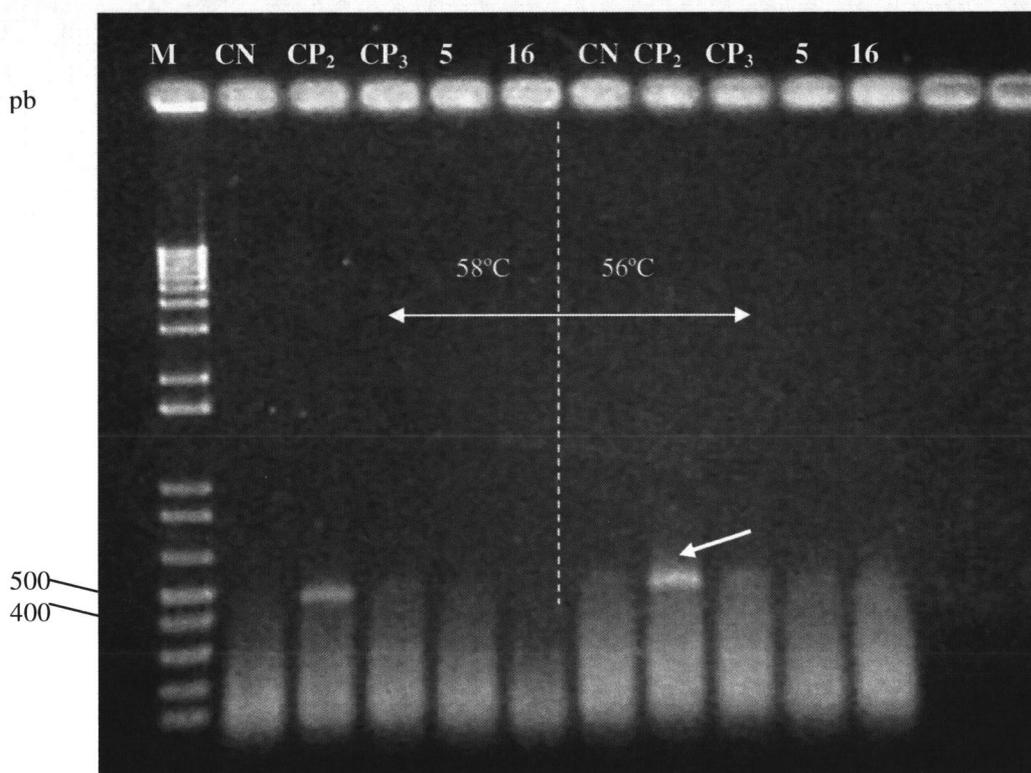


FIG. IV.6 – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene β -tubulina cujo fragmento tem aproximadamente 450 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 5 e 16 – amostras em que se utilizou DNA total; CN – controlo negativo de PCR; CP₂ e CP₃ – controlos positivos gentilmente cedidos pelo Dr. Delmotte do INRA. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (450 pb).

Da observação do resultado desta reacção de amplificação pensou-se que estávamos na presença de contaminação das amostras com DNA, pois o controlo negativo, sendo água, não deveria apresentar qualquer produto de amplificação. A utilização de dois controlos negativos, um idêntico ao usado na reacção anterior e outro em que se utilizaram ‘primers’ para o diagnóstico de OLV-1 (FÉLIX, 2007) permitiu demonstrar que não havia qualquer problema de contaminação das amostras por DNA estranho, uma vez que no controlo negativo de OLV-1 (CN_{OLV-1}) não se verificou nenhum arrastamento, correspondente a moléculas de DNA inespecíficas e de baixo peso molecular (FIG. IV.7). A diluição das amostras de 1:3 (v/v), de modo a tentar diminuir a eventual presença de substâncias inibidoras do PCR, mostrou-se eficaz para a obtenção dos produtos de amplificação esperados, tendo-se obtido as bandas com 450 pb nas amostras 17, 41, 42, 43, 49 e 52, no entanto não houve a diminuição de produtos inespecíficos (FIG. IV.7).

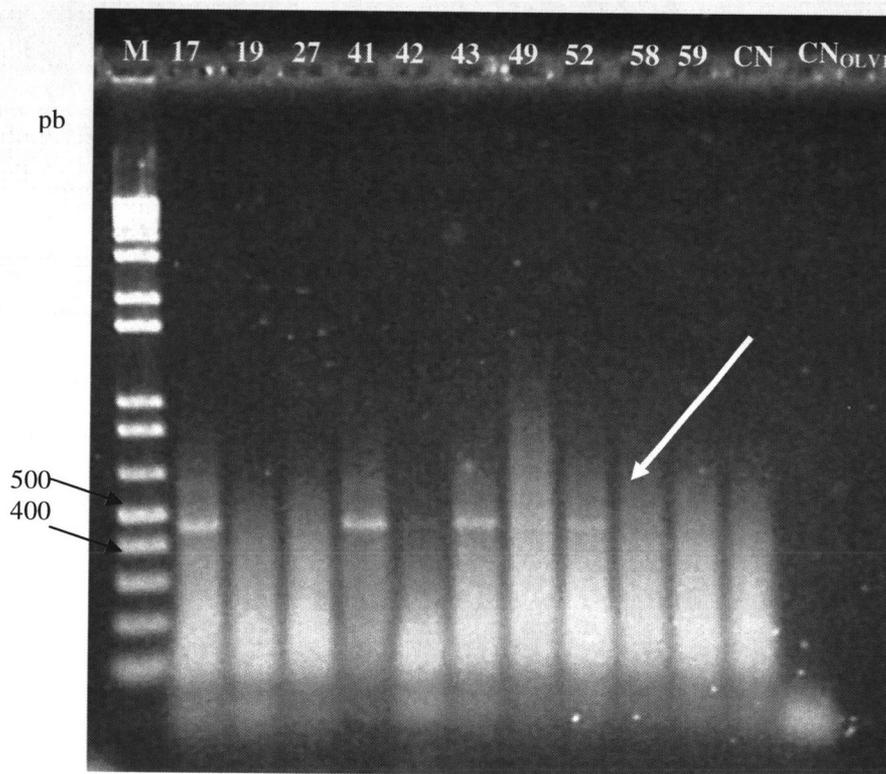


FIG. IV.7 – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene β -tubulina cujo fragmento tem aproximadamente 450 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 17, 19, 27, 41, 42, 43, 49, 52, 58 e 59 - amostras em que se utilizou DNA total; CN – controlo negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (450 pb).

Quando se aumentou a quantidade de DNA utilizado na reacção de PCR de 1 para 3 μ l, de modo a tentar aumentar a definição e intensidade dos produtos de amplificação, o resultado obtido foi apenas um aumento de intensidade dos produtos inespecíficos incluindo no controlo negativo. No entanto, nestas condições conseguiu-se a amplificação das amostras 35, 53, 18 e 41 (**FIG. IV.8**).

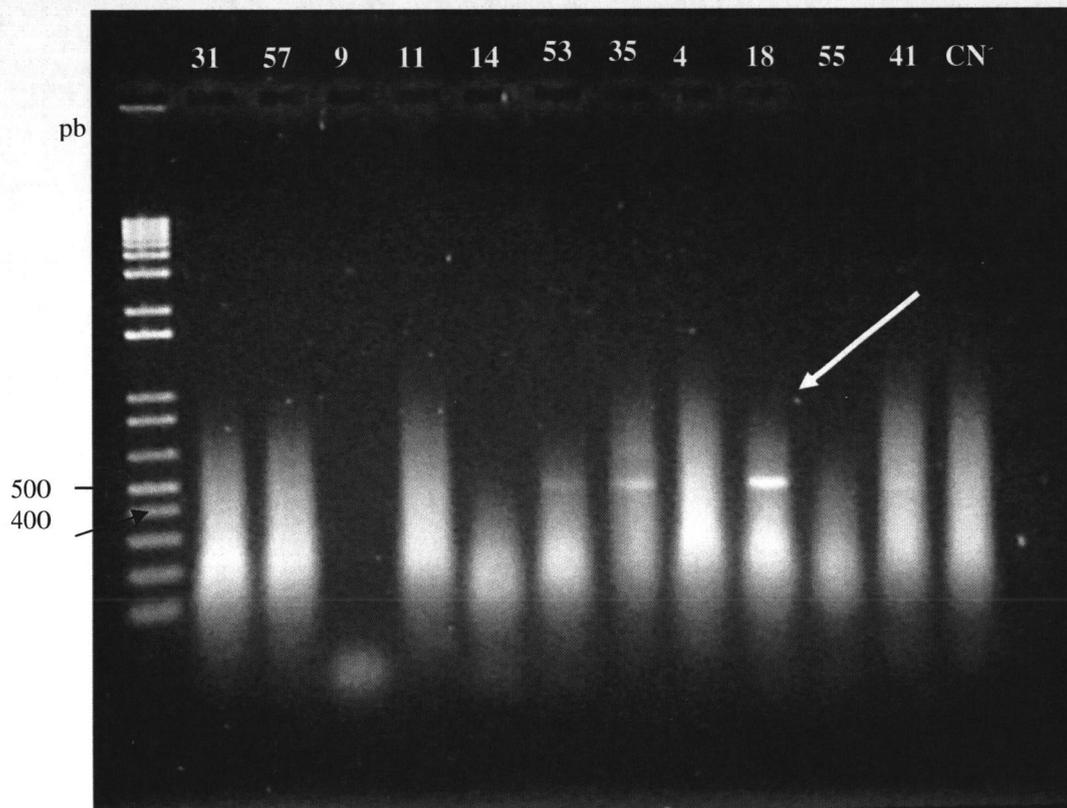


FIG. IV.8 – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene β -tubulina cujo fragmento tem aproximadamente 450 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 31, 57, 9, 11, 14, 53, 35, 4, 18, 55 e 41 - amostras em que se utilizou DNA total; CN – controlo negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (450 pb).

Os resultados insatisfatórios que se visualizavam após a electroforese em gel de agarose, e após várias tentativas de optimização poderiam ser devidos a uma conjugação inespecífica dos ‘primers’ com algum dos componentes do tampão da Taq DNA Polimerase, uma vez que continuávamos a ter produtos de amplificação não específicos no controlo negativo em que era utilizada apenas água MiliQ.

A utilização de diferentes diluições, sem diluição, 1:3 e 1:10 (v/v), bem como a utilização paralela de reagentes de duas marcas comerciais, FERMENTAS ou INVITROGEN, não mostrou qualquer diferença nos resultados obtidos como se pode verificar pela observação da **FIG. IV.9**. Esta mudança na marca comercial dos reagentes estava relacionada com a tentativa de se poder optimizar a quantidade de $MgCl_2$, uma vez que nos tampão da Taq DNA polimerase da INVITROGEN não vem magnésio adicionado, podendo testar-se as quantidades a aplicar.

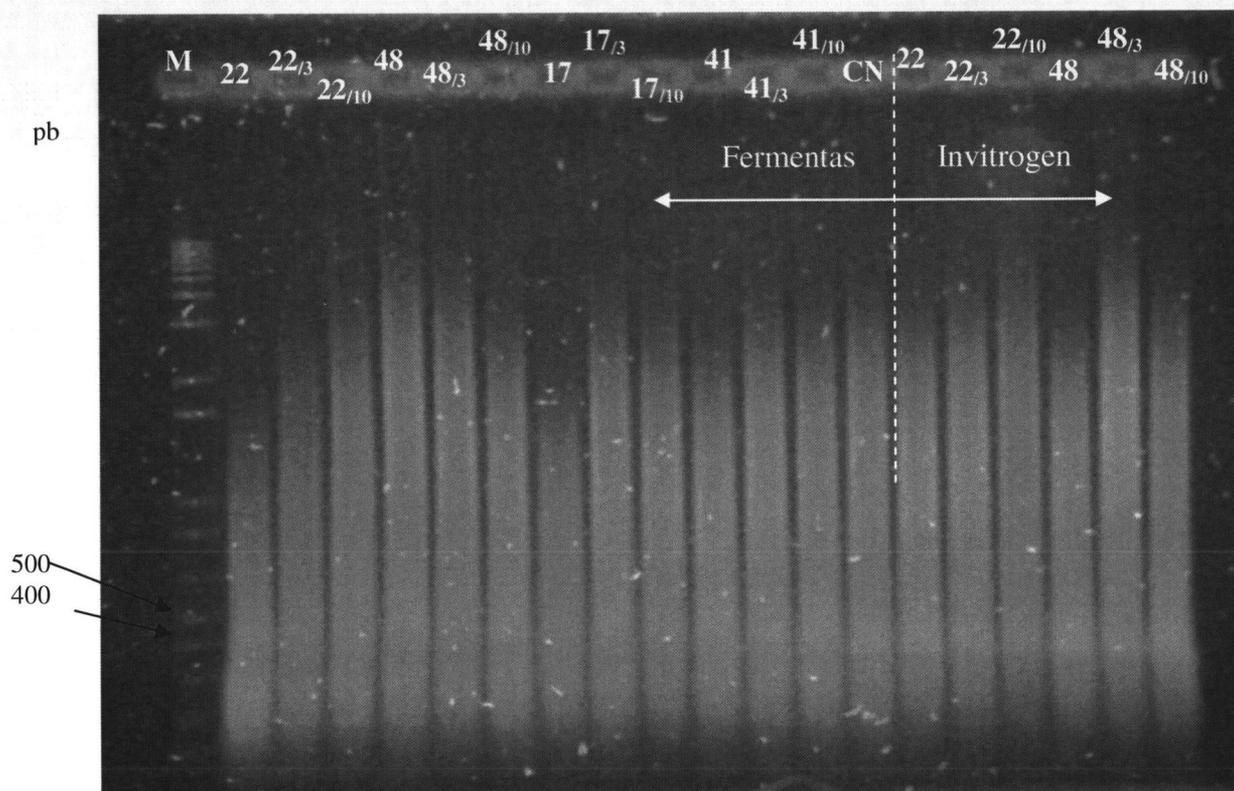


FIG. IV.9 – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene β -tubulina cujo fragmento tem aproximadamente 450 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 22, 48, 17 e 41 – amostras em que se utilizou DNA total não diluído; 22₃, 48₃, 17₃ e 41₃ – amostras em que se utilizou DNA total em solução diluída 1:3 (v/v); 22₁₀, 48₁₀, 17₁₀ e 41₁₀ – amostras em que se utilizou DNA total em solução diluída 1:10 (v/v); CN – controlo negativo de PCR.

A utilização do reagente PVP (polyvinyl-pyrrolidone), nas reacções de PCR teve como principal objectivo a melhoria dos resultados obtidos devido à sua acção antioxidante, uma vez que este reagente é utilizado correntemente por outros autores em reacções de PCR que utilizam DNA de fungos (HERRERA-VÁSQUEZ *et al.*, 2009). No entanto, a sua utilização nas nossas condições não melhorou os resultados obtidos, não se tendo obtido nenhum resultado produto de amplificação com o tamanho esperado de 450 pb, como se pode observar na **FIG. IV.10**.

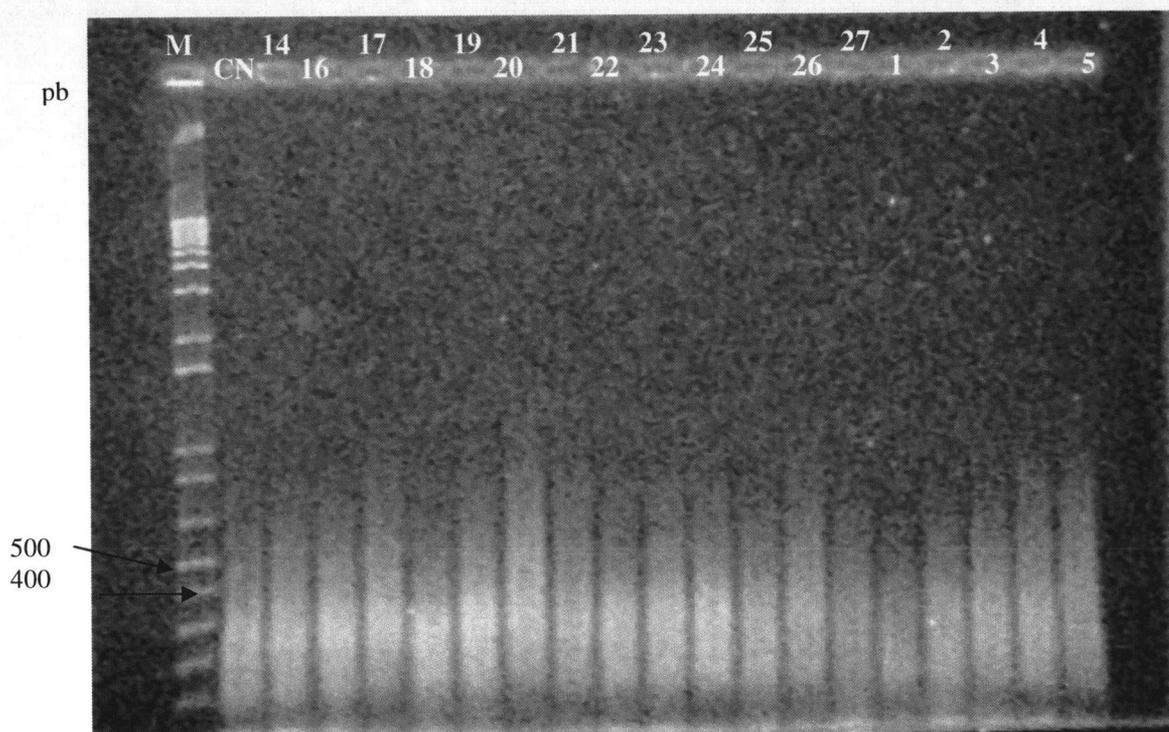


FIG. IV.10 – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene β -tubulina cujo fragmento tem aproximadamente 450 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 1, 2, 3, 4 e 5 – amostras em que se utilizou DNA total em solução diluída 1:3 (v/v); CN – controlo negativo de PCR.

As diversas alterações no método levaram a que se estabelecesse um protocolo final para a amplificação do fragmento de 450 pb do gene da β -tubulina. Neste protocolo a utilização dos reagentes da Invitrogen, a introdução de 1,5 mM de $MgCl_2$ e a utilização das amostras de DNA diluídas 1:3 (v/v) levou à amplificação das amostras 3, 35 e 41 (**FIG. IV.11**). Com a utilização deste protocolo conseguiu-se diminuir a quantidade de amplificações inespecíficas bem como a obtenção do controlo negativo limpo, em que apenas eram visíveis as bandas correspondentes aos ‘primers’ utilizados na reacção **FIG. IV.11**.

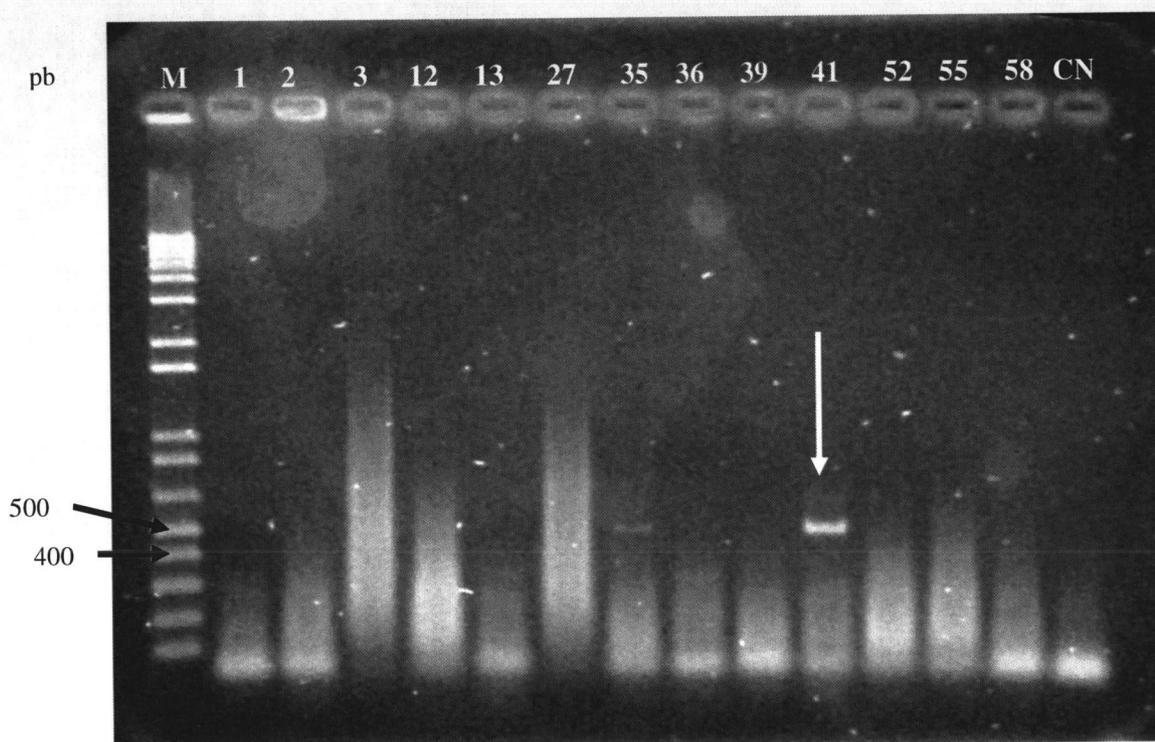


FIG. IV.11 – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene β -tubulina cujo fragmento tem aproximadamente 450 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 1, 2, 3, 12, 13, 27, 35, 36, 39, 41, 52, 55 e 58 – amostras em que se utilizou DNA total em solução diluída 1:3 (v/v); CN – controlo negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (450 pb).

Os diversos protocolos de PCR utilizados permitiram a amplificação da banda esperada dos 450 pb em apenas 11 das 60 amostras inicialmente obtidas do campo (QUADRO IV.2). Este resultado ficou muito aquém do esperado inicialmente. Tal pode ter-se ficado a dever a vários factores, tais como, uma possível contaminação das amostras com EDTA, contaminação das amostras com DNA de outros fungos que pudessem eventualmente estar presentes nas folhas e também à degradação do DNA total da amostra. Outros autores (AMRANI e CORIO-COSTET, 2006; MONTARRY *et al.*, 2009), não referem nos seus trabalhos qualquer tipo de problema com a amplificação das amostras embora os ‘primers’ utilizados por AMRANI e CORIO-COSTET (2006) sejam diferentes dos utilizados neste trabalho, que foram os mesmos utilizados por MONTARRY *et al.* (2009). Devido ao aparecimento de produtos inespecíficos também no controlo negativo, em que se utilizou apenas água MiliQ, e tendo-se comprovado a ausência de contaminação, julga-se que estas possam ser devidas ao emparelhamento dos ‘primers’ entre si, sintetizando assim pequenas moléculas de DNA com diferentes tamanhos que se vão amplificando com o decorrer dos ciclos e produzindo assim o arrastamento visível nos géis. Nas

amostras em que houve amplificação da banda esperada a quantidade de moléculas inespecíficas eram mais pequenas uma vez que os ‘primers’ teriam ligação preferencial na molécula de DNA alvo.

QUADRO IV.2: Amostras em que se obteve amplificação do fragmento de 450pb do gene da β -tubulina.

N.º da Amostra	Data de Colheita da Amostra	Casta	Local	Região	Presença da banda dos 450pb
3	27/5/2009	Roupeiro/Síria	S. Miguel de Machede	Alentejo Central	+
15	6/5/2009 – ‘drapeau’	Periquita	Borba	Alentejo Central	+
17	6/5/2009– ‘drapeau’	Carignan	Borba	Alentejo Central	+
18	6/5/2009– ‘drapeau’	Carignan	Borba	Alentejo Central	+
35	19/6/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central	+
37	16/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo	+
41	24/6/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central	+
43	24/6/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central	+
52	23/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo	+
53	23/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo	+
55	25/5/2009 – ‘drapeau’	Aragonez	Reguengos	Alentejo Central	+

3.2. Análise do Polimorfismo da sequência amplificada e cortada (‘Cleaved Amplified Polymorphism Sequence’ – CAPS)

Tendo-se obtido no ponto 3.1 anterior, produtos de amplificação muito ténues em alguns dos casos, e não sendo estes suficientes para fazer a restrição optou-se por concentrar esses produtos de amplificação. Para isso, juntaram-se todos os produtos obtidos referentes à mesma amostra num mesmo gel de agarose. Os produtos obtidos correspondiam ao tamanho esperado de 450 pb (FIG. IV.12 e 13).

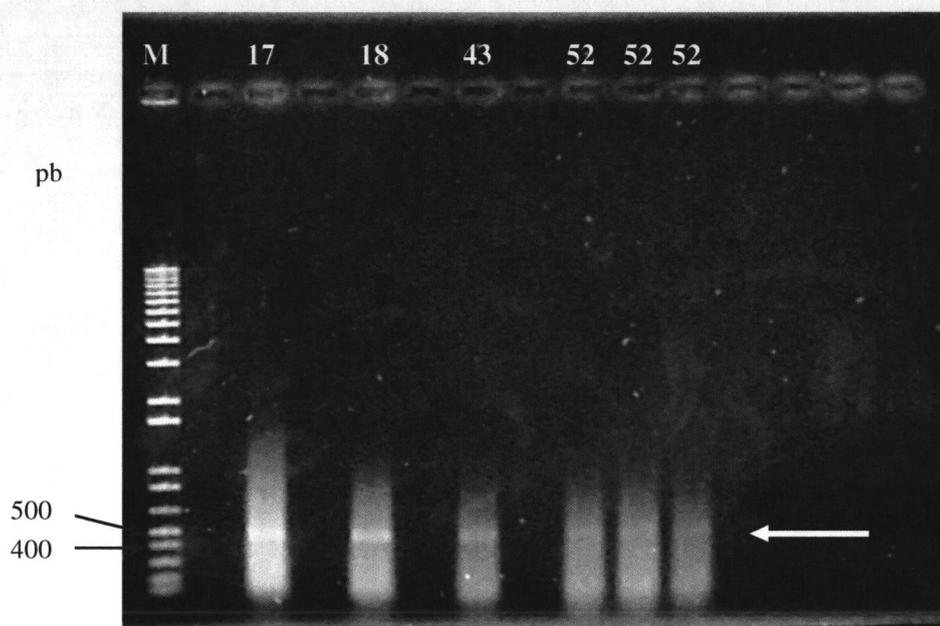


FIG. IV.12 – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene β -tubulina cujo fragmento tem aproximadamente 450 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 17, 18, 43 e 52 - amostras. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (450 pb).

Os produtos obtidos, após terem sido cortadas, purificados e sujeitos a restrição foram analisados em gel, tendo-se obtido, na amostra 41 dois fragmentos, um com cerca de 281 pb e outro com cerca de 168 pb (**FIG. IV.13**), estes tamanhos, após restrição, corresponde ao resultado obtido para isolados de *E. necator* pertencentes ao grupo genético B. A análise dos produtos de restrição das amostras 17, 18, 43 e 52, torna-se um pouco mais complexa. Obtiveram 3 bandas diferentes (**FIG. IV.14**), duas delas correspondentes aos isolados do grupo B e uma outra com cerca de 500 pb que tanto pode corresponder ao produto de PCR inicial não cortado como à presença de isolados do grupo A, uma vez que após restrição estes apresentam um produto de cerca de 449 pb, tendo o fragmento inicial 450 pb. A possibilidade de coexistência de isolados do grupo A na mesma videira que os do grupo B é comum e está bem descrita por MONTARRY *et al.* (2008). Pode pois ter acontecido, aquando da colheita das amostras que estas tivessem isolados dos dois grupos genéticos, para além disso as amostras 17 e 18 foram colhidas de ‘drapeaux’, sendo os isolados do grupo A predominantes nestas estruturas por MONTARRY *et al.* (2008). No entanto, e face à ausência de controlos positivos de cada um dos grupos temos que considerar a hipótese de o produto ter ficado só parcialmente restringido, apesar de termos seguido o mesmo tempo de restrição 1,5 h que na reacção da amostra 41 em que o produto foi totalmente digerido e que aparecem as duas bandas esperadas.

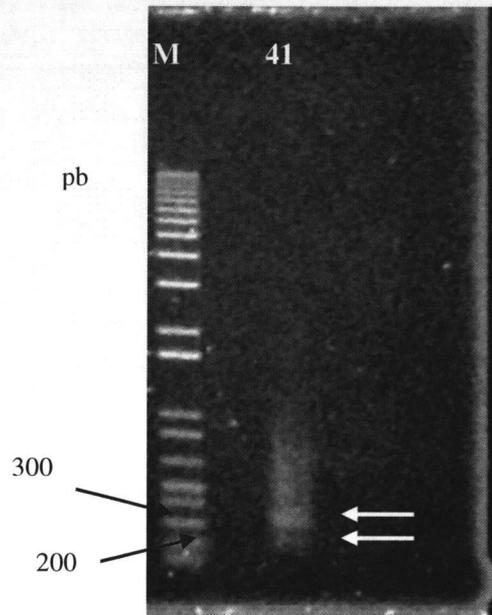


FIG. IV.13 – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene β -tubulina cujo fragmento tem aproximadamente 450 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 41 - amostra. As setas indicam as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (281 pb e 168 pb).

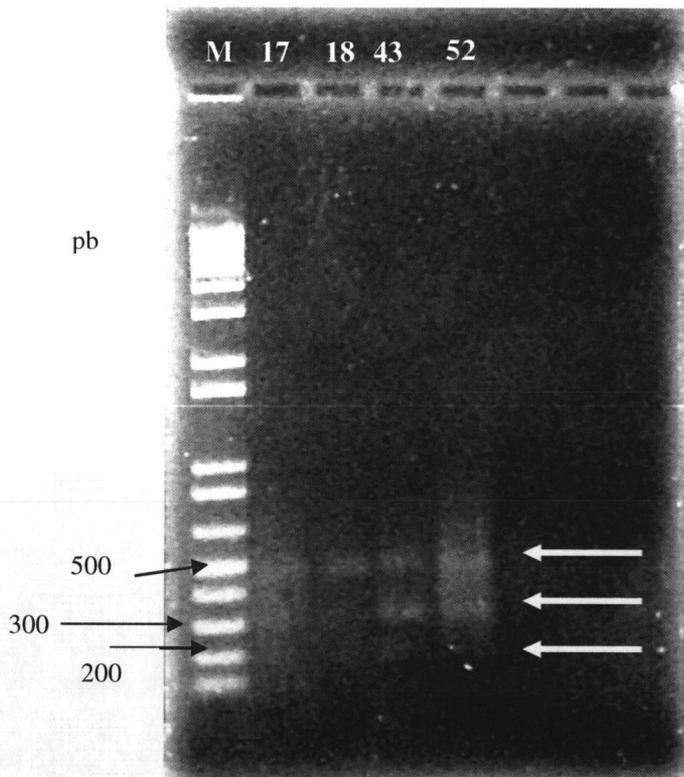


FIG. IV.14 – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene β -tubulina cujo fragmento tem aproximadamente 450 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); 17, 18, 43 e 52 - amostras. As setas indicam as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (168 pb, 281 e 449 pb).

Face aos resultados obtidos, das 11 amostras em que se amplificou o fragmento de 450 pb do gene da β -tubulina, a amostra 41 pertence ao grupo B, as amostras 17, 18, 41 e 52 pertence ao grupo A e B ou só ao grupo B e as restantes 6 amostras não foi possível concluir acerca do grupo genético a que pertencem (**QUADRO IV.3**).

QUADRO IV.3: Amostras analisadas quanto ao grupo genético a que pertencem.

N.º da Amostra	Data de Colheita da Amostra	Casta	Local	Região	Grupo Genético
3	27/5/2009	Roupeiro/Síria	S. Miguel de Machede	Alentejo Central	?
15	6/5/2009 – ‘drapeau’	Periquita	Borba	Alentejo Central	?
17	6 /5/2009– ‘drapeau’	Carignan	Borba	Alentejo Central	A/B
18	6/5/2009– ‘drapeau’	Carignan	Borba	Alentejo Central	A/B
35	19/6/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central	?
37	16/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo	?
41	24/6/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central	B
43	24/6/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central	A/B
52	23/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo	A/B
53	23/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo	?
55	25/5/2009 – ‘drapeau’	Aragonez	Reguengos	Alentejo Central	?

4. Identificação de isolados resistentes aos DMI's

4.1. – Amplificação por Reacção da Polimerase em Cadeia (PCR) do gene da 14 α -demetilase (*CYP51*) de *E. necator*

A amplificação de um fragmento de 1756 pb que contem o gene *CYP51*, foi conseguida em apenas 2 das 60 amostras, as amostras 35 e 53 (**FIG. IV.15** e **QUADRO IV.4**). Todas as outras amostras testadas não apresentaram o produto de amplificação esperado, tendo este sido obtido apenas nos controlos positivos **FIGS. IV.16, IV.17, IV.18** e **IV.19**. Estes resultados mostram que a amplificação não ocorreu eventualmente por falta de DNA alvo, ou o produto de amplificação era tão ténue que não foi possível a sua visualização em gel de agarose. Também outros autores tiveram essa dificuldade ([1] DÉLYE *et al.*, 1997) daí ter sido desenvolvido um ‘Nested’ PCR usando como base o produto de PCR de 1756 pb, independentemente de ser ou não visível em gel ([1] DÉLYE *et al.*, 1997).

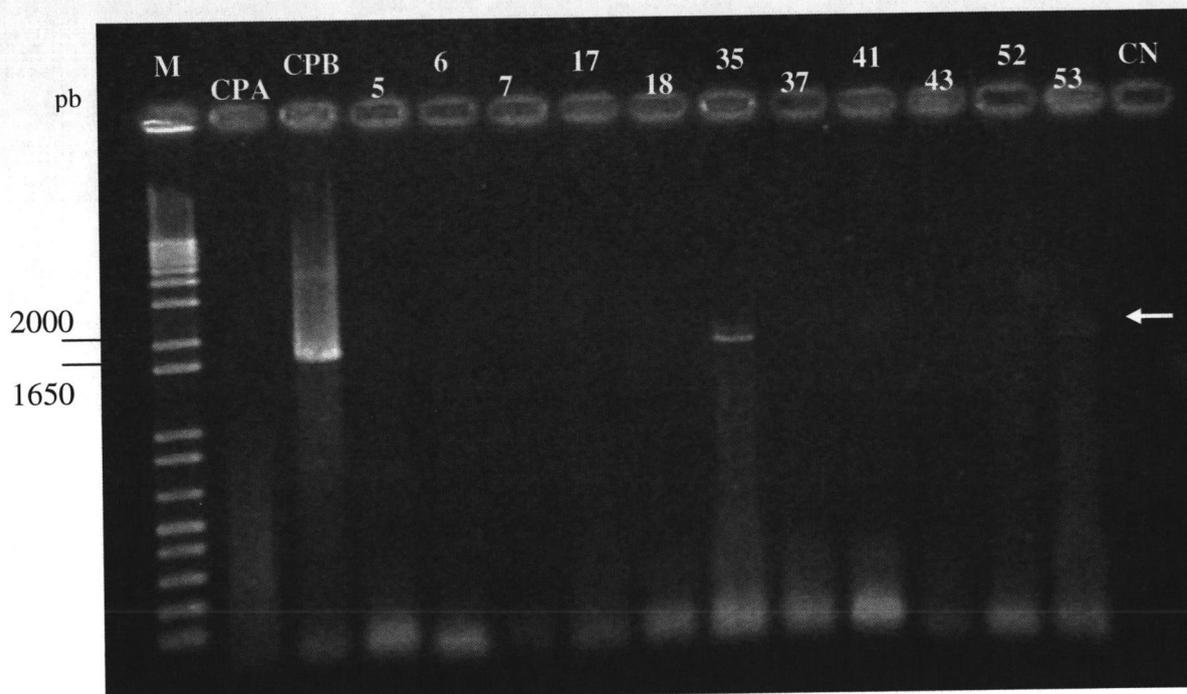


FIG. IV.15 – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene *CYP51* cujo fragmento após amplificação é de 1756 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); CPA e CPB – controles positivos gentilmente cedidos pela Dr.^a Marie-France Corio-Costet do INRA; 5, 6, 7, 17, 18, 35, 37, 41, 43, 52 e 53 - amostras; CN – controle negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (1756 pb).

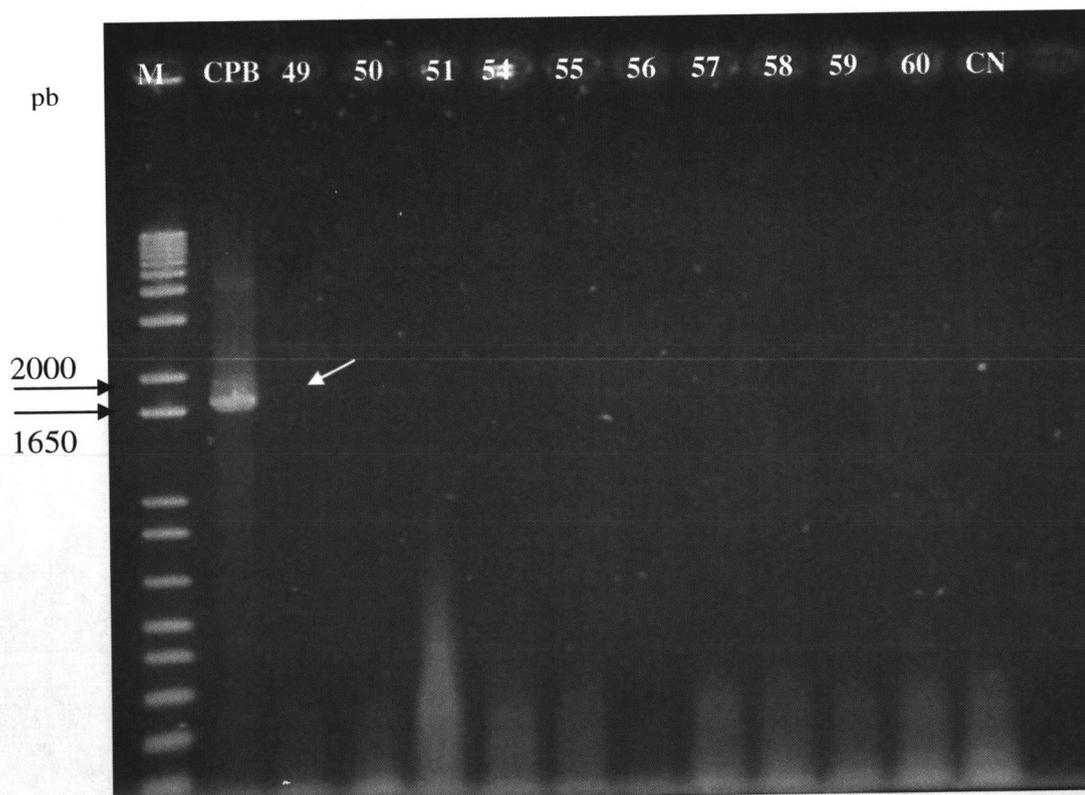


FIG. IV.16 – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene *CYP51* cujo fragmento após amplificação é de 1756 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); CPB – controle positivo gentilmente cedido pela Dr.^a Marie-France Corio-Costet do INRA; 49, 50, 51, 54, 55, 56, 57, 58, 59 e 60 - amostras; CN – controle negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (1756 pb).

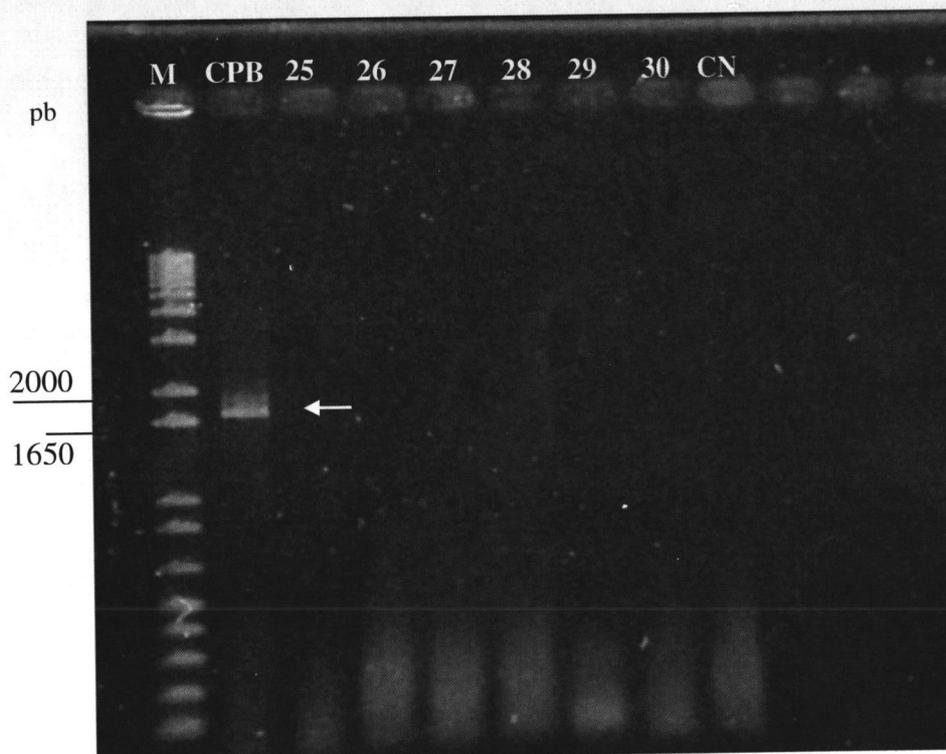


FIG. IV.17 – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene *CYP51* cujo fragmento após amplificação é de 1756 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); CPB – controlo positivo gentilmente cedido pela Dr.^a Marie-France Corio-Costet do INRA; 25, 26, 27, 28, 29, e 30 - amostras; CN – controlo negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (1756 pb).

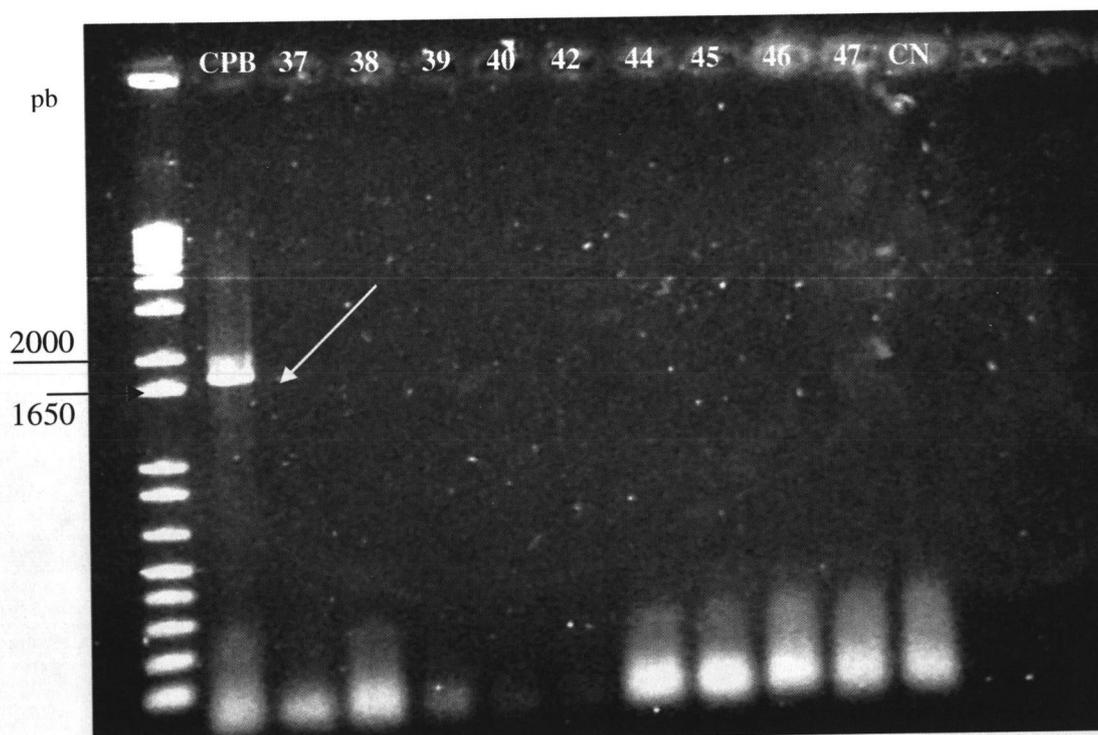


FIG. IV.18 – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene *CYP51* cujo fragmento após amplificação é de 1756 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); CPB – controlo positivo gentilmente cedido pela Dr.^a Marie-France Corio-Costet do INRA; 37, 38, 39, 40, 42, 44, 45, 46 e 47 - amostras; CN – controlo negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (1756 pb).

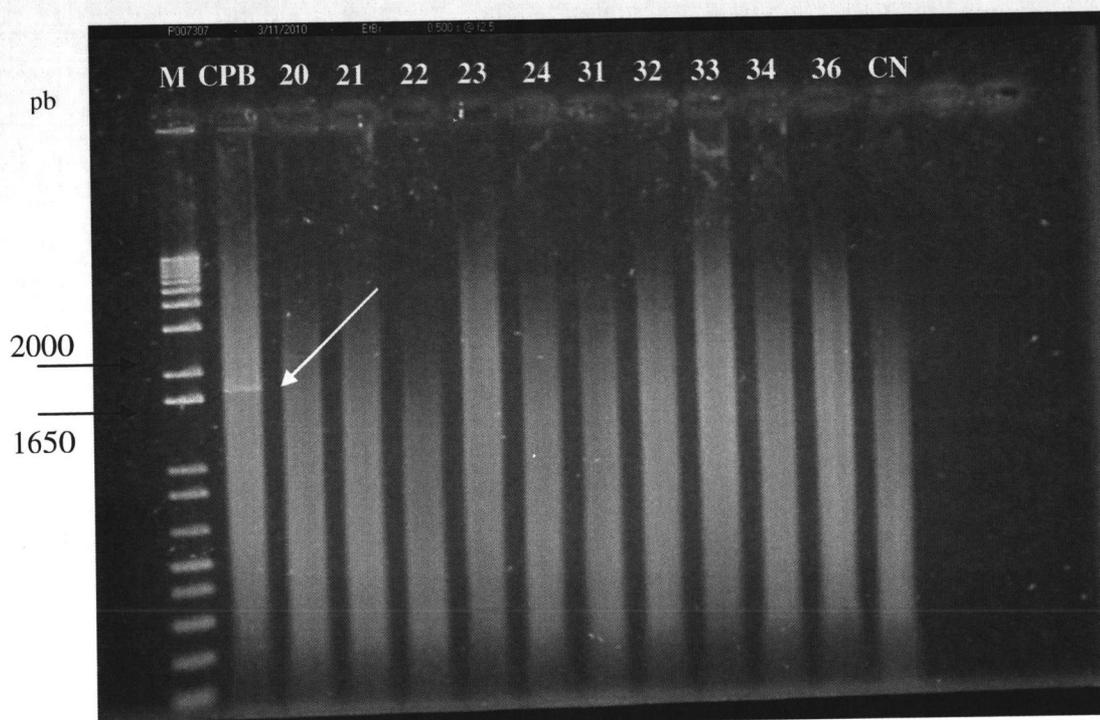


FIG. IV.19 – Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação gene *CYP51* cujo fragmento após amplificação é de 1756 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); CPB – controlo positivo gentilmente cedido pela Dr.^a Marie-France Corio-Costet do INRA; 20, 21, 22, 23, 24, 31, 32, 34 e 36 - amostras; CN – controlo negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (1756 pb).

QUADRO IV.4: Amostras em que se obteve amplificação do gene *CYP51* de *E. necator*.

N.º da Amostra	Data de Colheita da Amostra	Casta	Local	Região	Amplificação do fragmento que contem o gene <i>CYP51</i>
35	19/6/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central	+
53	23/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo	+

4.2. – ‘Nested Allele-Specific PCR’ (NAS-PCR)

A utilização do fragmento amplificado de 1756 pb nas reacções de ‘Nested Allele-Specific’ PCR, permitiu-nos obter alguns resultados indicativos da resistência ou sensibilidade dos isolados aos DMI’s. Das 60 amostras testadas, apenas 8 apresentaram a banda específica de 476 pb, tendo essas amostras sido as seguintes; 17, 18, 41, 43, 52, 53 **FIG. IV.20**, amostra 55 **FIG. IV.21** e amostra 37 amostra **FIG. IV.22**. A presença do produto de amplificação é indicativo da resistência destes isolados de *E. necator* às substâncias DMI’s ([1] DÉLYE *et al.*, 1997). Foi interessante notar que, com a realização do ‘Nested’ PCR se

amplificaram amostras, que não apresentaram a banda dos 1756 pb aquando da sua visualização em gel de agarose, o que indica que o produto de amplificação tinha sido obtido após a reacção de PCR, no entanto, as quantidades eram tão pequenas que não permitiram a sua visualização em gel. Vários autores têm utilizado esta técnica, em que se utilizam ‘primers’ internos a uma primeira reacção de amplificação de modo a poder aumentar o sinal de amplificação e assim a sua visualização em gel (PANTALEO *et al.*, 2001; [1] DÉLYE *et al.*, 1997; AMRANI e CORIO-COSTET, 2006).

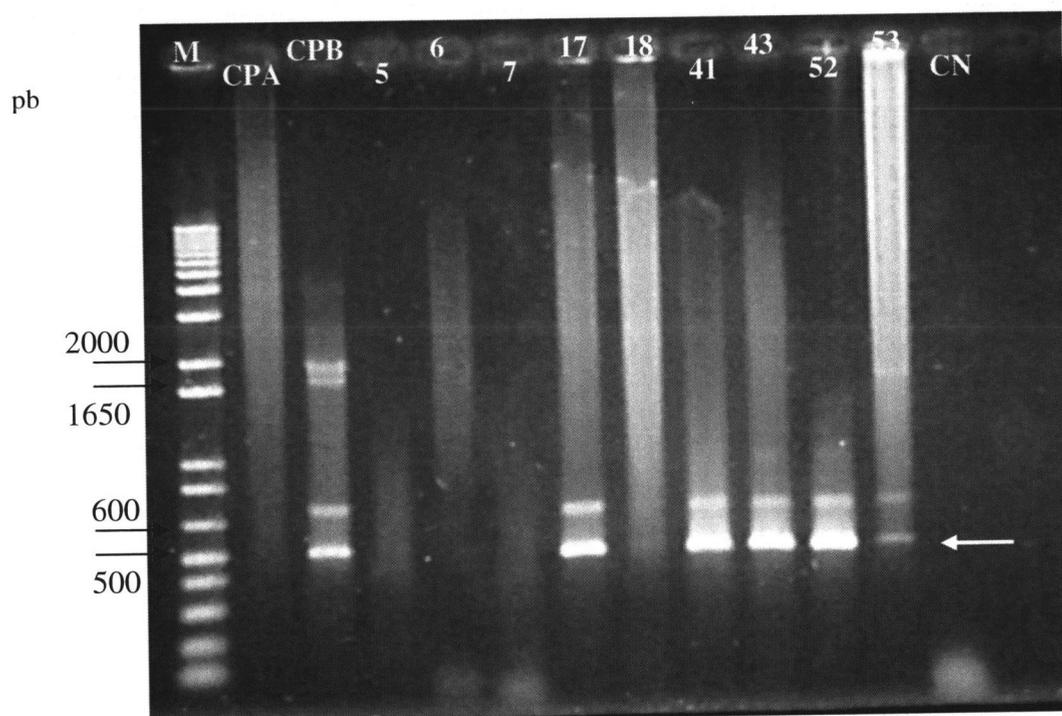


FIG. IV.20 – Análise dos produtos amplificados por NAS-PCR, para amplificação de um fragmento com 476 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); CPA e CPB – controlos positivos gentilmente cedidos pela Dr.^a Marie-France Corio-Costet do INRA; 5, 6, 7, 17, 18, 41, 43, 52 e 53 - amostras; CN – controlo negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (476 pb).

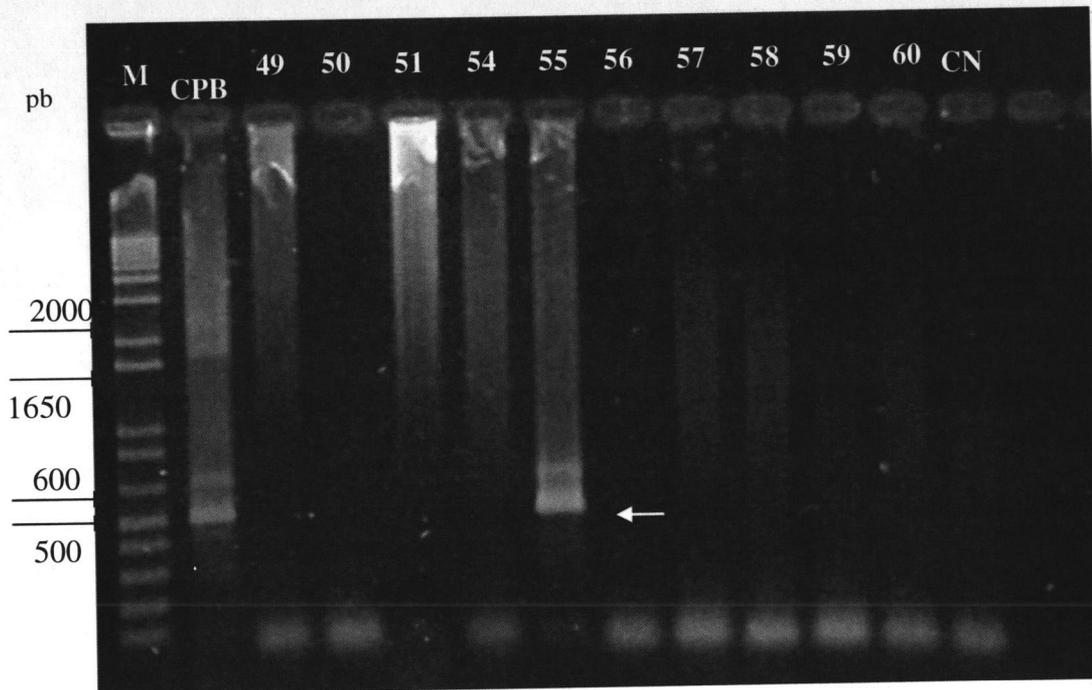


FIG. IV.21 – Análise dos produtos amplificados por PCR, para amplificação de um fragmento com 476 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); CPB – controle positivo gentilmente cedido pela Prof. Marie-France Corio-Costet do INRA; 49, 50, 51, 54, 55, 56, 57, 58, 59 e 60 - amostras; CN – controle negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (476 pb).

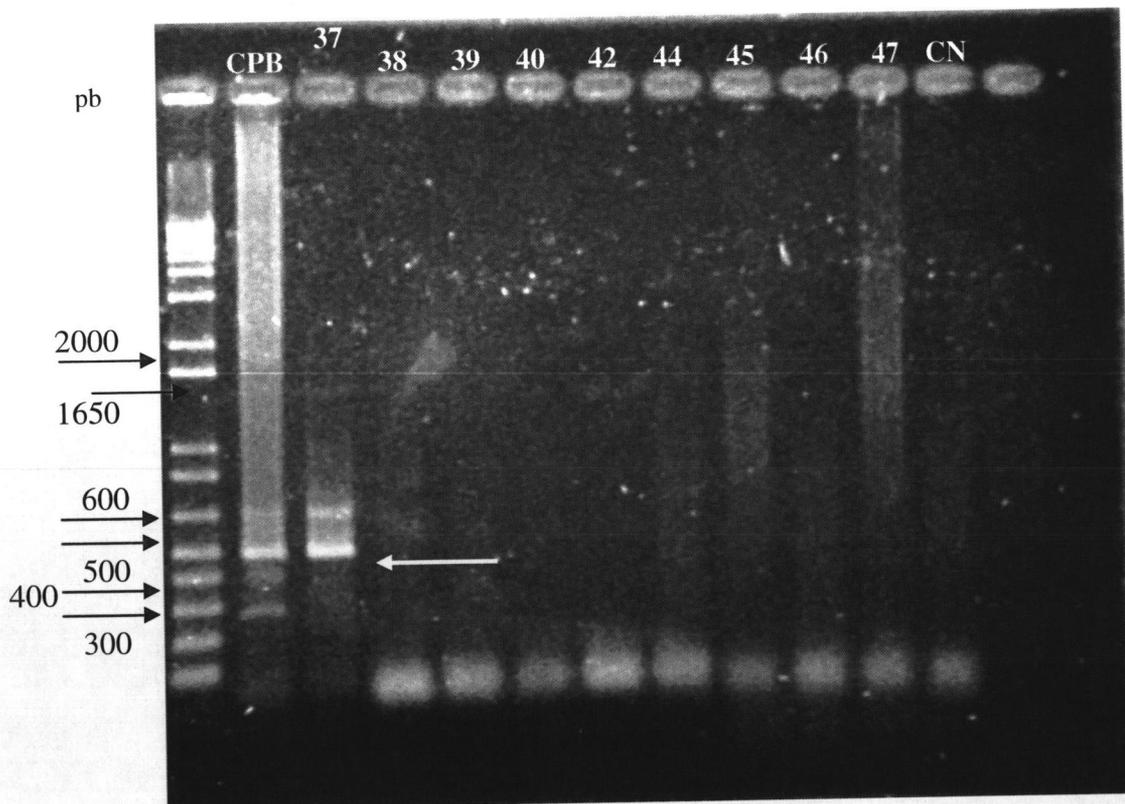


FIG. IV.22 – Análise dos produtos amplificados por PCR, para amplificação de um fragmento com 476 pb. M – ‘DNA ladder 1 Kb plus’ (INVITROGEN); CPB – controle positivo gentilmente cedido pela Prof. Marie-France Corio-Costet do INRA; 37, 38, 39, 40, 42, 44, 45, 46 e 47 - amostras; CN – controle negativo de PCR. A seta indica as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (476 pb).

A observação dos resultados obtidos permitiu-nos mostrar que no grupo de isolados em que se obteve amplificação existia um, o isolado 35, proveniente de uma videira da casta Aragonez, sensível aos DMI's (QUADRO IV.5). Este resultado provem da não amplificação com o NAS-PCR do fragmento de 476 pb, tendo-se usado o fragmento de 1756 pb que, para este isolado, tinha um produto visível em gel de agarose.

QUADRO IV.5: Resultados obtidos na análise dos isolados sensíveis e resistentes aos DMI's.

N.º da Amostra	Data de Colheita da Amostra	Casta	Local	Região	PCR CYP51	NAS-PCR CYP51	Sensibilidad e aos DMI's
17	6/5/2009– 'drapeau'	Carignan	Borba	Alentejo Central	-	+	resistente
18	6/5/2009– 'drapeau'	Carignan	Borba	Alentejo Central	-	+	resistente
35	19/6/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central	+	-	sensível
37	16/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo	-	+	resistente
41	24/6/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central	-	+	resistente
43	24/6/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central	-	+	resistente
52	23/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo	+	+	resistente
53	23/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo	+	+	resistente
55	25/6/2009 – 'drapeau'	Aragonez	Reguengos	Alentejo Central	-	+	resistente

Da observação do QUADRO IV.6 verificou-se que dos 60 isolados iniciais, apenas em 11 se obtiveram resultados para um ou mais dos testes realizados. Este baixo valor pode ser explicado por alguma deficiência no método de extracção do DNA da amostra. Efectivamente, depois de analisados os resultados obtidos verificou-se, que provavelmente não foi casual que com os outros 49 isolados, e também alguns controlos positivos gentilmente fornecidos, quer pelo Dr. Delmotte, quer pela Dra. Corio-Costet, não se tenham obtido os produtos de amplificação esperados.

QUADRO IV.6: Resumo dos resultados das ampliações realizadas ao gene da β -tubulina, e do *CYP51*;

N.º da Amostra	Data de Colheita da Amostra	Casta	Local	Região	Grupo Genético	PCR <i>CYP51</i>	NAS-PCR <i>CYP51</i>	Sensibilidade aos DMI's
3	27/5/2009	Roupeiro/Síria	S. Miguel de Machede	Alentejo Central	?	-	-	?
15	6/5/2009 – 'drapeau'	Periquita	Borba	Alentejo Central	?	-	-	?
17	6/5/2009 – 'drapeau'	Carignan	Borba	Alentejo Central	A/B	-	+	resistente
18	6/5/2009 – 'drapeau'	Carignan	Borba	Alentejo Central	A/B	-	+	resistente
35	19/6/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central	?	+	-	sensível
37	16/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo	?	-	+	resistente
41	24/6/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central	B	-	+	resistente
43	24/6/2009	Aragonez	Estremoz	Alentejo Central	A/B	-	+	resistente
52	23/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo	A/B	+	+	resistente
53	23/6/2009	Aragonez	Pias	Baixo Alentejo	?	+	+	resistente
55	25/5/2009 – 'drapeau'	Aragonez	Reguengos	Alentejo Central	?	-	+	resistente

Sendo este fungo um parasita obrigatório, não foi possível obter mais amostra das mesmas videiras para repetir o método de extracção, ou tentar optimiza-lo. A extracção do DNA total teve que ser toda concentrada numa época do ano, altura em que o fungo está presente nas vinhas, e os testes moleculares de caracterização dos isolados, foi sendo feita ao longo do ano, na época de repouso vegetativo da cultura, este facto impossibilitou-nos de poder repetir a extracção ou de testar outra amostra de DNA proveniente da mesma videira.

No QUADRO IV.6, em que se resume todos os resultados obtidos e se relacionam estes com as castas e com as datas de colheita, pode verificar-se que apenas a amostra n.º 41 da casta Aragonez, pertence ao grupo B e que nas amostras n.º 17, 18, 43 e 52 podem estar presentes isolados do grupo A e B, ou apenas do grupo B. Também se pôde verificar que a sensibilidade ou resistência dos isolados aos DMI's não está directamente relacionado com a casta, nem com a localização. Este resultado, apesar do pequeno número de amostras, está de acordo com o obtido por outros autores (MONTARRY *et al.*, 2008; AMRANI e CORIO-COSTET, 2006). Também o facto do isolado ser pertencente ao grupo A ou B não o torna mais sensível ou resistente aos fungicidas DMI's.

V. CONCLUSÕES

As 60 amostras obtidas do fungo *E. necator*, permitiram ter uma boa amostragem das castas e das várias zonas vitivinícolas do Alentejo, no entanto, as quantidades de DNA total obtidas não foram muito homogêneas, tendo-se verificado teores de DNA muito baixos em algumas amostras e noutras valores extremamente elevados, como é o caso dos valores referentes à amostra 58 que é cerca de 140 vezes maior que o da amostra 29. Esta diferença pode ser devida à maior ou menor quantidade de fungo presente no material vegetal.

O método de extracção utilizado não necessita da maceração dos tecidos da amostra, o que deveria ser uma vantagem para obter maioritariamente DNA do fungo *E. necator*, pois sendo este um ectoparasita (AGRIOS, 2005), cresce apenas à superfície das estruturas vegetais infectadas. Por essa razão não se recorreu a um 'kit' comercial de extracção de DNA total de planta, uma vez que estes retiram todo o DNA presente na amostra, ficando nesse caso o DNA do fungo diluído com outro, de planta, por exemplo. Por outro lado, a utilização de um método mais grosseiro leva a que as amostras de DNA finais não fiquem tão puras, podendo dar-se o caso de haver contaminações do DNA com reagentes que possam interferir nos testes subsequentes. Um exemplo disso é a ligação de resíduos de EDTA presentes na amostra que se possam ligar com o $MgCl_2$ presente nas reacções de PCR, quelatando-o e tornando-o indisponível para o funcionamento da *Taq* DNA polimerase. Assim, a utilização de um tampão da enzima sem $MgCl_2$, de modo a poder otimizar a quantidade deste reagente na reacção de PCR, mostrou-se fundamental para a realização desta tecnologia aquando da utilização de amostras de DNA que não sejam provenientes de extracção por 'kits' comerciais.

Os diferentes protocolos utilizados para otimizar as reacções de PCR também levaram a que o DNA fosse por diversas vezes descongelado, podendo ter induzido degradação em algumas das amostras impedindo assim a obtenção de resultados.

A amplificação do fragmento de 450 pb do gene da β -tubulina, apenas em 11 das 60 amostras pode ser justificado pela ocorrência de algum ou alguns dos problemas referidos anteriormente. Com a utilização da técnica CAPS, em 5 dessas 11 amostras pôde verificar-se a presença de isolados do grupo genético B. Duas dessas amostras, as n.º 17 e 18 são provenientes de 'drapeaux', nas quais, segundo a bibliografia, aparecem principalmente isolados do grupo A (MONTARRY *et al.* 2008), no entanto, a

impossibilidade da utilização de controlo positivo deixa a dúvida se não estarão nessas amostras, e também nas amostras 43 e 52 presentes isolados do grupo A, pois segundo MONTARRY *et al.* (2008) os grupos genéticos A e B podem coexistir. A amostra do isolado 41 é claramente do grupo genético B. O facto das condições das reacções de restrição terem sido as mesmas entre os vários isolados, vem reforçar a hipótese das amostras n.º 17, 18, 43 e 52 terem presentes os 2 grupos. A presença de isolados do grupo A, que produzem um grande número de conídios com baixa eficiência de infecção, e desaparecem ao logo da fase vegetativa da videira ou do grupo B, que produzem um reduzido número de conídios, com uma eficiência de infecção elevada (CORIO-COSTET, 2007) pode dar uma indicação de como direccionar os tratamentos fitossanitários na vinha.

Na análise de PCR para amplificação do gene *CYP51*, obtivemos amplificação nas amostras n.º 35 e 53. Apesar de, em grande parte destas amostras não se ter obtido amplificação no gene *CYP51*, efectuou-se em todas elas a análise NAS-PCR e verificou-se que nas amostras n.º 17, 18, 37, 41, 43, 52, 53 e 55, se obteve amplificação de um fragmento deste gene de 476 pb, significando que se tratam de isolados resistentes aos DMI's. Por outro lado, a amostra n.º 35 revelou ser um isolado sensível aos DMI's visto na primeira reacção de PCR se ter identificado o gene *CYP51*, mas na reacção seguinte de NAS-PCR, não ter ocorrido amplificação do fragmento do gene correspondente à existência de mutação. O facto de apenas 1 dos 9 isolados, o isolado n.º 35 ser sensível aos fungicidas DMI's, indica que, e apesar do baixo número de resultados conseguidos, a grande maioria é resistente aos fungicidas DMI's. Este pode ser um dado indicativo de que começam a aparecer muitos fenómenos de resistência a este tipo de fungicidas, o que pode a médio prazo tornar-se problemático para a resolução do problema 'oídio na videira'.

Com este estudo, que do nosso conhecimento, é o primeiro feito em Portugal e em vinhas portuguesas, pretendeu-se primeiramente otimizar técnicas de caracterização molecular de isolados do fungo *E. necator* e por outro lado mostrar um pouco a panorâmica de evolução deste fungo nas videiras de uma das mais importantes regiões vitivinícolas do nosso País, o Alentejo.

- [2] DÉLYE, Christophe; LAIGRET, Frédéric e CORIO-COSTET, Marie-France, *Cloning and sequence analysis of the eburicol 14 α -demethylase gene of the obligate biotrophic powdery mildew fungus*, GENE – an international journal on genes and genomes, 1997, (195), pp. 29-33.
- [3] DÉLYE, C.; LAIGRET, F. e CORIO-COSTET, M.-F., *RAPD analysis provides insight into the biology and epidemiology of *Uncinula necator**, Phytopathology, 1997, (87), pp. 670-677.
- DÉLYE, Christophe; RONCHI, Valérie; LAIGRET, Frédéric e CORIO-COSTET, Marie-France, *Nested Allele-Specific PCR Primers Distinguish Genetic Groups of *Uncinula necator**, Applied and Environmental Microbiology, 1999, (Vol. 5, N° 9), pp. 3950-3954.
- FALACY, Jennifer S.; GROVE, Gary G.; MAHAFFEE, Walter F.; GALLOWAY, Heather e GLAWE, Dean A., *Detection of *Erysiphe necator* in Air Samples Using the Polymerase Chain Reaction and Species-Specific Primers*, Phytopathology, 2007, (Vol. 97, N° 10), pp. 1290-1297.
- FÈLIX, Maria do Rosário F., *Caracterização biomolecular de Olive latent vírus 1 isolado de *Olea europaea L.**, Dissertação apresentada à Universidade de Évora para obtenção do Grau de Doutor em Agronomia, Évora, 2007, 95 p.
- FICKE, A.; GADORY, D. M. e SEEM, R. C., *Ontogenic resistance and plant disease management: a case study of grape powdery mildew*, Phytopathology, 2002, (92), pp. 671-675.
- FOURNIER, E.; GIRAUD, T.; ALBERTINI, C. e BRYGOO, Y., *Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies*, Mycologia, 2005, (97), pp. 1251-1267.
- GIRAUD, T.; FORTINI, D.; LEVIS, C.; LEROUX, P. e BRYGOO, Y., *RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species*, Mol. Biol. Evol., 1997, (14), pp. 1177-1185.
- GOHEEN, Austin C. e PEARSON, Roger C., *Plagas y Enfermedades de la Vid*, The American Phytopathological Society, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 2001, 922 p.
- HERRERA-VÁSQUEZ, José Angel; CEBRIÁN, María del Carmen; ALFARO-FERNÁNDEZ, Ana e CÓRDOBA-SELLÉS, María del Carmen; *Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Olpidium bornovanus*, *O. brassicae*, *O. virulentus*.*, British Mycology Society, Concepción Jordá, 2009, (113), pp. 602-610.

- ICV, *Flash Info Vendanges Edition - Spéciale Entreprises - Vinification des vendanges oïdiées - septembre 2008*, Group Institut Coopératif du Vin, 2008, (SVA2008002 – a partir da internet::), 7 p.
- JAILLOUX, F.; WILLOCQUET, L.; CHAPUIS, L. e FROIDEFOND, G., *Effect of weather factors on the release of ascospores of Uncinula necator, the cause of grape powdery mildew, in the Bordeaux region*, Canadian Journal of Botany, 1999, (77), pp. 1044–1051.
- KAWCHUK, L.M.; HUTCHISON, L.J.; VERHAEGHE, C.A.; LYNCH, D.R.; BAINS, P.S. e HOLLEY, J.D., *Isolation of the b-tubulin gene and characterization of thiabendazole resistance in Gibberella pulicaris*, Canadian Journal Plant Pathology, 2002, (24), pp.233–238.
- KISS, Levente, *Powdery Mildew as invasive plant pathogens: New epidemics caused by two North American species in Europe*, Mycological Reserch News, s.d. (doi:10.1017/so953756205232793), pp. 259-260.
- KOENRAADT, H.; SOMERVILLE, S. C. e JONES, A. L., *Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomil-resistant field strains of Venturis inaequalis and other plant pathogenic fungi*, Phytopathology, 1992, (82), pp. 1348-1354.
- LEBRETON, L.; LUCAS, P.; DUGAS, F.; GUILLERM, A.-Y.; SCHOENY, A. e SARNIGUET, A., *Changes in population structure of the soilborne fungus Gaeumannomyces graminis var. tritici during wheat cropping*, Applied and Environmental Microbiology, 2004, (6), pp. 1174-1185.
- LI, J.; KATIYAR, S.K. e EDLIND, T.D., *Site-directed mutagenesis of Saccharomyces cerevisiae b-tubulin, interaction between residue 167 and benzimidazole compounds*. FEBS Lett., 1996, (385), p. 7–10.
- MA, Zhonghua e MICHAILIDES, Themis. J., *Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi*, Crop Protection, 2005, (24), pp. 853-863.
- MONTARRY, Joselin; CARTOLARO, Philippe; DELMOTTE, François; JOLIVET, Jérôme e WILLOCQUE, Laetitia, *Genetic Structure and Aggressiveness of Erysiphe necator Ppulations during Grapevine Powdery Mildew Epidemics*, Applied and Environmental Microbiology, Oct. 2008, Vol. 74, n.º 20, pp. 6327-6332.

MONTARRY, Joselin; CARTOLARO, Philippe; RICHARD-CERVERA, Sylvie e DELMOTTE, François, *Spatio-temporal distribution of Erysiphe necator genetic groups and their relationship with disease levels in vineyards*, European Journal of Plant Pathology, 2009 (123) , pp. 61-70.

PANTALEO, V.; SAPONARI, M. e GALLITELLI, D., *Development of a nested PCR protocol for detection of olive-infecting virus in crude extracts*, Journal of Plant Pathology, 2001, (83 - 2), pp. 143-146.

PÉROS, J. P.; TROULET, C.; GUERRIERO, M.; MICHEL-ROMITI, C. e NOTTEGHEM, J. L., *Genetic variation and population structure of the grape powdery mildew fungus, Erysiphe necator, in southern France*, European Journal of Plant Pathology, 2005, (104), pp. 592-597.

RENOLAYAN, Nanette, *Determination of effective concentration 50% (EC50): case of uranium toxicity on carrot root grow in vitro cropping device*, (a partir da Internet – <http://hdl.handle.net/1942/3746>), 2p, 7 de Janeiro de 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH E. F. e MANIATIS, T., *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989, Tomo 1, Capítulo 6, 62 p.

s.a., *Substâncias Activas*, (a partir da Internet – <http://www.sir-madeira.org/>), sp, 31 de Março de 2010.

s.a., *Maladies - Oidium*, (a partir da Internet – <http://membres.multimania.fr/ipmvigne/Maladies/oidium.htm/>), sp, 6 de Abril de 2010.

s.a., (a partir da Internet – http://www.muller-koeberle.fr/oidium_2.htm), sp, 6 de Abril de 2010.

s.a., *Cleave amplified polymorphic sequence*, (a partir da Internet – <http://www.everythingbio.com/>), sp, 10 de Abril de 2010.

s.a., *Los Parasitos de la Vid – Estrategias de protección razonada*, 4.^a edición, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 1998, 328 p.

s.a., (a partir da Internet – <http://wikipedia.org/>), sp, 6 de Abril de 2010

- SEKO, Y.; BOLAY, A.; KISS, L.; HELUTA, V.; GRIGALIUNAITE, B. e TAKAMATSU, A.,** *Molecular evidence in support of recent migration of a powdery mildew fungus on Syringa spp. Into Europe from East Asia*, Plant Pathology, 2008, (57), pp. 243-250.
- SILVA, Jorge,** *Oídio da Videira (Uncinula necator)*, Apresentação de Bayer CropScience, s.l., 13 de Junho de 2008, 56 p.
- STUMMER, B. E. e SCOTT, E. S.,** *Detection of novel genotypes in progeny from a controlled cross between isolates of Uncinula necator belonging to distinct phonetic groups*, Australian Plant Pathology, 2003, (32), pp. 213-218.
- VILLAREAL, L. M. M. A. e LANNOU, C.,** *Selection in increased spore efficacy by host genetic background in a wheat mildew population*, Phytopathology, 2000, (90), pp. 1300-1306.
- WILLIAMS, R. H. e FITT, B. D. L.,** *Differentiating A and B groups of Leptosphaeria maculans, causal agent of stem canker (blackleg) of oilseed rape*, Plant Pathology, 1999, (48), pp. 161-175.
- WILLOCQUET, L.; CARTOLARO, P.; JOLIVET, J.; RICHARD-CERVERA, S. e DELMOTTE, F.,** *Relationships between genetic group, symptom type, and epidemiological features in Erysiphe necator, the causal agent of grape powdery mildew*, Phytopathology, 2007, (97-suplemento 123).
- YAN, K. e DICKMAN, M.B.,** *Isolation of a b-tubulin gene from Fusarium moniliforme that confers cold-sensitive benomyl resistance*, Applied and Environmental Microbiology, 1996, (62), pp. 3053-3056.
- YPEMA, H. L., YPEMA, M. e GUBLER, H. D.,** *Sensitivity of Uncinula necator to Benomyl, Triadmepon, Myclobutani,l and Fenarimol in California*, Plant Disease, 1997, Março, Vol. 81, N.º 3 pp. 293-297.