

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

**Sensibilidade de isolados de *Plasmopara viticola* à piraclostrobina e sua
relação com o manejo do míldio**

Larissa Helena Visioli

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para
obtenção do título de Bacharel em Engenharia
Agrônômica.

**Piracicaba
2018**

Larissa Helena Visioli
Engenheira Agrônoma

**Sensibilidade de isolados de *Plasmopara viticola* à piraclostrobina e sua
relação com o manejo do míldio**

Orientador:
Prof.^a Dr.^a. **LILIAN AMORIM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para
obtenção do título de Bacharel em Engenharia
Agrônômica.

Piracicaba
2018

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

Visioli, Larissa Helena

Sensibilidade de isolados de *Plasmopara viticola* à piraclostrobina e sua relação com o manejo do míldio / Larissa Helena Visioli. - - Piracicaba, 2018.
55 p. :il.

Trabalho de Conclusão de Curso - - USP / Escola Superior de Agricultura
“Luiz de Queiroz”.

1. Controle 2. Resistência a fungicida 3. QoI 4. Niagara Rosada L. . I.
Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar e abençoar todos os dias o meu caminho.

Aos meus pais, Jerri Aderlei Visioli e Renilza Pizetta Visioli, e à minha irmã Sara Laís Visioli pelo amor, carinho, apoio e auxílio em todos os aspectos tanto pessoal quanto profissional.

À Prof^a. Dr^a. Lilian Amorim, pela oportunidade, orientação, paciência e conselhos durante todo meu período de estágio e desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcel Bellato Spósito, pela ajuda e confiança depositada.

À Prof^a. Dr^a. Claudia Barros Monteiro-Vitorello e Dr^a. Patrícia Dayane Carvalho Schaker pelo apoio e colaboração no decorrer do projeto.

Ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP, funcionários, colegas e amigos.

À toda equipe do Laboratório de Epidemiologia da ESALQ/USP, pelo companheirismo, amizade, conversas, risadas e suporte que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Genética Molecular pela prestatividade.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, pelo apoio institucional e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos de iniciação científica (Processo nº 2017/07782-5).

“Los grandes logros de tu vida son fruto de un deseo ardiente en tu alma, en el interior de tu ser, en tu subconsciente.

Cuando ese deseo llega a formar parte de tu vida, entonces se te abrirán las puertas, caminos y oportunidades hasta que lo logres; aunque al principio parezca imposible.”

Miguel Bermúdez Marín

*“Solos llegaremos más rápido,
juntos llegaremos más lejos.”*

Dr. William Soto Santiago

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1. Metodologias para avaliar a sensibilidade de <i>Plasmopara viticola</i> à piraclostrobina...	19
2.1.1. Teste de sensibilidade de <i>Plasmopara viticola</i> à piraclostrobina, utilizando discos foliares	19
2.1.2. Teste de sensibilidade de <i>Plasmopara viticola</i> à piraclostrobina, utilizando estacas de ‘Niagara Rosada’ mantidas em água	21
2.1.3. Teste de sensibilidade de <i>Plasmopara viticola</i> à piraclostrobina, utilizando folhas destacadas de ‘Niagara Rosada’	22
2.2. Coleta de isolados de <i>Plasmopara viticola</i>	24
2.3. Teste de sensibilidade de isolados de <i>Plasmopara viticola</i> à piraclostrobina.....	31
2.4. Extração de DNA.....	31
2.5. PCR e sequenciamento de parte do gene <i>cytB</i>	32
2.6. Caracterização do manejo realizado pelos produtores	33
2.7. Rede de haplótipos	33
3. RESULTADOS	35
3.1. Definição da metodologia.....	35
3.2. Teste de sensibilidade	37
3.3. Extração de DNA.....	38
3.4. PCR e sequenciamento de parte do gene <i>cytB</i>	39
3.5. Caracterização do manejo do produtor	41
3.6. Rede de haplótipos	44
4. DISCUSSÃO	45
5. CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS	51

RESUMO

Sensibilidade de isolados de *Plasmopara viticola* à piraclostrobina e sua relação com o manejo do míldio

A viticultura no Estado de São Paulo contribui com 14% da produção nacional de uvas e um de seus maiores problemas é a frequente ocorrência do míldio (*Plasmopara viticola*). Num ciclo de 120 dias os produtores paulistas fazem, em média, 103 e 59 aplicações de fungicidas em uvas finas e em rústicas, respectivamente, de forma preventiva. A maioria dessas pulverizações tem por objetivo o controle do míldio. Esse tipo de manejo pode levar à seleção de isolados do patógeno resistentes aos fungicidas e, como consequência, a falhas no controle da doença. Assim, nesse trabalho avaliou-se a sensibilidade de isolados de *P. viticola* a uma dose discriminatória de 100 µg mL⁻¹ de piraclostrobina, caracterizou-se molecularmente os isolados resistentes e relacionou-se a ocorrência da resistência ao manejo realizado pelos produtores de uva. A sensibilidade de isolados de *P. viticola* coletados em diferentes regiões dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul foi testada *in vivo* em diferentes metodologias. Os ensaios de sensibilidade com o método das folhas destacadas foram os que forneceram resultados mais consistentes para a verificação da sensibilidade do patógeno a piraclostrobina *in vivo*. Todas as vezes em que o fenótipo mostrava resistência, houve confirmação na análise molecular. No entanto, em alguns isolados o fenótipo resultante dos testes de sensibilidade não correspondeu com o genótipo encontrado. Em 12 de 36 isolados, o fenótipo foi sensível e o genótipo mostrou resistência. A frequência de pulverizações no período da safra para o controle do míldio da videira foi muito variável, dependendo do nível tecnológico de cada propriedade. Em muitos vinhedos houve detecção molecular de resistência de *P. viticola* aos fungicidas do grupo químico dos inibidores da quinona externa (QoI) mesmo na ausência de controle. A rede de haplótipos gerada a partir do conjunto de dados mostrou que os isolados se agrupavam dentro de quatro distintos haplótipos: três haplótipos europeus (IS, IR e IIR) e um haplótipo diferente dos já relatados na literatura. Nenhum haplótipo americano foi encontrado nas amostras analisadas.

Palavras-chave: Controle; Resistência a fungicida; fungicidas QoI; Niagara Rosada

ABSTRACT

Sensitivity of isolates of *Plasmopara viticola* to pyraclostrobin and their relationship to downy mildew management

The viticulture in the State of São Paulo contributes with 14% of the Brazilian grape production. One of the major problems in São Paulo viticulture is the frequent occurrence of downy mildew (*Plasmopara viticola*). The average number of fungicide spraying in São Paulo vineyards is in average 103 and 59 in European and American grapevine cultivares, respectively. Most of these sprays aim to control downy mildew. This type of management may select isolates of the pathogen resistant to fungicides and, as a consequence, may lead to an inefficient control of the disease. This study aimed to evaluate the sensitivity *P. viticola* isolates to pyraclostrobin, characterize the pathogen isolates molecularly and relate the occurrence of fungicide resistance to the management performed by grape growers. The sensitivity of *P. viticola* isolates collected in different regions of the States of São Paulo, Minas Gerais and Mato Grosso do Sul was analyzed *in vivo* with different methodologies. Sensitivity tests with detached leaves provided the most consistent results for detecting the sensitivity of the pathogen to pyraclostrobin *in vivo*. Every time when a phenotype showed resistance to pyraclostrobin, there was confirmation in the molecular analysis. However, for some isolates the phenotype resulting from the sensitivity tests was not correlated to the genotype. In 12 of 36 isolates, the phenotype was sensitive and the genotype showed mutation for resistance. The frequency of spraying during the crop season to control downy mildew was variable, depending on the technological level of each site. In many vineyards there was molecular detection of resistance of *P. viticola* to the fungicides of the chemical group of Quinone outside Inhibitor (QoI) even in the absence of control. The haplotype network generated showed four distinct haplotypes: three European haplotypes (IS, IR e IIR) and a different from those already reported in the literature. No American haplotypes were found in the samples analyzed.

Keywords: Control; Fungicide resistance; QoI fungicides; Niagara Rosada

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro produtor de frutas no ranking mundial, ficando atrás apenas da China e da Índia (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2012). A viticultura no Brasil corresponde a uma área plantada de 79.094 ha dos quais 64% estão localizadas no Estado do Rio Grande do Sul (MELLO, 2016). No Estado de São Paulo, a produção de uva representa 14% da produção nacional (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2012), sendo a cultivar mais plantada a ‘Niagara Rosada’.

Diversas doenças podem incidir sobre a videira. As mais importantes doenças fúngicas da parte aérea da cultura no Estado de São Paulo são o míldio, a antracnose e a ferrugem (AMORIM et al., 2016; MAIA et al., 2003).

O míldio da videira é causado por *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) Berl. & de Toni, patógeno biotrófico pertencente à classe Oomycetes da ordem Peronosporaceae (GESSLER; PERTOT; PERAZZOLLI, 2011). Esta é a principal doença da videira, tanto pela frequência com que incide nos pomares como pelos danos que causa à cultura. Os sintomas da doença podem ser observados em todos os órgãos verdes da planta (MAIA et al., 2003). O principal sintoma do míldio nas folhas é chamado de “mancha de óleo”, que corresponde a uma área amarelada observada na face adaxial, facilmente visualizada contra a luz (Figura 1.A). Em condições de umidade relativa do ar alta, no local das manchas, na face abaxial das folhas surge uma eflorescência branca e densa (Figura 1.B), que corresponde às estruturas reprodutivas do patógeno: esporangióforos e esporângios (Figura 1.C), esse sintoma é chamado de “mancha branca” ou “mancha mofo” (AMORIM et al., 2016). Com o passar do tempo, as manchas podem coalescer e necrosar e as folhas caírem (HENNING et al., 1997). Quando o oomiceto ataca as bagas no início do seu desenvolvimento (Figura 1.D), as estruturas reprodutivas do patógeno as recobrem podendo provocar queda precoce das mesmas, quando infectadas mais tardiamente tornam-se duras e escuras, com a superfície “enrugada” (GARRIDO; SÔNEGO, 2003).

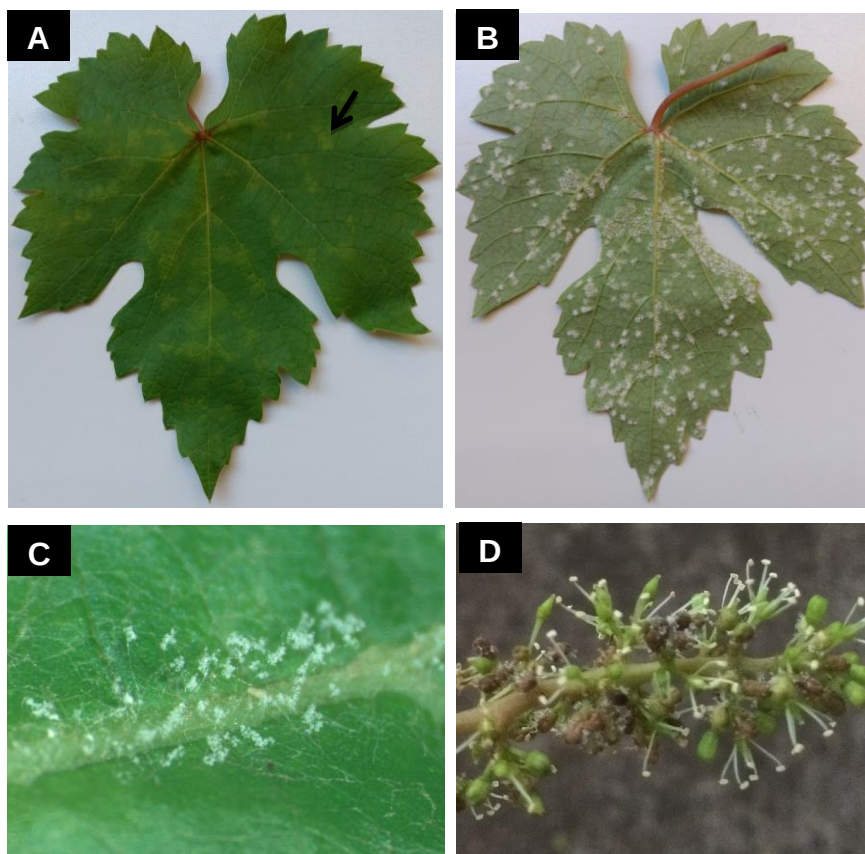


Figura 1. Sintomas de míldio (*Plasmopara viticola*) em videira. A) Lesões na superfície adaxial das folhas, conhecida como “mancha de óleo” (indicado pela seta preta); B) Esporulação do míldio na superfície abaxial das folhas chamado de “mancha branca” ou “mancha mofo”; C) Esporangióforos e esporângios de *P. viticola*; D) Escurecimento e destruição de flores afetadas pelo patógeno.

Fonte das fotos: Autoria própria (A-C); Érica Okamura (D).

O míldio é controlado principalmente por meio de aplicações de fungicidas realizadas diversas vezes durante o período de crescimento da videira (PEARSON; GOHEEN, 1988; PEZET et al., 2004). Levantamento realizado no ano de 2012 na região de Jales, SP, mostrou os produtores que realizam, em média, 103 e 59 aplicações de fungicidas em uvas finas (*Vitis vinifera*) e em rústicas (*Vitis labrusca*), respectivamente (COSTA; TARSITANO; CONCEIÇÃO, 2012). O número médio de aplicações de fungicidas no Rio Grande do Sul é de 14 aplicações (FREIRE et al., 1992) das quais, oito a dez são para o controle do míldio (MENDES, 2002). Em outras partes do mundo, por exemplo, em Ohio, EUA, o míldio é uma

das principais restrições à produção de uva (ELLIS, 1994). Neste local, são necessárias entre quatro a dez pulverizações por ciclo produtivo, de acordo com o calendário padrão (MADDEN et al., 2000).

Um dos primeiros agrotóxicos descobertos pelo homem para o controle do míldio da videira foi a calda bordalesa na França, em 1882 (MILLARDET, 1885 apud GESSLER; PERTOT; PERAZZOLLI, 2011). Entretanto, após a Segunda Guerra mundial, diminuiu-se a disponibilidade de cobre para a agricultura o que obrigou os viticultores a utilizar menores doses de cobre e procurar produtos não cúpricos (GESSLER; PERTOT; PERAZZOLLI, 2011). Na década de 1960, compostos como o mancozebe (ditiocarbamatos), o captafol (ftalimida) e fungicidas sistêmicos como o benomil (metil benzimidazol carbamato - MBC), o clorotalonil (phthalonitrile), o carboxin e o oxycarboxin (carboxanilidas) foram introduzidos com grande sucesso no mercado de agroquímicos (RUSSELL, 2005). Já na década de 1970, foram descobertos o metalaxil (fenilamidas) e o propamocarbo (carbamato) (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2010) e na década seguinte foi a vez dos triazóis (inibidores da síntese de ergosterol - DMI) (RUSSELL, 2005).

No ano de 1996, foram lançadas no mercado as primeiras estrobilurinas comerciais (kresoxim metil e azoxistrobina) para uso no manejo de doenças agrícolas (CLOUGH; GODFREY, 1998 apud SAUTER; STEGLICH; ANKE, 1999). Por sua versatilidade e eficiência de controle, as estrobilurinas tornaram-se líderes de comercialização dentre os fungicidas sistêmicos (OLIVER; HEWITT, 2014). O grupo de fungicidas inibidores de quinona externa (QoI), conhecido como estrobilurina, é usado para o controle de diversas doenças fúngicas como as ferrugens, míldios, oídios e manchas foliares (KUHN et al., 2003). Estes fungicidas agem na inibição da enzima quinona oxidase a qual atua no complexo III da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria (BARTLETT et al., 2002; FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2010).

Na viticultura francesa, os fungicidas QoI foram introduzidos no ano de 1998 e apenas dois anos após o uso, foi reportada a ocorrência de resistência em populações de *P. viticola* (MAGNIEN et al., 2003 apud CHEN et al., 2007). Desde então, ocorrências de isolados de *P. viticola* com sensibilidade reduzida em campo para estrobilurinas já foi relatada em várias regiões produtoras de uva como em Maharashtra, na Índia (SAWANT; GHULE; SAWANT, 2016) e Virgínia, Carolina do Norte e Kentucky, nos EUA (BAUDOIN et al., 2008; GAUTHIER; AMSDEN, 2014). Segundo o FRAC (2016) os níveis de resistência aos fungicidas QoI em *P. viticola* encontrados em seus programas de monitoramento em 2015 e 2016 são altos na França (Champanha e Aquitânia) e Suíça (Tessino, Graubunden), e moderados na Áustria, na República Checa, na França (Pay de la Loire, Poitou Charentes, Languedoc Roussillon, Lorena, Meio-Dia-Pirinéus, Sabóia, Franche Comté), na Alemanha (Baden Württemberg), na Itália (Süd Tirol, Piemonte, Toscana, Emilia Romagna, Marche, Friuli , Veneto Abruzzo), em Portugal e na Eslovênia.

De acordo com o FRAC (*Fungicide Resistance Action Committee* – Comitê de Ação para Resistência a Fungicidas) três mutações associadas à resistência aos fungicidas QoI já foram detectadas no gene do citocromo b (*cytB*): a mudança de uma glicina por alanina na posição 143 (G143A), a substituição de fenilalanina para leucina na posição 129 (F129L) e a mudança de glicina para arginina na posição 137 (G137R) (FRAC, 2006).

Para estudar a relação evolucionária entre isolados de *P. viticola* resistentes e sensíveis a QoI, Chen et al. (2007) analisaram o gene *cytB* completo de diversos isolados europeus e americanos. Usando a análise de haplótipos foi possível identificar a presença de seis haplótipos (IS, IS', IR, IIS, IIS' e IIR) nas amostras dos isolados europeus e cinco haplótipos distintos nas amostras americanas (USA A, USA B, USA C, USA D e USA E). Nos haplótipos europeus IR e IIR estão presentes os isolados com a mutação G143A que confere resistência aos fungicidas

QoI e nos haplótipos europeus IS, IS', IIS, IIS' e nos cinco americanos, estão os isolados que não apresentam a mutação, sendo sensíveis a QoI.

No Brasil, Moraes (2016) com iniciadores desenhados para isolados de países da Europa, amplificou e sequenciou parte do gene *cytB* de isolados brasileiros. Neste trabalho foram analisados 15 isolados de *P. viticola* e 11 apresentaram mutação G143A no gene *cytB*.

Devido à carência de informações sobre a sensibilidade de isolados de *P. viticola* no Brasil e o excessivo uso de controle químico, este trabalho teve como objetivo ajustar uma metodologia para o teste de sensibilidade de *P. viticola* a piraclostrobina *in vivo*, avaliar a sensibilidade dos isolados a uma dose discriminatória, caracterizar molecularmente os isolados, relacionar a ocorrência da resistência ao manejo realizado pelos produtores de 'Niagara Rosada' e construir uma rede de haplótipos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Metodologias para avaliar a sensibilidade de *Plasmopara viticola* à piraclostrobina

Com a finalidade de definir a melhor metodologia para a inoculação do patógeno, considerando o tempo de conservação do tecido foliar e a eficiência de inoculação, foram realizados ensaios preliminares utilizando discos foliares depositados sobre ágar-água (2.1.1), estacas de videira mantidas em ambiente saturado com água (2.1.2) e folhas destacadas sobre ágar-água (2.1.3). Todos os ensaios foram utilizando *Vitis labrusca* cv. Niagara Rosada.

2.1.1. Teste de sensibilidade de *Plasmopara viticola* à piraclostrobina, utilizando discos foliares

Folhas do segundo ao quarto nó, contadas a partir do ápice, foram coletadas de plantas de 'Niagara Rosada', mantidas em vasos em casa-de-vegetação. Foram retirados discos foliares de 10 mm de diâmetro, com um furador e a superfície de cada disco foi desinfestada com imersão em álcool 70% por 10 s, seguido de imersão em hipoclorito de sódio 0,5% por 1 min e duplo enxágue em água destilada esterilizada por 20 s cada (Figura 2).

Após a desinfestação superficial, os discos foram secos em papel de filtro estéril (protocolo modificado de Furuya et al., 2010). Em seguida, os discos foram imersos por 1 min em solução do fungicida na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de piraclostrobina (fungicida Comet[®], i.a. 250 g L⁻¹ de piraclostrobina). Como controle, os discos foram imersos em água destilada estéril. Após secarem sobre o papel de filtro estéril, os discos foram depositados com a face abaxial voltada para cima em meio ágar-água (AA, 0,5%), acrescido de 50 mg de estreptomicina L⁻¹ em placas de Petri de 90 mm. Cada placa, contendo três discos foliares, foi considerada uma repetição com um total de três repetições para cada tratamento. As placas foram armazenadas por 24 h a 22 °C.

Para obtenção de inóculo, folhas sintomáticas apresentando intensa esporulação de *P. viticola* foram coletadas no campo experimental do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ, lavadas com água destilada e depositadas em caixas plásticas contendo papel de filtro umedecido e mantidas por 2 dias no escuro a 22 °C, a fim de estimular uma nova esporulação. Após esse período, os esporângios foram retirados com água destilada estéril a 6 °C, com o auxílio de uma escova com cerdas arredondadas. A concentração da suspensão foi ajustada para 5×10^4 esporângios mL^{-1} e refrigerada por 10 min. Cada disco foi inoculado com uma gota de 50 μL dessa suspensão e incubado durante 24 h no escuro. Após esse período, as placas de Petri foram mantidas por 7 dias a 22 °C, com 12 h de luz. A incidência da doença foi registrada avaliando a presença ou ausência de esporulação de *P. viticola* em relação ao controle.

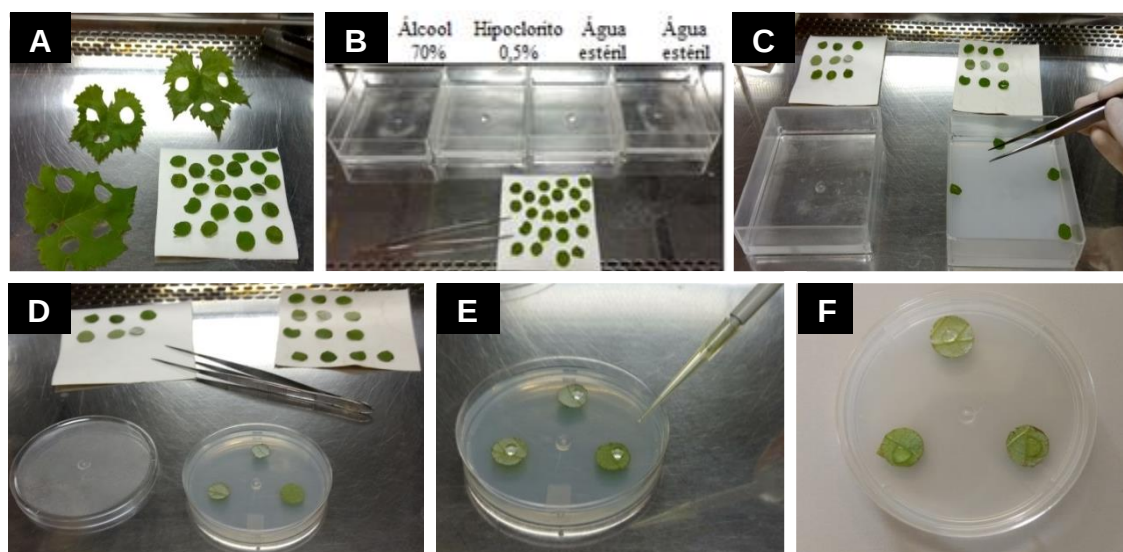


Figura 2. Método de avaliação da sensibilidade de isolados de *Plasmopara viticola* por meio de inoculação de discos foliares de ‘Niagara Rosada’ (*Vitis labrusca*). (A) Corte dos discos foliares; (B) Desinfestação superficial e secagem; (C) Tratamento dos discos com água (controle) ou fungicida; (D) Secagem e deposição dos discos sobre a placa com ágar-água; (E) Inoculação; (F) Incubação.

2.1.2. Teste de sensibilidade de *Plasmopara viticola* à piraclostrobina, utilizando estacas de ‘Niagara Rosada’ mantidas em água

Ramos de ano (lignificados) de ‘Niagara Rosada’ foram retirados, com uma tesoura de poda, de plantas em dormência, estabelecidas no pomar do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ. Foram testados quatro períodos diferentes de armazenamento em câmara fria (-10 °C): 0, 15, 30 e 80 dias, a fim de estimular as brotações. Em uma placa de poliestireno expandido com espessura de 20 mm, foram testados quatro espaçamentos distintos (orifícios realizados nos vértices das quadrículas com o auxílio de um furador) para a disposição dos ramos: 4 x 4, 5 x 5, 6 x 6 e 8 x 8 cm.

Transcorridos os intervalos de tempo dos ramos em armazenamento, realizou-se o corte dos ramos 8 cm abaixo e 0,7 cm acima da posição de cada gema, para obtenção das estacas. Em seguida, essas estacas foram inseridas nos orifícios da malha de poliestireno expandido e depositadas sobre uma caixa plástica com água. Logo após, foi testada a aplicação de cianamida hidrogenada (Dormex[®], 5% v/v) em metades das estacas e todas foram mantidas a 30 °C e 12 h de luz até iniciarem a brotação. No início da brotação, as estacas foram transferidas para casa de vegetação.

Quando as estacas apresentavam 2 a 3 folhas expandidas, foram aspergidas com a solução em água do fungicida Comet[®], na concentração de 100 µg mL⁻¹. Cada estaca na bandeja foi considerada uma repetição com um total de 12 estacas para cada tratamento. Estacas pulverizadas com água serviram como testemunha. Após a pulverização, as estacas foram armazenadas por 24 h a 22 °C.

Após esse período, a suspensão de inóculo na concentração de 5x10⁴ esporângios mL⁻¹, como descrita em 2.1.1, foi aspergida sobre a superfície abaxial da folha, até o ponto de escorrimento. Após a inoculação, as estacas foram mantidas em câmara úmida durante 24 h no escuro a 22 °C. Decorrido esse período, as estacas foram transferidas para câmaras de

crescimento por 7 dias a 22 °C, com 12 h de luz. A incidência da doença foi registrada avaliando a presença ou ausência de esporulação de *P. viticola* em relação à testemunha (Figura 3).

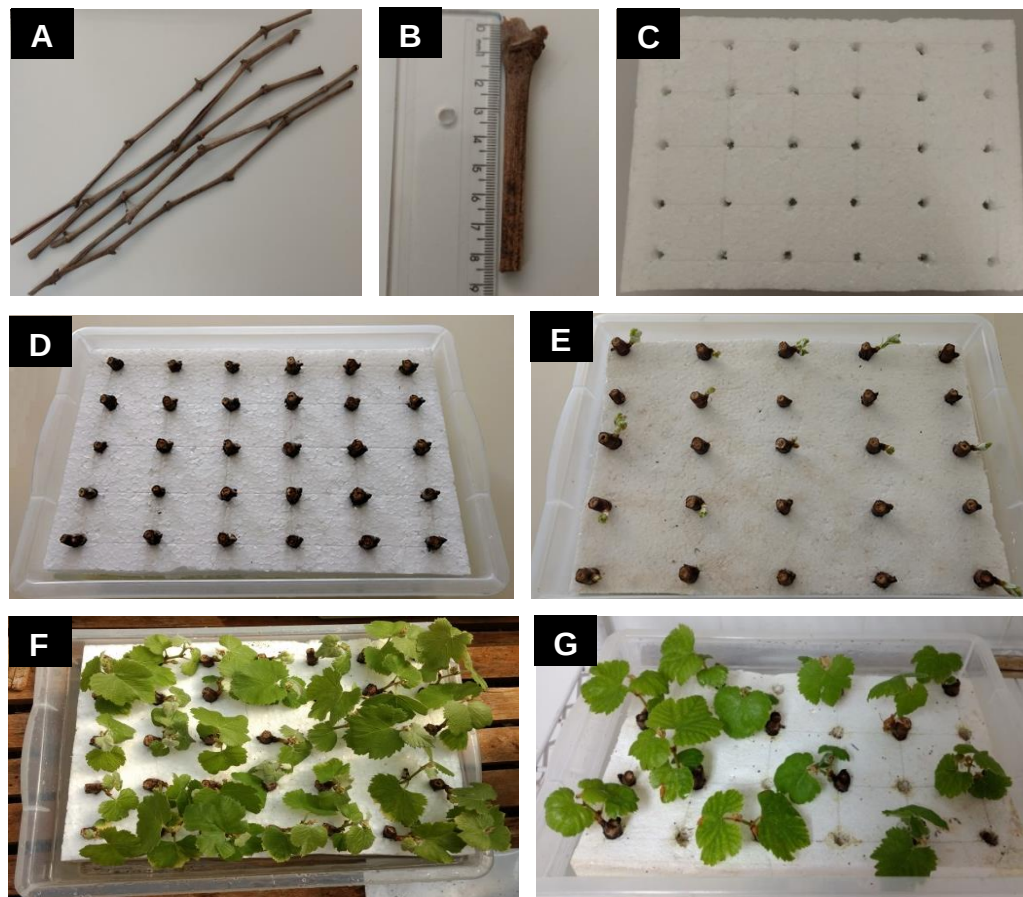


Figura 3. Método de avaliação da sensibilidade de isolados de *Plasmopara viticola* por meio de inoculação de estacas em água de ‘Niagara Rosada’ (*Vitis labrusca*). (A) Coleta dos ramos lenhosos em campo; (B) Corte das estacas; (C) Quadrículas equidistantes com os vértices furados; (D) Estacas depositadas na malha de poliestireno expandido sobre a água; (E) Início da brotação das estacas; (F) Transferência das estacas para casa de vegetação; (G) Tratamento com água ou fungicidas nas folhas.

2.1.3. Teste de sensibilidade de *Plasmopara viticola* à piraclostrobina, utilizando folhas destacadas de ‘Niagara Rosada’

Folhas do segundo ao quarto nó, contadas a partir do ápice foram coletadas de plantas envasadas de ‘Niagara Rosada’ mantidas em casa-de-vegetação e sua superfície foi desinfestada como descrito em 2.1.1 e secas em papel de filtro estéril.

Após a desinfestação, as folhas foram imersas por 60 s na solução do fungicida Comet[®] na concentração de 100 µg mL⁻¹ de piraclostrobina ou em água destilada estéril para o controle. Após as folhas secarem sobre papel de filtro estéril, elas foram depositadas em placas de Petri de 150 mm sobre bastonetes de madeira, os quais foram colocados sobre meio de cultura AA + 50 mg de estreptomicina L⁻¹. A face abaxial das folhas foi voltada para cima e, quando possível, seu pecíolo foi mantido em contato com o meio (Figura 4). Cada placa, contendo uma folha, foi considerada uma repetição. As placas de Petri foram armazenadas por 24 h a 22 °C.

Vinte e quatro horas após o tratamento, a suspensão de inóculo na concentração de 5x10⁴ esporângios mL⁻¹ do isolado de *P. viticola*, preparada como descrito em 4.1.1, foi aspergida sobre a superfície abaxial das folhas tratadas ou não com fungicida. As folhas foram incubadas durante 24 h no escuro e após esse período as placas de Petri foram mantidas por 7 dias a 22 °C, com 12 h de luz.

A incidência da doença foi registrada avaliando a presença ou ausência de esporulação de *P. viticola* em relação ao controle. Para cada isolado foram utilizadas três repetições.

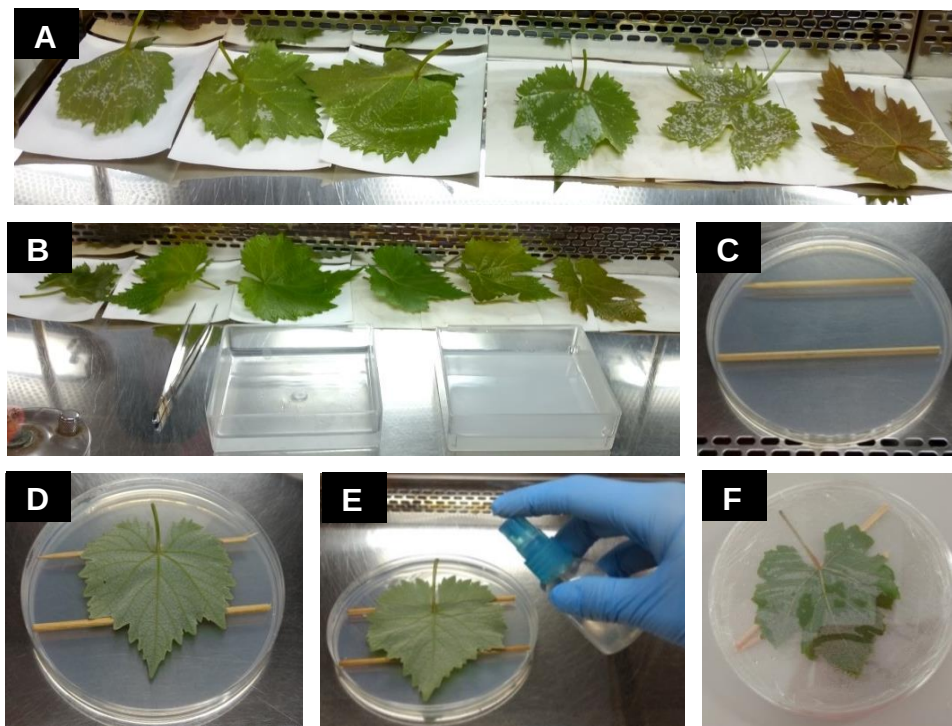


Figura 4. Método de avaliação da sensibilidade de isolados de *Plasmopara viticola* por meio de inoculação de folhas destacadas de ‘Niagara Rosada’ (*Vitis labrusca*). (A) Secagem das folhas após a desinfestação da superfície foliar; (B) Tratamento com água ou fungicida e secagem das folhas; (C) Bastonetes de madeira sobre a placa de Petri; (D) Depósito da folha com a face abaxial voltada para cima; (E) Inoculação; (F) Incubação.

2.2. Coleta de isolados de *Plasmopara viticola*

Durante os meses de agosto de 2017 a março de 2018 foram coletadas folhas de videira com sintomas típicos de míldio em propriedades comerciais e não comerciais. As amostras foram coletadas em municípios dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul (Figura 5), totalizando 15 vinhedos amostrados e 36 isolados (Tabela 1).

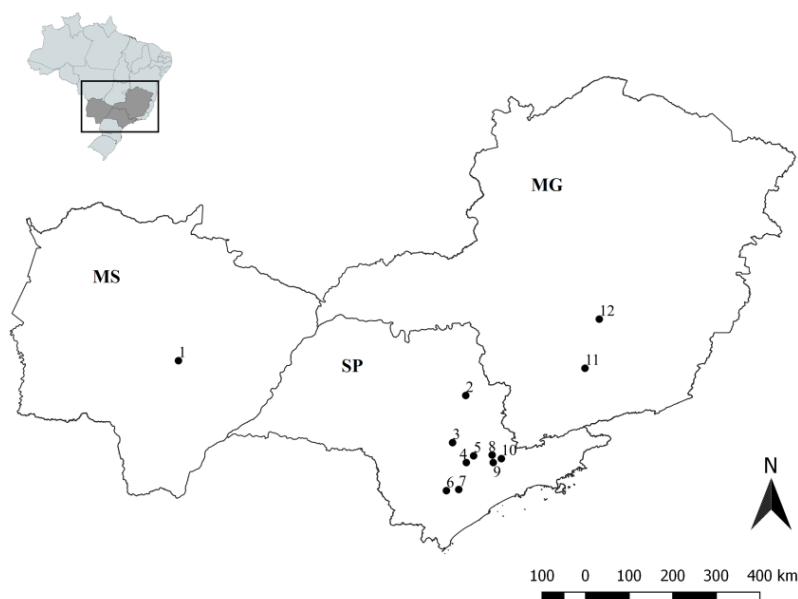


Figura 5. Coleta de isolados de *Plasmopara viticola* nos Estados de Mato Grosso do Sul (MS), São Paulo (SP) e Minas Gerais (MG). Os municípios são indicados no mapa por números: 1- Campo Grande, 2- Santa Rita do Passa Quatro, 3- Piracicaba, 4- Porto Feliz, 5- Elias Fausto, 6- São Miguel Arcanjo, 7- Pilar do Sul, 8- Louveira, 9- Jundiaí, 10- Jarinu, 11- Bom Sucesso e 12- Florestal.

Tabela 1. Origem, número de vinhedos amostrados e número de isolados de *Plasmopara viticola* analisados neste estudo.

Estado Município	Vinhedos Amostrados	Isolados analisados
Estado de São Paulo		
Elias Fausto	1	1
Jarinu	1	2
Jundiaí	1	3
Louveira	1	2
Pilar do Sul	2	3
Piracicaba	2	5
Porto Feliz	2	13
Santa Rita do Passa Quatro	1	2
São Miguel Arcanjo	1	1
Estado de Minas Gerais		
Bom Sucesso	1	1
Florestal	1	1
Estado de Mato Grosso do Sul		
Campo Grande	1	2
Total	15	36

Em cada vinhedo, foram amostradas ao menos 3 folhas com sintomas de míldio de plantas distantes. As folhas amostradas foram lavadas em água e colocadas em caixas plásticas tampadas contendo papel de filtro umedecido e mantidas por 2 dias no escuro a 22 °C. Após esse período, apenas a folha que apresentava esporulação em grande área foi selecionada para a retirada do inóculo.

Os nomes dos isolados, o local coletado, a data de coleta, os fungicidas utilizados pelo produtor e a regularidade de aplicação dos produtos na área amostrada estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Denominação do isolado de *Plasmopara viticola*, município de coleta, data de coleta, espécie de *Vitis* amostrada, modo de condução da videira, fungicidas aplicados, modo de aplicação e regularidade de pulverização nos vinhedos.

Município de coleta	Data de coleta	Espécie	Isolado	Modo de condução	Produtos comerciais aplicados ¹	Regularidade de aplicação ²	Modo de aplicação
Elias Fausto	10/03/2018	<i>Vitis labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I37	Espaldeira	Ridomil Gold MZ [®] e calda bordalesa	Semanal	Não foi informado
Jarinu	17/02/2018	Híbrido interespecífico cv. Lorena	I35	Y	Dithane [®] , Ridomil Gold MZ [®] e calda bordalesa	Semanal	Não foi informado
Jarinu	17/02/2018	Híbrido interespecífico cv. Lorena	I36	Y	Dithane [®] , Ridomil Gold MZ [®] e calda bordalesa	Semanal	Não foi informado
Jundiaí	17/02/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I29	Espaldeira	Há controle químico, porém não foram informados os produtos nem quando foram aplicados		Pulverizador turbo atomizador
Jundiaí	17/02/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I30	Espaldeira	Há controle químico, porém não foram informados os produtos nem quando foram aplicados		Pulverizador turbo atomizador
Jundiaí	17/02/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I31	Espaldeira	Há controle químico, porém não foram informados os produtos nem quando foram aplicados		Pulverizador turbo atomizador
Louveira	17/02/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I33	Espaldeira	Dithane [®] , Censor [®] , Curzate [®] , Ridomil Gold MZ [®] , Forum [®] e calda bordalesa	Semanal	Pulverizador turbo atomizador

Tabela 1. Continuação.

Município de coleta	Data de coleta	Espécie	Isolado	Modo de condução	Produtos comerciais aplicados ¹	Regularidade de aplicação ²	Modo de aplicação
Louveira	17/02/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I34	Espaldeira	Dithane [®] , Censor [®] , Curzate [®] , Ridomil Gold MZ [®] , Forum [®] e calda bordalesa	Semanal	Pulverizador turbo atomizador
Pilar do Sul (Área 1)	20/11/2017	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I4	Espaldeira	Nenhum produto	-	-
Pilar do Sul (Área 2)	20/11/2017	<i>V. vinifera</i> cv. Benitaka	I5	Latada	Ranman [®]	A cada dois dias quando clima for favorável	Pulverizador turbo atomizador
Pilar do Sul (Área 2)	25/02/2018	<i>V. vinifera</i> var. APPC007	I32	Latada	Curzate [®] e calda bordalesa	1 a 2 vezes na semana	Pulverizador turbo atomizador
Piracicaba (Área 1)	09/01/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I13	Y	Nenhum produto	-	-
Piracicaba (Área 1)	09/01/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I15	Y	Nenhum produto	-	-
Piracicaba (Área 1)	09/01/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I16	Y	Nenhum produto	-	-
Piracicaba (Área 2)	23/01/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Isabel	I18	Espaldeira	Calda Bordalesa	Esporadicamente	Pulverizador costal
Piracicaba (Área 2)	23/01/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Isabel	I19	Espaldeira	Calda Bordalesa	Esporadicamente	Pulverizador costal

Tabela 1. Continuação.

Município de coleta	Data de coleta	Espécie	Isolado	Modo de condução	Produtos comerciais aplicados ¹	Regularidade de aplicação ²	Modo de aplicação
Porto Feliz (Área 1)	28/08/2017	<i>V. vinifera</i> cv. Itália	I1	Latada	Curzate [®] e Dithane [®]	Ambos duas vezes por semana	Pulverizador turbo atomizador
Porto Feliz (Área 1)	12/10/2017	<i>V. vinifera</i> cv. Itália	I3	Latada	Curzate [®] e Dithane [®]	Ambos duas vezes por semana	Pulverizador turbo atomizador
Porto Feliz (Área 1)	24/11/2017	<i>V. vinifera</i> cv. Itália	I9	Latada	Curzate [®] e Dithane [®]	Ambos duas vezes por semana	Pulverizador turbo atomizador
Porto Feliz (Área 1)	08/02/2018	<i>V. vinifera</i> cv. Itália	I21	Latada	Curzate [®] e Dithane [®]	Ambos duas vezes por semana	Pulverizador turbo atomizador
Porto Feliz (Área 1)	08/02/2018	<i>V. vinifera</i> cv. Itália	I22	Latada	Curzate [®] e Dithane [®]	Ambos duas vezes por semana	Pulverizador turbo atomizador
Porto Feliz (Área 1)	16/02/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I25	Latada	Curzate [®] e Dithane [®]	Ambos duas vezes por semana	Pulverizador turbo atomizador
Porto Feliz (Área 1)	16/02/2018	<i>V. vinifera</i> cv. Itália	I26	Latada	Curzate [®] e Dithane [®]	Ambos duas vezes por semana	Pulverizador turbo atomizador
Porto Feliz (Área 2)	24/11/2017	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I6	Espaldeira	Ridomil Gold MZ [®] e Amistar [®]	Semanal	Pulverizador turbo atomizador
Porto Feliz (Área 2)	24/11/2017	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I7	Espaldeira	Ridomil Gold MZ [®] e Amistar [®]	Semanal	Pulverizador turbo atomizador
Porto Feliz (Área 2)	24/11/2017	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I8	Espaldeira	Ridomil Gold MZ [®] e Amistar [®]	Semanal	Pulverizador turbo atomizador

Tabela 1. Continuação.

Município de coleta	Data de coleta	Espécie	Isolado	Modo de condução	Produtos comerciais aplicados ¹	Regularidade de aplicação ²	Modo de aplicação
Porto Feliz (Área 2)	11/01/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I10	Y	Ridomil Gold MZ [®] e Amistar [®]	Semanal	Pulverizador turbo atomizador
Porto Feliz (Área 2)	11/01/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I17	Y	Ridomil Gold MZ [®] e Amistar [®]	Semanal	Pulverizador turbo atomizador
Porto Feliz (Área 2)	30/01/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I20	Y	Ridomil Gold MZ [®] e Amistar [®]	Semanal	Pulverizador turbo atomizador
Santa Rita do Passa Quatro	13/02/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I23	Espaldeira	Nenhum produto	-	-
Santa Rita do Passa Quatro	13/02/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I24	Espaldeira	Nenhum produto	-	-
São Miguel Arcanjo	12/10/2017	<i>V. vinifera</i>	I2	Latada	Nenhum produto	-	-
Bom Sucesso	02/01/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I12	Espaldeira	Nenhum produto	-	-
Florestal	13/01/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I11	Latada	Nenhum produto	-	-
Campo Grande	18/02/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I27	Espaldeira	Nenhum produto	-	-
Campo Grande	18/02/2018	<i>V. labrusca</i> cv. Niagara Rosada	I28	Espaldeira	Nenhum produto	-	-

¹ Amistar: QoI (Inibidores da quinona externa); Calda Bordalesa: Inorgânico; Censor: QoI; Curzate: Ditiocarbamato + Cianoacetamida-oxima; Dithane: Ditiocarbamato; Forum: CAA (Amida do ácido carboxílico); Ranman: QiI (Inibidores da quinona interna); Ridomil Gold MZ: PA(Fenilamida) + Ditiocarbamato.

² Os produtos são utilizados de forma alternada.

2.3. Teste de sensibilidade de isolados de *Plasmopara viticola* à piraclostrobina

Baseados nos resultados dos experimentos preliminares os ensaios de sensibilidade foram conduzidos utilizando o método das folhas destacadas para a verificação da sensibilidade do patógeno à piraclostrobina *in vivo*, conforme descrito em 2.1.3.

2.4. Extração de DNA

De uma folha infectada do tratamento testemunha, foram retirados 10 discos foliares de 10 mm de diâmetro com esporulação do patógeno com o auxílio de um furador. Cada disco foi colocado em um tubo de microcentrifuga de 2 mL contendo 0,4 g de cloreto de cálcio hidratado, coberto por uma camada de algodão esterilizado e em seguida, mantidos a 6 °C até ser realizada a extração de DNA. Nove discos de cada isolado permaneceram armazenados a 6 °C e um deles foi utilizado para a extração de DNA.

A extração de DNA total foi realizada conforme o protocolo de Lo Piccolo et al. (2012) com algumas modificações. Cada disco foliar foi macerado com um pistilo com nitrogênio líquido dentro de um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tampão de extração [2% CTAB (brometo de cetil trimetil amônio), 100 mM Tris-HCl (pH 8), 25 mM EDTA (pH 8), 2,5 M NaCl, 2% PVP (polivinilpirrolidona), 1% β-mercaptoetanol] previamente aquecido à temperatura de 60-65 °C. O tubo foi agitado vigorosamente e incubado por 60 min sob 65 °C em banho-maria, com inversão do tubo por 3 a 4 vezes, em intervalos de 15 min. A amostra foi centrifugada por 14 min na velocidade de 13.600 rpm sob temperatura de 4 °C e o sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Ao sobrenadante coletado foram adicionados 450 µL da solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), misturado por inversão e depois centrifugado por 14 min na velocidade de 13.600 rpm a 4 °C. Novamente o sobrenadante foi transferido

para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 450 µL de isopropanol gelado (-20 °C), misturado por inversão e o tubo foi incubado por 16 h a -20 °C. O DNA precipitado foi então centrifugado por 15 min na velocidade de 15.000 rpm à temperatura de 4 °C e o sobrenadante, descartado. O precipitado de DNA formado foi lavado com 450 µL de etanol 70 % gelado (-20 °C) e centrifugado por 5 min na velocidade de 15.000 rpm à temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA foi então seco a 37 °C e ressuspensionado em 40 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl (pH 8); 10 mM EDTA). Em cada amostra foi adicionado 1 µL de RNase (10 mg mL⁻¹), seguido de incubação em banho-maria por 30 min à 37 °C. As amostras foram armazenadas a -20 °C.

2.5. PCR e sequenciamento de parte do gene *cytB*

Após a extração de DNA total, foram realizadas a amplificação e o sequenciamento da região do gene *cytB*, que confere resistência aos fungicidas QoI, conforme descrito por Moraes (2016), utilizando os iniciadores COB279_F (CHEN et al., 2004 apud MATASCI et al., 2008) e StrobiR (SYNGENTA LTD, 2003). Esse procedimento foi realizado no Departamento de Genética com a colaboração da pós-doutoranda Patrícia Dayane Carvalho Schaker sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Claudia Barros Monteiro-Vitorello.

Em cada reação de PCR foi usado 1 µL de DNA (30 ng µL⁻¹), 200 µM de dNTPs, 0,4 µM dos iniciadores direto e reverso, 2 mM MgCl₂ e 1,25 unidades de Taq polimerase (GeneDirex), em um volume final de 25 µL. As reações foram incubadas a 94 °C por 1 minuto, seguidamente por 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C, com uma etapa final de extensão de 72 °C por 8 minutos. A verificação da amplificação foi feita utilizando-se eletroforese em gel de agarose (concentração 1,2 %). Os produtos de PCR e o marcador de peso molecular foram corados com SYBR Gold (Applied Biosystems) e o gel fotografado com o fotodocumentador Kodak EDAS 120 (Kodak).

A verificação das mutações que conferem resistência aos fungicidas QoI (F129L, G137R e G143A), foi realizada conforme descrito por Chen et al. (2007). Foram alinhadas as sequências dos isolados de *P. viticola* com uma sequência de DNA do gene *cytB* considerada sensível (nº acesso GenBank DQ459459.1) e uma resistente (nº acesso GenBank DQ459469.1). Em seguida, as sequências foram alinhadas e comparadas às sequências referências para verificar a presença de mutações nos códons 129, 137 e 143, conhecidas por conferir resistência a QoI, usando o programa BioEdit (HALL, 1999).

2.6. Caracterização do manejo realizado pelos produtores

Para caracterizar o manejo realizado pelos produtores foram reunidas informações provenientes de cada local onde foram coletados os isolados, particularmente o modo de condução das cultivares, a frequência das aplicações dos fungicidas, os tipos de fungicidas empregados e o modo de aplicação (Tabela 2).

2.7. Rede de haplótipos

Para a caracterização da diversidade genética intraespecífica de isolados de *P. viticola*, foi realizada a análise de haplótipos a partir de parte do gene *cytB* utilizando o programa DnaSP V.5.10.01 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Para a análise, foram utilizadas as 36 sequências dos isolados em estudo e 9 sequências de haplótipos referência provenientes de isolados de populações americanas e européias, conforme descrito por Chen et al. (2007), depositadas no GenBank [nº de acesso de haplótipos americanos: (A) DQ459459, (B) DQ459460, (C) DQ459461, (D) DQ459462, (E) DQ459463; nº acesso de haplótipos europeus: (IS) DQ459464, (IR) DQ459466, (IIS) DQ459467, (IIR) DQ459469].

Para realizar a identificação da relação de evolução da população estudada, foi construída uma rede de haplótipos com o auxílio do programa TCS v1.21 (CLEMENT;

POSADA; CRANDALL, 2000). Foram incluídos os indels (*gaps*) na análise e o limite de conexão foi estabelecido em 95% de confiabilidade (TEMPLETON; CRANDALL; SING, 1992).

3. RESULTADOS

3.1. Definição da metodologia

O método com os discos foliares depositados sobre o meio ágar-água, não apresentou resultados satisfatórios. O inóculo depositado sobre os discos foliares permaneceu por 10 dias sem que a água de gota secasse. Com isso, houve contaminação com microrganismos oportunistas e o substrato foliar sofreu degradação antes do aparecimento dos sintomas (Figura 6).

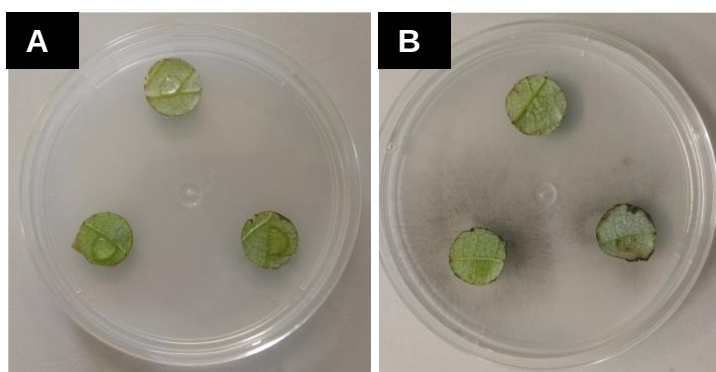


Figura 6. (A) Discos na placa de Petri com 7 dias após a inoculação contendo a gota de suspensão; (B) meio de cultura com 13 dias após a inoculação apresentando contaminação e início de degradação dos discos foliares.

No método com as estacas em água, observou-se que, independentemente do tempo em que os ramos lenhosos ficavam na câmara fria, a brotação ocorria com 11 dias após o tratamento com Dormex[®] a 30 °C. Estacas não tratadas com esse produto brotavam apenas 31 dias após a instalação do experimento. O espaçamento mais adequado das quadrículas no poliestireno expandido foi o de 6 x 6 cm por apresentar melhores resultados na arquitetura foliar (Figura 7). Folhas das estacas tratadas com o fungicida apresentavam os bordos necrosados e queda 7 dias após o tratamento. Além disso, poucas folhas das estacas do tratamento testemunha apresentaram sintomas da doença (Figura 8).



Figura 7. Estacas com 20 dias na água: lado esquerdo sem aplicação e lado direito com aplicação de Dormex[®].

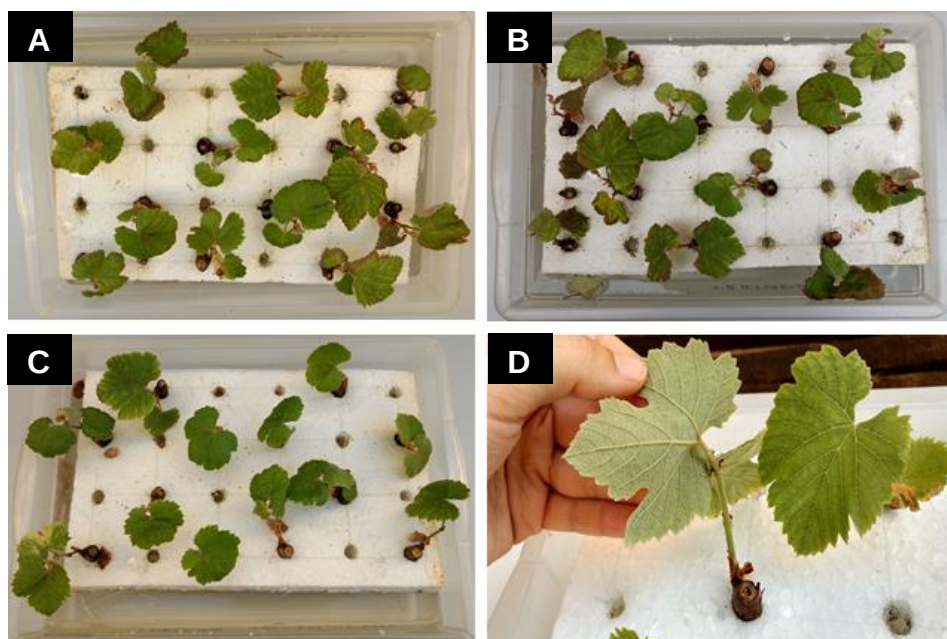


Figura 8. Estacas de 'Niagara Rosada' mantidas sobre placas de poliestireno expandido (A) aos 7 dias após o tratamento com fungicida. Nesta ocasião a maior parte das folhas apresentava necrose nos bordos. (B) Estacas brotadas aos 10 dias após o tratamento com fungicida, com início da queda das folhas; (C) estacas do tratamento testemunha aos 7 dias após a instalação do experimento; (D) estacas do tratamento testemunha inoculadas, porém sem sintomas.

Os ensaios de sensibilidade para todos os 36 isolados coletados foram então conduzidos com o método das folhas destacadas, por fornecerem os resultados mais consistentes para a verificação da sensibilidade do patógeno a estrobilurina (Figura 9). As folhas permaneceram em bom estado por 12 dias e o patógeno apresentou distribuição homogênea no tratamento controle.

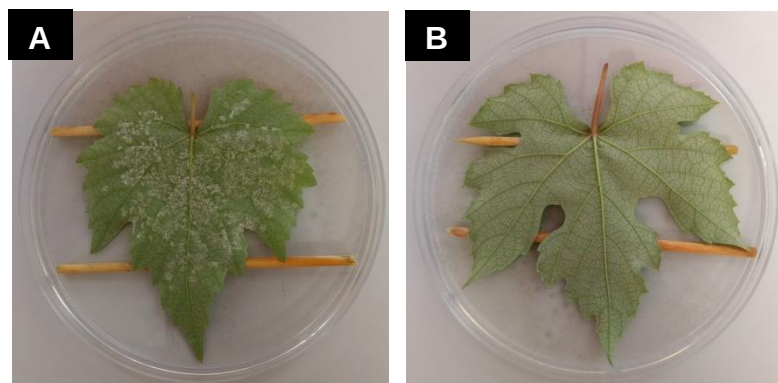


Figura 9. Folhas destacadas de ‘Niagara Rosada’ aos 7 dias após a inoculação. (A) testemunha e (B) tratada com fungicida.

3.2. Teste de sensibilidade

Das doze coletas realizadas nos vinhedos de Porto Feliz, todos os isolados da Área 1 (7 coletas) esporularam na presença de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de piraclostrobina (Figura 10). Entretanto na outra área do mesmo município (Área 2) todos os isolados mostraram sensibilidade ao fungicida (Figura 11). Esse fenótipo foi repetido em todos os demais isolados coletados neste estudo.

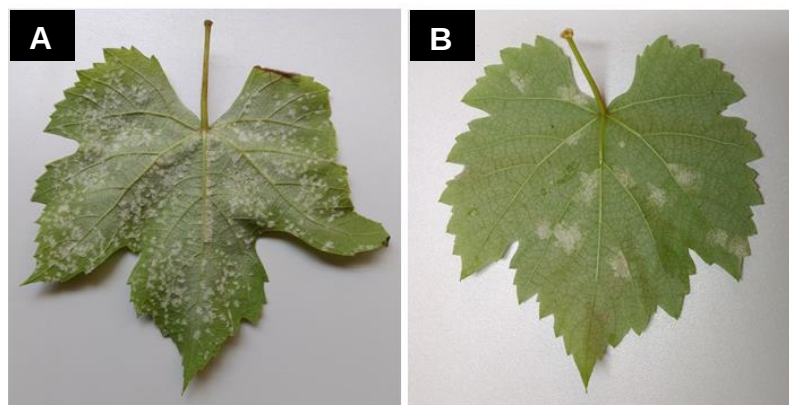


Figura 10. Folhas destacadas de ‘Niagara Rosada’ aos 7 dias após a inoculação do Isolado I1 coletado na Área 1 de Porto Feliz. (A) testemunha e (B) tratada com fungicida, ambas apresentando sintomas de míldio.

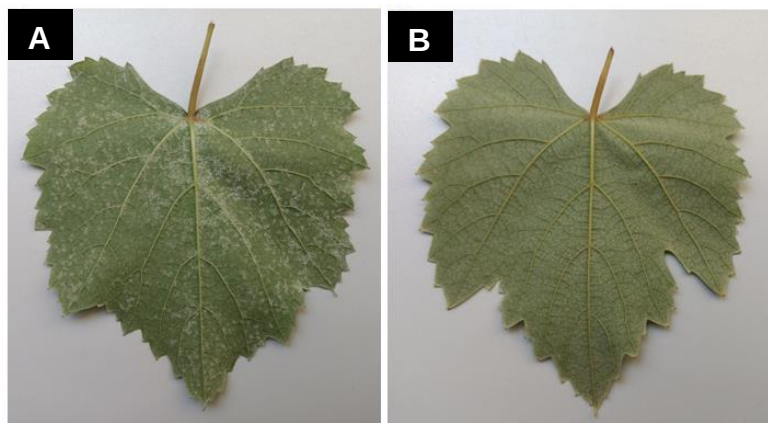


Figura 11. Folhas destacadas de ‘Niagara Rosada’ aos 7 dias após a inoculação do Isolado I6 coletado na Área 2 de Porto Feliz. (A) testemunha com sintomas de míldio e (B) tratada com fungicida, sem sintomas.

3.3. Extração de DNA

Para a maioria dos isolados analisados neste estudo, após a realização da extração do DNA, foi possível a visualização de uma banda única, de alto peso molecular e sem sinal de degradação (Figura 12).

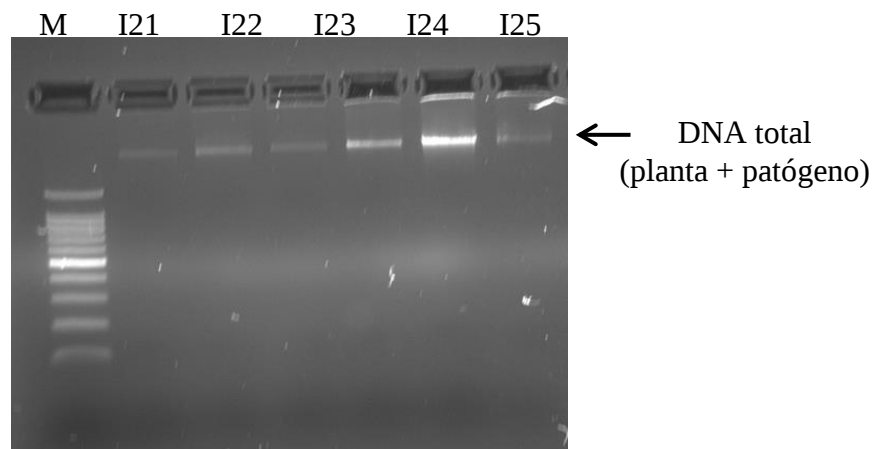


Figura 12. Gel de eletroforese em agarose (1,5 %) feito em tampão TBE 0,5X. Foram corridos 1 ul do marcador (M) *Ladder* 100 pb e 8 ul de cada amostra, que corresponde ao DNA de 6 isolados logo após a extração. Tempo de corrida 30 minutos a 100 V. Tampão para corrida: TBE 0,5X.

3.4. PCR e sequenciamento de parte do gene *cytB*

Em todos os isolados coletados para este estudo foi amplificado um fragmento com tamanho de 650 pb aproximadamente (Figura 13). Os *amplicons* sequenciados tinham em média 548 pb (Figura 14).

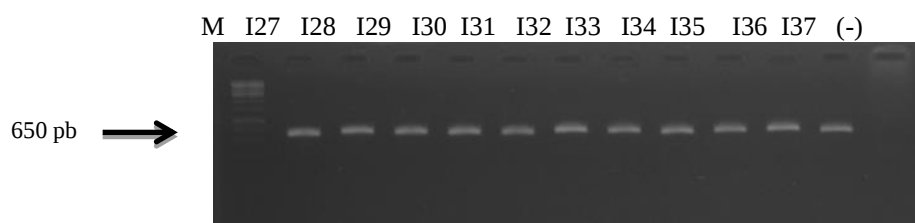


Figura 13. Gel de eletroforese em agarose (1,2 %) feito em tampão TBE 0,5X. Foram corridos 5 μ L do marcador (M) 1 Kb Plus (*Invitrogen*), 5 μ L do controle negativo (-) e das amostras I27 a I37, que correspondem ao PCR com os iniciadores específicos. O fragmento amplificado tem aproximadamente 650 pb. Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos a 40 V. Tampão para corrida: TBE 0,5X.

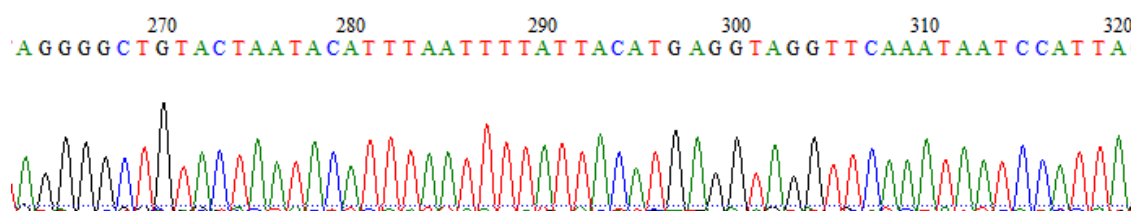


Figura 14. Parte do cromatograma da sequência amplificada do gene *cytB*. Os picos do cromatograma estão altos e distinguíveis.

Na Tabela 3 encontra-se o resultado da caracterização molecular da região correspondente à mutação que confere resistência aos fungicidas QoI (G143A) comparado com o que foi obtido nos testes de sensibilidade de cada isolado. Todas as vezes em que o fenótipo mostrava resistência, houve confirmação na análise molecular. No entanto, em alguns isolados o fenótipo resultante dos testes de sensibilidade não correspondeu com o genótipo encontrado. Em 12 isolados, o fenótipo foi sensível e o genótipo mostrou resistência. Em nenhum dos isolados estudados foram encontradas as outras mutações (F129L e G137R) (Figura 15).

Tabela 3. Caracterização dos isolados de míldio da videira em resistentes (R) com a mutação GCT no códon 143 e sensível (S) apresentando GGT.

Município	Isolado	Teste sensibilidade	Análise molecular	Município	Isolado	Teste sensibilidade	Análise molecular
Elias Fausto	I37	S	S	Porto Feliz (A1)	I3	R	R
Jarinu*	I35	S	R	Porto Feliz (A1)	I9	R	R
Jarinu*	I36	S	R	Porto Feliz (A1)	I21	R	R
Jundiaí	I29	S	S	Porto Feliz (A1)	I22	R	R
Jundiaí	I30	S	S	Porto Feliz (A1)	I25	R	R
Jundiaí	I31	S	S	Porto Feliz (A2)	I26	S	S
Louveira*	I33	S	R	Porto Feliz (A2)	I6	S	S
Louveira*	I34	S	R	Porto Feliz (A2)	I7	S	S
Pilar do Sul (A1)*	I4	S	R	Porto Feliz (A2)	I8	S	S
Pilar do Sul (A2)*	I5	S	R	Porto Feliz (A2)	I10	S	S
Pilar do Sul (A2)*	I32	S	R	Porto Feliz (A2)	I17	S	S
Piracicaba (A1)	I13	S	S	Santa Rita do Passa Quatro	I20	S	S
Piracicaba (A1)	I14	S	S	Santa Rita do Passa Quatro*	I23	S	R
Piracicaba (A1)	I15	S	S	São Miguel Arcanjo*	I24	S	R
Piracicaba (A2)*	I16	S	R	Bom Sucesso	I2	S	S
Piracicaba (A2)*	I18	S	R	Florestal*	I11	S	R
Porto Feliz (A1)	I19	R	R	Campo Grande	I27	S	S
Porto Feliz (A1)	I1	R	R	Campo Grande	I28	S	S

* Isolados no qual o fenótipo não corresponde ao genótipo.

> Isolado_1		
1152	GCTTTATGGTGTTTCAGGGGTAATTATTTTTATTTAATGATGGCGACTG	1200
	Códon 129 Códon 137 Códon 143	
1201	CA[TTT]ATGGGTTATGTTTTGCCTTGG[GGA]CAAATGAGTTTTTGG[GCT]GC	1249
1250	AACAGTTATTACAAATTTATTCTCGGCTATCCCATTAATTGGAAAAGAAG	1299
1300	TTGTTGACTGGTTATGGGGTGGATTCGCCGTTGATAATCCAACATTA	1348
1349	TCGTTTTTTTAGTTTACATTTACCTTTCCATTTGTAATTGTAGGGGCTG	1398
1399	TACTAATACATTTAATTTTATTACATGAGGTAGGTTCAAATAATCCATTA	1448
1449	GGTATCACTTTAAAACTGAGAATATACCATTTTATCCTTATTTCTATAC	1498
1499	AAAAGATTTATTTGGTTTAATCGTATTATTTTAAATTTTTTATATTTATT	1550
1551	TTTTACTACCCTAATACTTTAGGTCATCCGGATAATTATAT	1591

Figura 15. Localização dos códons 129, 137 e 143 na região do gene *cytB* do Isolado 1. Na posição do sítio 143 é possível observar a mutação no qual confere a resistência aos fungicidas QoI em *Plasmopara viticola*.

3.5. Caracterização do manejo do produtor

Podemos observar na Figura 16, que a frequência de pulverizações no período da safra para o controle do míldio da videira foi muito variável, dependendo do nível tecnológico de cada vinhedo. Não houve correlação entre o número de aplicações de fungicidas com a frequência de isolados resistentes. Em muitos vinhedos houve detecção molecular de resistência de *P. viticola* aos fungicidas do grupo químico das estrobilurinas mesmo na ausência de controle. Apenas no vinhedo do município de Louveira houve correlação entre a aplicação de produtos comerciais pertencentes ao grupo QoI e detecção molecular de resistência.

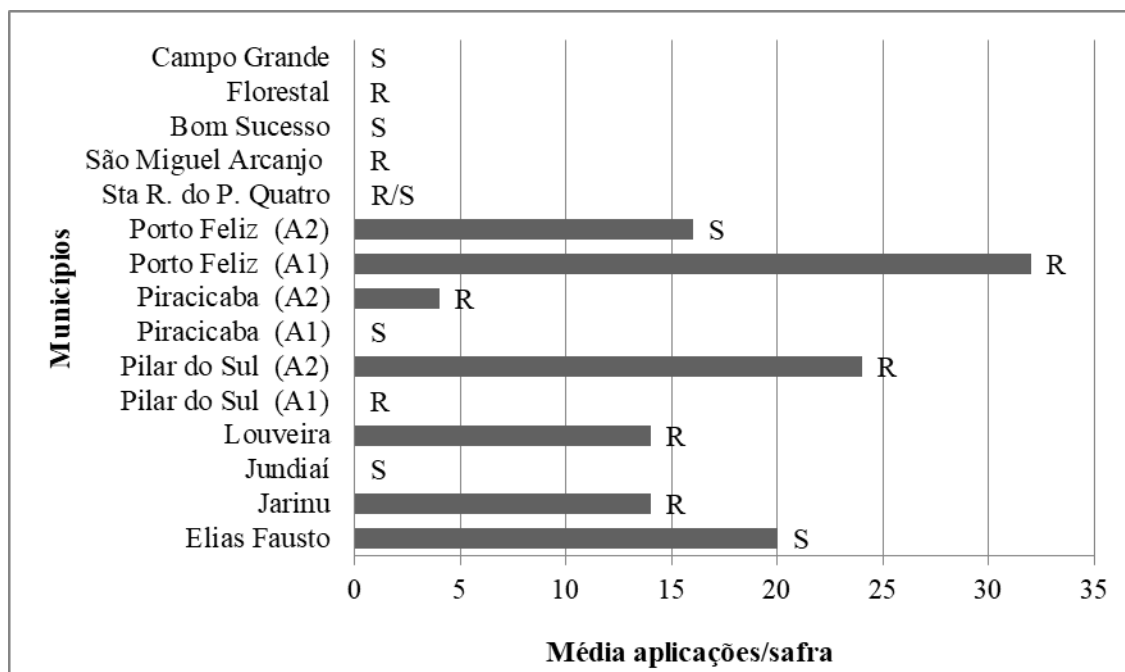


Figura 16. Presença ou ausência de isolados resistentes a estrobilurinas e sua relação ao número de aplicações de fungicidas por safra. Baseado no genótipo: R: resistente e S: sensível.

Em um vinhedo não comercial em Santa Rita do Passa Quatro, onde não são realizadas aplicações de nenhum tipo de fungicida, uma das amostras mostrou resistência e a outra amostra sensibilidade na análise molecular aos fungicidas QoI.

Os fungicidas utilizados pelos produtores nos vinhedos amostrados estão apresentados na Tabela 4, cada qual com o seu respectivo ingrediente ativo, grupo químico, nome do grupo, mecanismo de ação, risco de resistência e código FRAC.

No município de Porto Feliz foram estudadas duas áreas separadas por 10 km de distância (Figura 17). Na Área 1, a propriedade tem um histórico de produção de uva de mais de 30 anos, enquanto a Área 2, do mesmo proprietário, foi adquirida há alguns anos. Os isolados de *P. viticola* coletados na Área 1 apresentaram fenótipo (testes de sensibilidade *in vivo*) e genótipo (análises moleculares) resistentes. No entanto, na Área 2, onde a aplicação de fungicidas QoI é recente, todos os isolados coletados para estudo mostraram sensibilidade do patógeno ao fungicida do grupo QoI.

Tabela 4. Produtos utilizados nos locais de coleta dos isolados em estudo para o controle do míldio da videira.

Produtos Comerciais ¹	Ingrediente Ativo ¹	Nome do Grupo ²	Mecanismo de Ação ²	Risco de Resistência ²	Código FRAC ²
Amistar®	Azoxistrobina	QoI (Inibidores da quinona externa)	Respiração [complexo III: citocromo <i>bc1</i> no sítio Qo (gene <i>cytB</i>)]	Alto	11
Calda Bordalesa	Cobre	Inorgânico	Multissítio	Baixo	M1
Censor®	Fenamidona	QoI (Inibidores da quinona externa)	Respiração [complexo III: citocromo <i>bc1</i> no sítio Qo (gene <i>cytB</i>)]	Alto	11
Curzate®	Cimoxanil	Cianoacetamida-oxima	Desconhecido	Baixo a médio	27
	+ Mancozebe	+ Ditiocarbamato	+ Multissítio	Baixo	M3
Dithane®	Mancozebe	Ditiocarbamato	Multissítio	Baixo	M3
Forum®	Dimetomorfe	CAA (Amida do ácido carboxílico)	Síntese de celulose	Baixo a médio	40
Ranman®	Ciazofamida	QiI (Inibidores da quinona interna)	Respiração (complexo III: citocromo <i>bc1</i> no sítio Qi)	Médio a Alto	21
Ridomil Gold MZ®	Metalaxil-M	PA (Fenilamida)	Síntese de ácidos nucleicos (RNA polimerase I)	Alto	4
	+ Mancozebe	+ Ditiocarbamato	+ Multissítio	Baixo	M3

¹AGROFIT (2003); ²FRAC (2018).

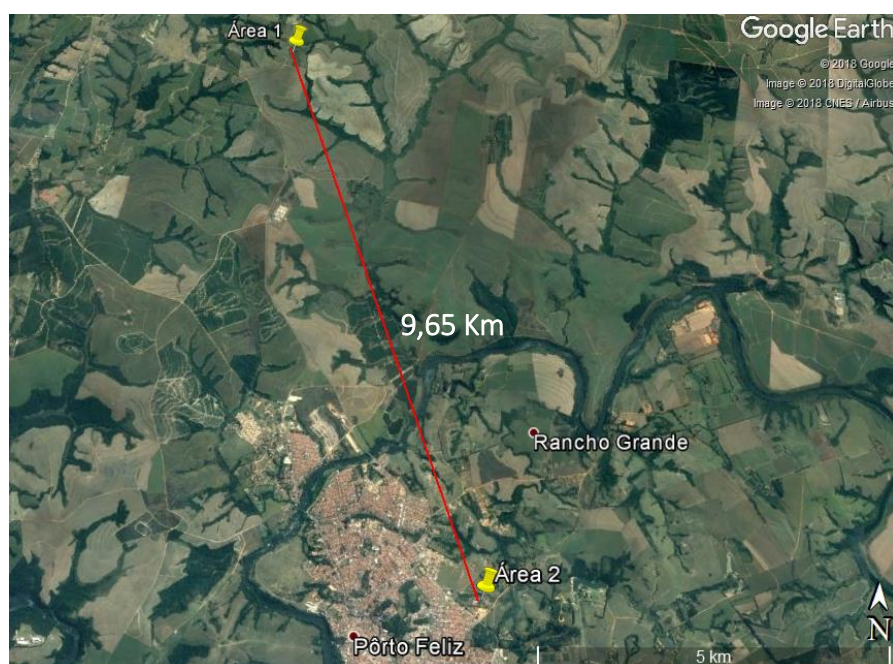


Figura 17. Distância entre as Áreas 1 e 2 de estudo no município de Porto Feliz.

3.6. Rede de haplótipos

A rede de haplótipos gerada a partir do conjunto de dados estudado mostrou que os isolados amostrados se agruparam dentro de três haplótipos europeus (Figura 18) e nenhuma amostra apresentou identidade igual à de haplótipos americanos. Os haplótipos IS e IR foram os predominantes na população analisada, com 17 e 16 isolados estudados, respectivamente. O haplótipo IIR incluiu apenas o isolado I11 oriundo de Florestal-MG, o qual apresentou uma substituição de citosina (C) por timina (T) na posição 172, além da mutação G143A. Finalmente, dois isolados I5 e I32 do vinhedo de Pilar do Sul – A2 (BR) são representados por um haplótipo diferente dos já relatados, mostrando uma inserção de 6 pb no gene.

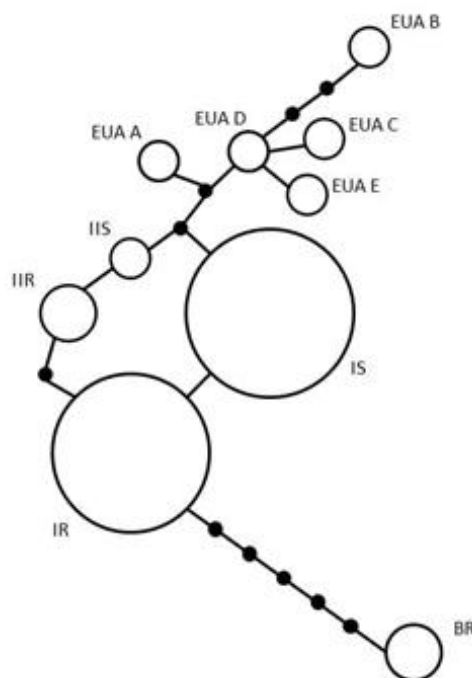


Figura 18. Rede haplótipos para o gene *cytB*, baseado em sequências de 548 pb de *Plasmopara viticola*. Cada círculo representa haplótipos distintos, e o tamanho corresponde ao número de isolados incluídos no haplótipo. Os pontos pretos indicam haplótipos hipotéticos não detectados no conjunto de dados. Haplótipo EUA A [isolado referência (nº GenBank acesso: DQ459459)], haplótipo EUA B [isolado referência (nº GenBank acesso: DQ459460)], haplótipo EUA C [isolado referência (nº GenBank acesso: DQ459461)], haplótipo EUA D [isolado referência (nº GenBank acesso: DQ459462)], haplótipo EUA E [isolado referência (nº GenBank acesso: DQ459463)], haplótipo IS [isolado referência (nº GenBank acesso: DQ459464), I6, I7, I8, I10, I12, I13, I15, I16, I17, I20, I23, I27, I28, I29, I30, I31 e I37], haplótipo IR [isolado referência (nº GenBank acesso: DQ459466), I1, I2, I3, I4, I9, I18, I19, I21, I22, I24, I25, I26, I33, I34, I35 e I36], haplótipo IIS [isolado referência (nº GenBank acesso: DQ459467)], haplótipo IIR [isolado referência (nº GenBank acesso: DQ459469) e I11] e haplótipo BR (I5 e I32).

4. DISCUSSÃO

Uma das formas mais efetivas para o controle de patógenos em plantas é o controle químico. O míldio da videira, é considerado um patógeno de alto risco para desenvolver resistência a fungicidas QoI (FRAC, 2017a). Desde os anos 2000 foi reportada a ocorrência de resistência aos QoI's em populações de *P. viticola* nos vinhedos franceses (MAGNIEN et al., 2003 apud CHEN et al., 2007) e desde então, ocorrências de isolados com sensibilidade reduzida em campo já foi relatada em várias regiões produtoras de uva como na França, na Suíça, na Áustria, na República Checa, na Alemanha, na Itália, em Portugal, na Eslovênia, na Índia, nos EUA e no Brasil (FRAC, 2016; MORAES, 2016; SAWANT; GHULE; SAWANT, 2016; BAUDOIN et al., 2008; GAUTHIER; AMSDEN, 2014). Conhecer se há ou não a presença de resistência nos vinhedos é importante, pois pode prevenir falhas no controle utilizando estratégias alternativas de manejo. Um estudo realizado por Chen et al. (2007) concluiu que isolados de *P. viticola* sensíveis aos fungicidas QoI apresentavam IC₅₀ (metade da concentração inibitória) e MIC (concentração mínima inibitória) de crescimento menor que 10 mg L⁻¹ de famoxadona, enquanto que os isolados resistentes apresentavam IC₅₀ maior que 100 mg L⁻¹, tendo muitos isolados com doses de MIC maiores que 1500 mg L⁻¹.

Neste presente trabalho em 12 dos 37 isolados de *P. viticola*, o fenótipo foi sensível e o genótipo mostrou resistência, possivelmente pelas suspensões de esporângios representarem populações do patógeno, haja vista que as suspensões para os testes *in vivo* não correspondiam a isolados individuais de uma única lesão e sim de todas as lesões de uma folha e para os testes moleculares utilizava-se apenas uma lesão individual. Desta forma, 32,4 % das amostras testadas foram detectadas a mutação G143A enquanto seu fenótipo representava sensibilidade. Sendo assim, é possível perceber que já existem populações resistentes em alguns locais, entretanto esta ainda não foi fixada. Brent, Hollomon e Shaw (1990) perceberam que seria necessário uma amostra com 3×10^8 pústulas de *Erysiphe*

graminis em um hectare de cafeeiro infectado para detectar com 95% de certeza um mutante com frequência 1×10^{-8} . Para a detecção simultânea dos alelos de resistência a fungicidas QoI e CAA em populações de *P. viticola*, Aoki, Hada e Suzuk (2013) assumiram como isolado de estudo apenas uma única lesão isolada do patógeno em folha com sintoma, pois uma única lesão isolada esperava-se um único genótipo de *P. viticola*.

Um estudo realizado por Baudoin et al. (2008) mostrou que 80% dos isolados coletados em vinhedos dos EUA, apresentaram resistência as estrobilurinas nos testes *in vivo*, comprovados posteriormente com análises moleculares. Entretanto, quando coletaram isolados de *Erysiphe necator*, patógeno causador de oídio, 91% das amostras apresentaram resistência à azoxistrobina nos testes *in vivo*, contudo, ao realizar análises moleculares em 4 isolados com fenótipo resistente, não encontraram a mutação G143A em um isolado testado.

Neste presente estudo, a estrutura da rede de haplótipos houve a correlação esperada com o local de mutação no sitio 143. Todos os isolados contidos no haplótipo IR e IIR apresentavam no códon 143 a trinca GCT, no qual é a mutação esperada nos isolados amostrados com genótipo resistente. Dos 36 isolados analisados, 91,7% das amostras correspondiam aos haplótipos do grupo I europeu (IS e IR), 2,8 % ao IIR e 5,5 % correspondiam a um haplótipo distinto dos demais e nenhuma amostra foi incluída nos haplótipos americanos. Na França, na população testada por Chen et al. (2007), aproximadamente 77 % correspondiam aos haplótipos do grupo I e 23 % aos do grupo II (IIS e IIR) e também nenhum haplótipo americano foi encontrado nas amostras analisadas.

Neste trabalho a falta de correlação entre o número médio de aplicações de fungicidas por safra e a frequência de isolados resistentes deve-se em parte, ao fato dos produtores não estarem aplicando fungicidas QoI nas últimas safras com a mesma intensidade do que no passado. Como a Área 1 de Porto Feliz produz uva há muitos anos, com pulverizações continuadas de fungicidas QoI, houve seleção da população resistente, a qual estabeleceu-se

no local. Já na Área 2, a ausência de isolados que apresentam as mutações, pode ser um indicativo de que essas populações resistentes ainda não se fixaram. Caso se intensifiquem as aplicações de estrobilurinas na Área 2, é possível que rapidamente apareça resistência.

Segundo o FRAC (2017b), quando se utiliza fungicidas do grupo QoI não se deve exceder 33% e 50% do número total de aplicações por safra, quando pulverizados isolados e associados com outros fungicidas com modo de ação diferente, respectivamente. Fungicidas do grupo CAA apresentam risco de resistência moderado, podendo ser aplicados no máximo em 50% das pulverizações no ciclo produtivo da videira, sempre em associação a fungicidas de diferentes mecanismos de ação (FRAC, 2017a).

Genet, Jaworska e Deparis (2006) observaram em laboratório que após transferências consecutivas de populações resistentes em plantas não expostas ao tratamento com fungicidas QoI, houve a recuperação da sensibilidade do patógeno, sugerindo que os fenótipos sensíveis nessas populações eram mais competitivos do que os resistentes. Resultados semelhantes foram observados por Toffolatti et al. (2011) quando notaram que a pausa na aplicação de QoI por no mínimo 2 anos, aumentou a sensibilidade, alcançando níveis similares aos vinhedos não pulverizados. Entretanto Corio-Costet et al. (2011) ao compararem a adaptabilidade de isolados de *P. viticola* sensíveis e resistentes a fungicidas QoI, observaram que os isolados resistentes tinham uma frequência de infecção maior do que os isolados sensíveis, mas não foi encontrada diferença significativa na capacidade de esporulação e período latente, sugerindo que em condições controladas não há custo de resistência a QoI.

Diminuir a frequência de aplicações de fungicidas QoI, realizar a mistura com fungicidas de diferentes grupos químicos ou suspender completamente as pulverizações desses produtos, diminui a pressão de seleção e pode contribuir para uma queda na frequência de resistência (GENET; JAWORSKA; DEPARIS, 2006; TOFFOLATTI et al., 2011).

Schnee et al. (2013) mostraram que é possível a utilização de extratos metanólicos e etanólicos brutos retirados de estacas de *Vitis vinífera* para controle de *P. viticola*, além de *Erysiphe necator*, e *Botrytis cinerea*. Caracterizaram seis moléculas que mostraram níveis variáveis de bioatividade contra o míldio da videira, sendo esta uma alternativa para desenvolver futuros produtos para aplicar nos vinhedos e praticar uma viticultura mais sustentável.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que a melhor metodologia para os testes de sensibilidade *in vivo* foi o método das folhas destacadas de ‘Niagara Rosada’.

Todas as vezes que os testes de sensibilidade mostravam resistência à piraclostrobina, houve confirmação na análise molecular. No entanto, em alguns isolados o fenótipo não correspondeu com o genótipo encontrado. A frequência de pulverizações no período da safra para o controle do míldio da videira foi muito variável, dependendo do nível tecnológico de cada vinhedo. Não houve correlação entre o número de aplicações de fungicidas com a frequência de isolados resistentes. Os 36 isolados amostrados agruparam-se dentro de três haplótipos europeus, 91,7% das amostras correspondiam aos haplótipos do grupo I europeu (IS e IR), 2,8 % ao IIR e 5,5 % correspondiam a um haplótipo distinto dos demais e nenhuma amostra foi incluída nos haplótipos americanos.

O manejo da resistência deve ser realizado nos vinhedos, elaborando estratégias para diminuir a exposição da população alvo ao fungicida QoI e realizar misturas, podendo ser possível recuperar a sensibilidade em vinhedos caracterizados resistentes.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT - SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. 2018. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 10 de mai. de 2018.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. Ouro Fino - MG: Agronômica Ceres, 2016. 810 p.
- AOKI, Y.; HADA, Y.; SUZUKI, S. Development of a multiplex allele-specific primer PCR assay for simultaneous detection of QoI and CAA fungicide resistance alleles in *Plasmopara viticola* populations. **Pest Management Science**, v. 69, p. 268–273, 2013.
- BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M.; PARR-DOBRZANSKI, B. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, p. 649–662, 2002.
- BAUDOIN, A.; OLAYA, G.; DELMOTTE, F.; COLCOL, J. F.; SIEROTZKI, H. QoI Resistance of *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator* in the Mid-Atlantic United States. **Plant Health Progress**, 2008.
- BRENT, K.J.; HOLLOMON, D.W.; SHAW, M.W. Predicting the Evolution of Fungicide Resistance. In: GREEN, M., *et al*, **Managing resistance to agrochemicals**. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 1990. Cap 21, p 303-319, 1990.
- CHEN, W. J.; DELMOTTE, F.; RICHARD-CERVERA, S.; DOUENCE, L.; GREIF, C.; CORIO-COSTET, M. F. At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 5162–5172, 2007.
- CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1657–1659, 2000.
- CORIO-COSTET, M. F.; DUFOUR, M. C.; CIGNA, J.; ABADIE, P.; CHEN, W. J. Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. **European Journal of Plant Pathology**, v. 129, p. 315–329, 2011.

COSTA, T. V. da; TARSITANO, M. A. A.; CONCEIÇÃO, M. A. F. Caracterização social e tecnológica da produção de uvas para mesa em pequenas propriedades rurais da região de Jales-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 2, p. 766–773, 2012.

ELLIS, M.A. 1994. **Integrated Pest Management (IPM) Disease Management Guidelines for Grapes in Ohio**. Plant Pathology Department Series 96. Wooster, Ohio.: Ohio Ag Res. & Dev. Center.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED. FAOSTAT. 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 24 fev. 2018.

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; PÉREZ-GARCÍA, A.; TORÉS, J. A.; DE VICENTE, A. The QoI Fungicides, the Rise and Fall of a Successful Class of Agricultural Fungicides. In: CARISSE, O. (ED) (Ed.). **Fungicides**. 1. ed. Shangai: InTech, 2010. p. 538.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE - FRAC. Mutations associated with QoI-resistance. Dez, 2006. Disponível em: < <http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-quick-references/mutations-associated-with-qo-resistance.pdf?sfvrsn=4>>. Acesso em: 27 fev. 2018.

_____. QoI working group of FRAC - Minutes of the meeting: All crops. Dez, 2016. Disponível em: <[http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-meeting-minutes/minutes-of-the-2016-qoi-meeting-recommendations-for-2017-\(telco-update-march-07-2017\).pdf?sfvrsn=1d834a9a_4](http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-meeting-minutes/minutes-of-the-2016-qoi-meeting-recommendations-for-2017-(telco-update-march-07-2017).pdf?sfvrsn=1d834a9a_4)>. Acesso em: 27 fev. 2018.

_____. QoI working group of FRAC - Minutes of the meeting. Dez, 2017b. Disponível em: <http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-meeting-minutes/minutes-of-the-2017-qoi-meeting-recommendations-for-2018.pdf?sfvrsn=2a144b9a_2>. Acesso em: 11 de abr. de 2018.

_____. Protocol of the discussions and recommendations of the CAA. Dez, 2017a. Disponível em: < http://www.frac.info/docs/default-source/caa-wg/minutes-of-the-2017-caa-meeting-recommendations-for-2018.pdf?sfvrsn=510e4b9a_2> Acesso em: 11 de abr. de 2018.

_____. FRAC Code List© * 2018: Fungicides sorted by mode of action. p. 1–10, 2018. Disponível em: <<http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2015-finalC2AD7AA36764.pdf?sfvrsn=4>>.

FREIRE, L. M. M.; FREIRE, J. M.; CALDART, V. Z. **Transformação na estrutura produtiva dos viticultores da Serra Gaúcha 1985-1991**. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPUV, 1992. 44 p. (EMBRAPA-CNPUV. Documentos, 7).

FURUYA, S.; MOCHIZUKI, M.; SAITO, S.; KOBAYASHI, H.; TAKAYANAGI, T.; SUZUKI, S. Monitoring of QoI fungicide resistance in *Plasmopara viticola* populations in Japan. **Pest Management Science**, v. 66, p. 1268–1272, 2010.

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

GAUTHIER, N. A. W.; AMSDEN, B. First Report of QoI-Resistant Downy Mildew (*Plasmopara viticola*) of Grape (*Vitis vinifera* cv. Vidal Blanc) in Kentucky. **Plant Disease**, v. 98, n. 2, p. 276–276, 2014.

GENET, J. L.; JAWORSKA, G.; DEPARIS, F. Effect of dose rate and mixtures of fungicides on selection for QoI resistance in populations of *Plasmopara viticola*. **Pest Management Science**, v. 62, p. 188–194, 2006.

GESLER, C.; PERTOT, I.; PERAZZOLLI, M. *Plasmopara viticola*: A review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 50, p. 3–44, 2011.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** , n. 41, p. 95–98, 1999.

HENNING, A.A. (ed) **Manual de Fitopatologia**. 3ª ed. Piracicaba: Editora Ceres LTDA, 1997. 705p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção agrícola municipal: Culturas temporárias e permanentes. Rio de Janeiro, Ministério do Planejamento, orçamento e gestão, v.39, p 84, 2012.

KUHN, G. B.; MAIA, J.D.G.; NAVES, R.L.; GARRIDO, L.R.; SÔNEGO, O.R. Cultivo da videira Niágara Rosada em regiões tropicais do Brasil. **Sistemas de Produção**, Bento Gonçalves, v. 5, n. 1. 2003.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA

polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 2009.

LO PICCOLO, S.; ALFONZO, A.; CONIGLIARO, G.; MOSCHETTI, G.; BURRUANO, S.; BARONE, A. A simple and rapid DNA extraction method from leaves of grapevine suitable for polymerase chain reaction analysis. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 45, p. 10305–10309, 2012.

MADDEN, L. V; ELLIS, M. A.; HUGHES, G.; WILSON, L. L. Evaluation of a Disease Warning System for Downy Mildew of Grapes. **Plant Disease**, v. 84, p. 549–554, 2000.

MAIA, J.D.G.; NAVES, R.L.; GARRIDO, L.R.; SÔNEGO, O.R.; KUHN, G.B. Cultivo da Videira Niágara Rosada em Regiões Tropicais do Brasil. **Sistemas de Produção**, Bento Gonçalves, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2003. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaNiagaraRosadaRegioesTropicais/doenca.htm>>. Acesso em: 26 fev. 2018.

MATASCI, C. L.; GOBBIN, D.; SCHÄRER, H.-J.; TAMM, L.; GESSLER, C. Selection for fungicide resistance throughout a growing season in populations of *Plasmopara viticola*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, n. 1, p. 79–83, 2008.

MELLO, L.M.R. **Desempenho da vitivinicultura brasileira em 2015**. EMBRAPA, 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9952204/artigo-desempenho-da-vitivinicultura-brasileira-em-2015>>. Acesso em: 24 fev. 2018.

MENDES, C. S. **Flutuação de inóculo no ar, desenvolvimento e validação de um sistema de previsão do míldio da videira**. 2002. 123 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2002.

MORAES, N. **Análise da variabilidade do gene *cytB* na região genômica associada a resistência aos fungicidas QoI em patógenos da uva Niágara Rosada (*Vitis labrusca*)**. 2016. 107p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

OLIVER, R.; HEWITT, H. G. **Fungicides in crop protection**. Wallingford: CABI, 2014.

PEARSON, R. C.; GOHEEN, A. C. **Compendium of Grape Diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1988.

PEZET, R.; GINDRO, K.; VIRET, O.; RICHTER, H. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. **Vitis**, v. 43, n. 2, p. 145–148, 2004.

RUSSELL, P. E. A century of fungicide evolution. **Journal of Agricultural Science**, v. 143, p. 11–25, 2005.

SAUTER, H.; STEGLICH, W.; ANKE, T. Strobilurins: Evolution of a New Class of Active Substances. **Angewandte Chemie-International**, v. 38, p. 1328-1349, 1999.

SAWANT, S. D.; GHULE, M. R.; SAWANT, I. S. First Report of QoI Resistance in *Plasmopara viticola* from Vineyards of Maharashtra, India. **Plant Disease**, v. 100, n. 1, p. 229, 2016.

SCHNEE, S.; QUEIROZ, E. F.; VOINESCO, F.; MARCOURT, L.; DUBUIS, P.-H.; WOLFENDER, J.-L.; GINDRO, K. *Vitis vinifera* Canes, a New Source of Antifungal Compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, and *Botrytis cinerea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 5459–5467, 2013.

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

TEMPLETON, A. R.; CRANDALL, K. A.; SING, C. F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, v. 132, n. 2, p. 619–633, 1992.

TOFFOLATTI, S. L.; PRANDATO, M.; SERRATI, L.; SIEROTZKI, H.; GISI, U.; VERCESI, A. Evolution of QoI resistance in *Plasmopara viticola* oospores. **European Journal of Plant Pathology**, v. 129, n. 2, p. 331–338, 2011.