



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa



Detecção molecular de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, agente causal da podridão branca, em alface (*Lactuca sativa* L.) pela reacção em cadeia da polimerase (PCR)

Cláudia Alexandra Oliveira Lopes Caldeira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientador: Professor Catedrático António José Saraiva de Almeida Monteiro

Co-orientadora: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

Júri:

Presidente: Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutor António José Saraiva de Almeida Monteiro, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Maria Helena Mendes da Costa Ferreira Correia de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Licenciada Maria Cecília Nunes Farinha Rego, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, na qualidade de especialista;

Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2010

Agradecimentos

À minha Família, particularmente ao meu marido e filhos, uma palavra especial de profundo reconhecimento pelo permanente estímulo, apoio, amizade e paciência prestados ao longo de todo este trabalho, e que foram imprescindíveis para a sua concretização.

À Doutora Mariana Gomes Mota a quem se deve a sugestão do tema estudado e a co-orientação deste trabalho, por toda a ajuda e disponibilidade prestadas, pela confiança e amizade com que sempre me distinguiu, o meu muito obrigado.

Ao Professor António Almeida Monteiro a quem se deve a orientação deste trabalho, tendo concedido todas as facilidades para a sua realização, quero expressar o meu reconhecimento.

À Engenheira Técnica Agrária Luísa Salvador a minha profunda gratidão pela colaboração prestada na sementeira e manutenção das alfices, e pela amizade e simpatia com que sempre me recebeu.

À Engenheira Cecília Rego expresso o meu sincero agradecimento pelas sugestões no estabelecimento de culturas puras dos patógenos, colaboração e apoio que desde sempre me concedeu.

Aos produtores e comerciantes que forneceram as alfices infectadas para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

À Professora Cristina Oliveira agradeço especialmente a amizade e carinho que me dedicou.

À D. Nidia agradeço a simpatia e amizade que desde sempre me concedeu.

À Doutora Carla Santos, da Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz, pela facilidade concedida na atribuição dos horários das Unidades Curriculares que lecciono naquela Cooperativa, que tornou possível a realização deste trabalho.

À Mestre Ana Maria Pintão, colega e amiga, por toda a amizade e apoio que sempre me dedicou, o meu especial apreço.

À Professora Catarina Bernardes, colega e amiga, por toda a amizade, estímulo e incentivo na realização deste trabalho, muito obrigado.

Ao Engenheiro Fernando Dias, da Empresa Cafés Nandi, S.A., por todas as facilidades e flexibilidade concedidas em termos de horário de trabalho que efectuo no Laboratório de Controlo de Qualidade, o meu muito obrigado.

Ao amigo Pedro Marques, por toda a amizade sempre despendida, muito obrigado.

A todos os colegas e amigos que efectuaram simultaneamente a sua Dissertação de Mestrado no Laboratório da Secção de Horticultura, por todo o apoio e amizade dedicada o meu agradecimento.

Resumo

Neste trabalho estabeleceu-se um teste molecular, rápido e fácil, para detectar *Sclerotinia sclerotiorum*, responsável pela doença da podridão branca da alface, em folhas assintomáticas.

Desenharam-se primers específicos (SSM) para ampliar sequências parciais da região ITS de *S. sclerotiorum*, e utilizaram-se em reacções de PCR com alfaces infectadas. A análise das sequências obtidas indicou homologia significativa com sequências de *S. sclerotiorum* já conhecidas. Usaram-se os primers SSM com alfaces infectadas com *Bremia lactucae* e *Botrytis cinerea* verificando-se que apenas ampliavam fragmentos nas amostras com *B. cinerea*. A sequenciação destes fragmentos sugeriu a presença de sequências parciais de *B. cinerea* e também de *Alternaria* sp., além de *S. sclerotiorum*. Os fragmentos de *S. sclerotiorum* e *Alternaria* sp., com tamanho semelhante, poderão distinguir-se pela digestão dos produtos de PCR com *Rsa*I. Alguns isolados de *B. cinerea* poderão ser discriminados com *Hind*III, mas não todos, já que outros apresentam sequências idênticas às identificadas em *S. sclerotiorum*. Estabeleceu-se uma reacção de PCR multiplex conjugando os primers SSM com os primers Br, específicos para ampliar sequências parciais da região ITS de *B. lactucae*, para detectar simultaneamente os patogénios referidos. A posterior digestão enzimática com *Rsa*I e *Hind*III permite discriminar alguns daqueles patogénios.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Bremia lactucae*, *Lactuca sativa*, alface, PCR, ITS

Abstract

This work established a molecular test, quick and easy to detect *Sclerotinia sclerotiorum*, responsible for white rot disease of lettuce, in asymptomatic leaves.

Specific primers (SSM) were designed to amplify partial sequences of ITS region of *S. sclerotiorum*, and were used in PCR reactions with infected lettuce. The analysis of the sequences obtained showed a significant homology with known sequences of *S. sclerotiorum*. These primers were also used with lettuce infected with *Bremia lactucae* and *Botrytis cinerea*, and only amplified fragments in *B. cinerea* samples. Resulting sequences suggested the presence of *B. cinerea* and also *Alternaria* sp., besides *S. sclerotiorum*. The fragments of *S. sclerotiorum* and *Alternaria* sp. with similar size may be discriminated through digestion of PCR products with *RsaI*. Some isolates of *B. cinerea* may be discriminated with *HindIII* digestion of the PCR product, but not all, as some *B. cinerea* isolates show in this region sequences identical to those identified in *S. sclerotiorum*.

A multiplex PCR reaction was settled combining SSM primers with primers Br, specific to amplify partial sequences of the ITS region of *B. lactucae*, to detect simultaneously those pathogens. The subsequent enzymatic digestion with *RsaI* and *HindIII* allows discrimination of some of those pathogens.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Bremia lactucae*, *Lactuca sativa*, lettuce, PCR, ITS

Title: “Molecular detection of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, causal agent of white rot, in lettuce (*Lactuca sativa* L.) by polymerase chain reaction (PCR).”

Extended abstract

The traditional classification of fungi is based on the variation of a relatively small number of morphological and physiological characteristics. This method, although essential and sometimes sufficient, has proved in many cases insufficient (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

Additional methods of diagnosis have been developed in an attempt to counter the slow traditional methods and taxonomic knowledge they require, such as Koch's postulates for the detection and diagnosis of pathogens responsible for plant diseases. Traditional methods of identification and detection of fungi are time consuming, and require the analysis of different parameters of growth and development. In recent years molecular techniques have been widely used to detect or identify numerous pathogens (Henson & French, 1993). Methods based on polymerase chain reaction (PCR) are a promising alternative to traditional methods because of the high sensitivity, specificity, reproducibility, potential as a rapid method for phytosanitary control, and they can accurately quantifying infection caused by the fungus (Tomaz, 2001).

The disease control in lettuce is one of the major difficulties faced by farmers (Ryder, 1999). The constant monitoring of fungal contamination is therefore essential to ensure the quality of vegetables, to reduce economic losses. This study developed a research on the pathogen responsible for white rot of lettuce, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, which cause large damage in this horticultural culture leading to total loss of the infected plants in field and post harvest. Due to the expected high growth of the minimally processed product sector, where salads (lettuce) are the main product, the concern with this pathogen is increasing, as the white rot became a main problem in intensive culture systems that supply this sector (Gilardi *et al.*, 2006). As a result, there is a need to detect the contamination of lettuce with that pathogen before symptoms occur to prevent that asymptomatic, but already contaminated, lettuce are packed and sent to market. The moist conditions created in the packaging favour the development of the disease, which restrains the marketing of lettuce.

The development of techniques such as DNA sequencing, and particularly the analysis of nucleotide sequences of ribosomal RNA genes, has contributed greatly to the taxonomy and systematic of fungi (Seifert *et al.*, 1995). The DNA coding for ribosomal RNA (rRNA) is the most commonly used to design specific primers for the detection of microorganisms (Henson & French, 1993), especially fungi (Berbee & Taylor, 2001), and seems to be among the most highly conserved sequences, allowing the study of phylogenetic relationships at various taxonomic levels (Kurtzman, 1985; Hwang & Kim,

1999). It can be used to amplify each of these regions or all regions ITS1 and ITS2 (Internal Transcribed Spacers) (White *et al.*, 1990), comprised both ITS spacers and the 5,8S gene (Duncan *et al.*, 1998; Jacobs & Rehner, 1998). Amplification of ITS region allows the distinction of groups of organisms based on size polymorphisms, and this analysis can be even more discriminating with the restriction of the ITS fragments with endonucleases, designated ARDRA technique (Buscot *et al.*, 1996).

This work had as main objectives the identification of a specific sequence of DNA from the pathogen *S. sclerotiorum*, easily amplifiable by PCR reaction, and the development of a rapid, specific, easily reproducible and inexpensive test, for early detection of asymptomatic infection of lettuce with *S. sclerotiorum*. The distinction of some of the pathogens of lettuce by enzymatic digestion of products amplified by PCR, using restriction enzymes, and the development of a multiplex PCR reaction that allows the simultaneous detection of some of the pathogens that infect lettuce, were also goals of this work.

In this study it was established a molecular test, quick and easy, to detect the presence of *S. sclerotiorum* in asymptomatic leaves of lettuce. In the absence of convenient specific primers for *S. sclerotiorum*, were used the sequences available in GenBank database to design primers that detect a specific DNA sequence of this pathogen in lettuce. The pair of primers SSM was designed to amplify ITS region of *S. sclerotiorum*, and was used in PCR reactions with DNA extracted from contaminated lettuce, detecting the pathogen in asymptomatic lettuce. The amplified products revealed high homology with sequences of *S. sclerotiorum* stored in databases. These primers were also used with lettuce infected with *Bremia lactucae* and *Botrytis cinerea*, and only amplified fragments in *B. cinerea* samples. Sequencing of the amplified fragments also suggested the amplification of partial sequences of *B. cinerea* and *Alternaria* sp., besides *S. sclerotiorum*. It is unlikely that SSM primers pair amplifies DNA sequences of *B. lactucae* because, in all PCR reactions with these primers and samples contaminated with this pathogen, this never occurred.

A pair of primers (Br) that hybridises in the ITS region of *B. lactucae*, causal agent of downy mildew disease, was used to amplify a *B. lactucae* specific sequence.

A multiplex PCR reaction was established combining the primers SSM and Br with primers that amplifies 18S region of lettuce, monitoring the quality of extracted DNA, to detect simultaneously the presence of *S. sclerotiorum*, *B. lactucae*, *B. cinerea* and *Alternaria* sp.. The products of multiplex reaction can be digested with the restriction enzymes *RsaI* and *HindIII* to discriminate some of those pathogens.

Enzymatic digestion of products amplified by PCR reaction with *RsaI* allows discrimination between *S. sclerotiorum* and *Alternaria* sp., with significant differences in electrophoretic profiles, but with *HindIII* the distinction between *S. sclerotiorum* and *B. cinerea* only is possible for some isolates, because others have sequences that are partially identical to those identified in *S. sclerotiorum*.

The low genetic variability found in this study was due to the reduced number of available isolates of *S. sclerotiorum*, *B. lactucae*, *B. cinerea* and *Alternaria* sp.. It is necessary to have a representative sample of variability within this pathogens species to choose other restriction enzymes that can distinguish between the different isolates, or use other different genes than the ribosomal genes.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Bremia lactucae*, *Lactuca sativa*, lettuce, PCR, ITS

	Páginas
Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	iv
Extended abstract	v
Índice	viii
Lista de quadros	x
Lista de figuras	xi
Lista de abreviaturas	xiii
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1. A alface	3
2.1.1. Origem e importância económica	3
2.1.2. Doenças	3
2.2. A doença da esclerotinia de alface	5
2.2.1. Agente causal	5
2.2.1.1. Características morfológicas e culturais	5
2.2.1.2. Hospedeiros	7
2.2.2. Ciclo da doença	7
2.2.3. Sintomas	10
2.2.4. Meios de luta	13
2.3. Métodos de diagnóstico	14
3. Material e Métodos	23
3.1. Obtenção de inóculos de <i>S. sclerotiorum</i>, <i>B. cinerea</i> e <i>B. lactucae</i>	23
3.1.1. Obtenção de material infectado proveniente de campos de alface	23
3.1.2. Multiplicação de inóculos	24
3.2. Ensaios de inoculação artificial com os diferentes agentes patogénicos	26
3.2.1. Obtenção de material vegetal	26
3.2.2. Inoculação de material vegetal	27
3.2.3. Colheita de material vegetal das plantas artificialmente inoculadas	29
3.2.4. Reisolamento do agente causal da podridão branca da alface	29
3.3. Germinação carpogénica de <i>S. sclerotiorum</i>	30
3.4. Identificação molecular de <i>S. sclerotiorum</i>, <i>B. cinerea</i> e <i>B. lactucae</i>, em alfaces contaminadas, por reacção em cadeia da polimerase (PCR)	30
3.4.1. Extração de DNA total	30
3.4.2. Quantificação de DNA extraído	30

3.4.3. Reacções de ampliação por PCR	31
3.4.4. Observação de produtos de PCR	32
3.4.5. Clonagem de produtos de PCR e transformação	33
3.4.6. Crivagem de colónias recombinantes	33
3.4.7. Sequenciação	34
3.4.8. Análise de sequências	34
3.4.9. Digestão com endonucleases de restrição	34
4. Resultados	36
4.1. Estabelecimento de infecções artificiais de alface com <i>S. sclerotiorum</i> , <i>B. cinerea</i> e <i>B. lactucae</i>	36
4.1.1. <i>S. sclerotiorum</i> como agente causal da podridão branca	36
4.1.2. Inoculações artificiais de alface com <i>B. cinerea</i> e <i>B. lactucae</i>	37
4.2. Identificação das regiões ITS de <i>S. sclerotiorum</i>	38
4.3. Identificação das regiões ITS de <i>S. minor</i>	40
4.4. Limiar de detecção de <i>S. sclerotiorum</i>	40
4.5. Digestão enzimática de produtos de ampliação	41
4.6. Reacções de PCR multiplex	47
5. Discussão dos resultados	50
6. Conclusões	57
Referências bibliográficas	59
Anexos	68

Lista de quadros

Quadro 1 – Amostras de alface infectadas com *S. sclerotiorum* utilizadas no presente trabalho.

Quadro 2 – Amostras de alface infectadas com *B. cinerea* e *B. lactucae* utilizadas no presente trabalho.

Quadro 3 – Primers utilizados para identificação diferencial das sequências de *S. sclerotiorum*, *S. minor*, *B. lactucae* e alface.

Quadro 4 – Primers do vector pCRII.

Quadro 5 – Primers utilizados, dimensão, homologia ao nível nucleotídico e probabilidade Blast dos fragmentos obtidos nas amostras SSM1, SSM2, Br2, Br3 e Bo1.

Quadro 6 – Dimensão dos fragmentos obtidos após digestão enzimática de produtos de PCR com as enzimas de restrição RsaI e HindIII, das regiões ITS sequenciadas de *S. sclerotiorum*, *B. lactucae*, *B. cinerea* e *Alternaria* sp..

Quadro 7 – Distinção dos agentes patogénicos presentes nas várias amostras através da digestão enzimática dos produtos de PCR, ampliados com os primers SSM, com as enzimas RsaI e HindIII.

Lista de figuras

Figura 1 – Apotecas germinadas carpogenicamente a partir de esclerotos de *S. sclerotiorum*.

Figura 2 – Micélio com produção de esclerotos de *S. sclerotiorum* em meio de cultura PDA a) em círculos concêntricos; b) em padrões irregulares.

Figura 3 – Ciclo da doença causada por *S. sclerotiorum* (Adaptado de Rollins, 2007).

Figura 4 – Aparência geral de alfaces contaminadas com *S. sclerotiorum* a) no campo (<http://www.usask.ca/agriculture/plantsci/vegetable/vegetable/vpestmgmt.htm>, acesso em 12-11-2009); b) em laboratório.

Figura 5 – Podridão húmida no colo da planta (alface) com desenvolvimento de micélio branco de *S. sclerotiorum*.

Figura 6 – Formação de esclerotos na superfície do micélio de *S. sclerotiorum* em alface.

Figura 7 – Ampliação de uma sequência específica de DNA através da técnica de PCR (Chawla, 2000; Videira, 2001).

Figura 8 – Unidade génica do rRNA (Adaptado de Hwang e Kim, 1999).

Figura 9 – Cultura de *B. cinerea* em placas de Petri com meio PDA.

Figura 10 – Sementeira de alfaces num tabuleiro alveolado de plástico rígido.

Figura 11 – Transplantação de alfaces para vasos de plástico rígido.

Figura 12 – Ilustração de alfaces inoculadas com *B. cinerea* ou *B. lactucae*.

Figura 13 – Germinação carpogénica de esclerotos de *S. sclerotiorum*.

Figura 14 – Alfaces com sintomas de *S. sclerotiorum*, apresentando murchidão nas folhas basais.

Figura 15 – Alfaces com sintomas e sinais de *S. sclerotiorum*, apresentando podridão húmida e micélio branco no colo da planta.

Figura 16 – Alfaces com sintomas e sinais de *B. cinerea*, apresentando murchidão e esporulação cinzenta nas folhas.

Figura 17 – Alfaces com sintomas e sinais de *B. lactucae*, apresentando manchas amarelas e esporulação branca na página superior das folhas.

Figura 18 – Limiar de detecção de *S. sclerotiorum* em alfaces contaminadas: reacção de PCR com os primers 18S utilizando 4 ng (a), 0,08 ng (b), 0,004 ng (c), 0,02 ng (d, e), 0,0025 ng (f) e 0,00125 ng (g) de DNA, e com os primers SSM utilizando as mesmas quantidades de DNA (i, j, l, m, n, o, p), comparando com 500 ng de marcador 100 bp DNA Ladder (h).

Figura 19 – Digestão enzimática do produto de PCR das amostras SSM2(F) e Br3(F), ampliado com os primers SSM, utilizando a enzima de restrição RsaI (b, c), e do produto de PCR das amostras SSM2(F) e Bo1(F), ampliado com os primers SSM, utilizando a enzima de restrição HindIII (d, e), comparando com o produto de PCR das amostras SSM2(F), Br3(F) e Bo1(F) não digerido (f, g, h), e com 500 ng de marcador 100 bp DNA Ladder (a, i).

Figura 20 – Digestão enzimática com RsaI de produtos de PCR ampliados com os primers SSM de *S. sclerotiorum* (a, b), *B. cinerea* (c, d, e) e *Alternaria* sp. (f, g), e com HindIII de produtos de PCR ampliados com os primers SSM de *S. sclerotiorum* (i, j), *B. cinerea* (l, m, n) e *Alternaria* sp. (o, p), comparando com os produtos de PCR não digeridos (q, r, s, t, u, v, x) e com 500 ng de marcador 100 bp DNA Ladder (h).

Figura 21 – Digestão enzimática do DNA plasmídico de colónias transformadas em *E. coli* das amostras SSM2(F) ampliado com os primers SSM, com RsaI (a, b, c, d, e, f) e HindIII (o, p, q, r, s, t), e de Br3(F) com os primers Br, com RsaI (g, h, i, j, l, m) e HindIII (u, v, x), comparando com 500 ng de marcador 100 bp DNA Ladder (n).

Figura 22 – Reacção de PCR multiplex com mistura de DNA das amostras SSM2(F), Br3(F) e Bo1(F), com os primers SSM e Br em simultâneo (b), os primers SSM (c) e os primers Br (d), comparando com 500 ng de marcador 100 bp DNA Ladder (a).

Figura 23 – Digestão enzimática dos produtos de PCR multiplex, obtidos com mistura de DNA das amostras SSM2(F), Br3(F), Bo1(F) e Br2(F), e com os primers SSM e Br em simultâneo, utilizando as enzimas de restrição RsaI (c) e HindIII (d), comparando com os produtos de PCR das amostras não digeridos (b) e com 500 ng de marcador 100 bp DNA Ladder (a).

Lista de abreviaturas

A230 – Absorvância medida a 230 nm

A260 – Absorvância medida a 260 nm

A280 – Absorvância medida a 280 nm

a.C. – Antes de Cristo

A – Adenina

Amp^r – Gene de resistência à ampicilina

AO – Absorvância óptica do DNA

ARDRA – Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (Análise de Restrição de DNA Ribossomal Ampliado)

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

bp – Base pairs (Pares de bases)

C – Citosina

CE – Comunidade Europeia

CI – Clorofórmio : álcool isoamílico

CTAB – Brometo de cetiltrimetil de amônio

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)

dNTPs – Deoxynucleoside triphosphates (Nucleótidos)

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EMBL-EBI – European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute

EtBr – Brometo de etídio

ETS – External Transcribed Spacers (Espaceadores Transcritos Externos)

FAO – Food and Agricultural Organization

FDI – Factor de diluição

fwd – Forward

G – Guanina

IGS – Intergenic Spacers (Espaceadores Intergénicos)

INE – Instituto Nacional de Estatística

ITS – Internal Transcribed Spacers (Espaceadores Transcritos Internos)

Kan^r – Gene de resistência à canamicina

kb – Kilo base pairs (Quilobases)

LB – Luria Bertoni

LSU – Large Subunit (Grande subunidade ribossomal)

MSP-PCR – Microsatellite-Primed PCR (Polimorfismos de ampliação de microsatélites)

mtDNA – Mitochondrial DNA (DNA mitocondrial)

NCBI – National Center for Biotechnology Information

nt – Nucleótidos

NTS – Non-Transcribed Spacers (Espaçadores Não-Transcritos)

OD – Absorvância ou densidade óptica medida a 260 nm

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reacção em cadeia da polimerase)

PDA – Potato-Dextrose Agar (Agar de batata dextrosada)

PDB – Potato-Dextrose Broth (Caldo de batata dextrosada)

PVP – Polivinilpirrolidona

RAPDs – Random Amplified Polymorphic DNA (DNA polimórfico aleatoriamente amplificado)

rDNA – Ribosomal DNA (DNA ribossomal)

rev – Reverse

RFLPs – Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição do DNA genómico)

RNA – Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico)

rpm – Rotações por minuto

rRNA – Ribosomal RNA (RNA ribossomal)

RT-PCR – Real-Time PCR (PCR em tempo real)

SDS – Sodium Dodecyl Sulphate (dodecil sulfato de sódio)

SDS-PAGE – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis with Sodium Dodecyl Sulphate (Electroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio)

SSU – Small Subunit (Pequena subunidade ribossomal)

T – Timina

TAE – Tris acetato EDTA

Taq – *Thermus aquaticus*

TE – Tris EDTA

Tm – Temperatura de desnaturação

Tris – Hidroximetilaminometano

U – Unidade enzimática

UK – United Kingdom

1. Introdução

Na cultura da alface, o controlo de doenças é uma das maiores dificuldades enfrentadas pelos produtores. Os sintomas de doença podem não ser visíveis cedo, a doença pode desenvolver-se repentinamente dificultando o tratamento e pode não haver um tratamento adequado para assegurar um controlo suficiente e economicamente vantajoso (Ryder, 1999). A monitorização constante da infecção fúngica torna-se, assim, imprescindível para assegurar a qualidade dos produtos hortícolas, de modo a reduzir as perdas económicas.

Os métodos clássicos de identificação e detecção de fungos, como o cultivo em diversos meios de cultura e o exame microscópico, consomem muito tempo, e exigem a análise de diferentes parâmetros de crescimento e desenvolvimento. Os métodos baseados na reacção em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) constituem uma alternativa promissora aos métodos clássicos devido à elevada sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e potencial como método rápido de controlo de qualidade (Tomaz, 2001).

De entre os vários agentes patogénicos que atacam a alface um dos mais importantes é o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, adiante referido por *S. sclerotiorum*, que se encontra distribuído por todo o mundo infectando mais de 400 espécies de plantas (Boland e Hall, 1994), na maior parte dos casos, hortaliças (Viegas, 2000).

S. sclerotiorum é o agente causal da podridão branca da alface causando elevados prejuízos devido à perda total das plantas atacadas (Viegas, 2000).

Os prejuízos graves nas culturas, a falta de elevados níveis de resistência dos hospedeiros e a dificuldade geral de controlar este patogénio (Bolton *et al.*, 2006), fazem dele um importante agente patogénico que é necessário evitar. Por este facto, existe uma necessidade premente de detectar a infecção das alfaces com *S. sclerotiorum* antes de surgirem os sintomas, não só como uma forma preventiva para se poder actuar na cultura, mas também para evitar que alfaces já infectadas, mas sem sintomas e sinais aparentes, sejam enviadas directamente para o mercado. Nas alfaces processadas industrialmente as condições de humidade criadas no interior da embalagem favorecem o desenvolvimento e manifestação da doença, inviabilizando a posterior comercialização das alfaces.

O presente trabalho tem como objectivo identificar uma sequência específica de DNA de *S. sclerotiorum* facilmente ampliável por PCR, e o desenvolvimento de um teste rápido, de fácil execução, específico, reprodutível e barato, para avaliar precocemente se alfaces sem sintomas estão infectadas com este patogénio. Tentou-se também que o teste despiste a presença de outros agentes patogénicos.

No presente trabalho apresenta-se uma breve revisão bibliográfica sobre o fungo *S. sclerotiorum* e a sua importância económica na cultura da alface, e os métodos até agora desenvolvidos para detecção atempada deste e outros patogénios. De seguida relatam-se os ensaios realizados com o objectivo de detectar *S. sclerotiorum* em alfaces contaminadas com este e outros agentes patogénicos, visando uma detecção diferenciada dos mesmos. Descrevem-se os ensaios efectuados no sentido de averiguar o limiar de detecção de *S. sclerotiorum* em alfaces contaminadas, mas assintomáticas, com ausência de sintomas e esporulação.

2. Revisão bibliográfica

2.1. A alface

2.1.1. Origem e importância económica

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertence à família *Asteraceae*, sinónimo de *Compositae*, e é uma das principais culturas hortícolas pertencentes a esta família (Almeida, 2006).

É originária do Próximo Oriente e do Mediterrâneo, e possivelmente descendente da espécie silvestre *Lactuca serriola* L., sendo uma cultura de domesticação antiga, datando o seu cultivo desde 2500 a.C. (Almeida, 2006).

Existem várias variedades de alface cultivadas, principalmente para consumo humano, pelas suas folhas suculentas que normalmente são consumidas cruas, em saladas. É a hortaliça de folhas mais utilizada em saladas em todo o Mundo (Almeida, 2006; Raid, 2004).

A produção de alface em larga escala ocorre somente nas zonas temperadas do Hemisfério Norte devido às exigências climáticas desta cultura. Os grandes produtores mundiais são a China, os Estados Unidos da América, essencialmente na Califórnia (Almeida, 2006), e a Espanha. Surgem também a Itália, Índia, Japão, França e Turquia, como importantes países produtores de alface, segundo as estatísticas mais recentes da FAO (Food Agricultural Organization) de 2007 (<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, acesso em 25-11-2009).

Em Portugal, a alface é cultivada um pouco por todo o país, quer em estufa quer ao ar livre, concentrando-se as maiores áreas de cultivo junto dos grandes centros populacionais do litoral (Oeste, Entre-Douro-e-Minho e Beira Litoral) (Almeida, 2006). A produção de alface nos últimos anos em Portugal atingiu cerca de 100 000 t, segundo as estatísticas mais recentes da FAO de 2007 (<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, acesso em 25-11-2009), demonstrando a sua crescente importância económica e agronómica. É uma hortícola de grande valor e extremamente popular na alimentação portuguesa (Ripado, 1993).

2.1.2. Doenças

A alface pode ser afectada por cerca de 75 doenças em que as principais, excluindo bacterianas e viroses, são a podridão branca (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Sclerotinia minor* Jagger), a rizoctónia (*Rhizoctonia solani* Kühn) e o míldio (*Bremia lactucae* Regel), destacando-se ainda a podridão cinzenta (*Botrytis cinerea* Pers.: ex Fr.), a alternariose (*Alternaria porri* (Ellis) Cif.), o oídio

(*Erysiphe cichoracearum* DC.), a fusariose (*Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. emend. W.C. Snyder & H.N. Hans. f. sp. *lactucum* forma specialis nov.), a antracnose (*Microdochium panattonianum* (Berl.) Sutton *et al.*), a murchidão das plantas (*Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn), a septoriose (*Septoria lactucae* Pass.), a estenfiliose (*Stemphylium botryosum* Wallr. f. sp. *lactucum* Padhi and Snyder) e a verticiliose (*Verticillium dahliae* Kleb.) (Almeida, 2006).

A espécie *S. sclerotiorum* é um agente patogénico de plantas, economicamente importante, e que afecta uma grande variedade de hospedeiros. Um factor determinante para o sucesso da sua patogenicidade é a capacidade de formar esclerotos, estruturas de repouso resistentes a condições adversas, capazes de sobreviver anos no solo (Dickman, 2007).

A podridão branca, provocada pelo agente patogénico *S. sclerotiorum*, tem surgido em muitos locais de produção de alface, sendo provavelmente um problema a nível mundial. A incidência e severidade com que esta doença se manifesta originam elevados prejuízos na cultura (Viegas, 2000). Este patogénio do solo ataca as alfaces ao nível do colo, causando o ataque em plântulas o seu rápido colapso. Os prejuízos mais frequentes ocorrem na fase comercial da cultura sendo o primeiro sintoma, após a invasão do patogénio, a murchidão das folhas basais normalmente começando de um dos lados da planta. Surge uma podridão junto ao colo da planta, com micélio esbranquiçado e com pequenas estruturas negras (esclerotos). As folhas exteriores da alface amarelecem e murcham, e a podridão estende-se a toda a planta que acaba por morrer (Thicoïpé, 1997; Ryder, 1999).

Em Portugal o fungo *S. sclerotiorum* foi isolado pela primeira vez naquele hospedeiro em 1984 (Lucas e Lopes, 1987). No entanto, também foi detectado noutras culturas, como a soja (Dias e Lucas, 1978), craveiro (Lucas e Lopes, 1980), cenoura, feijão verde, tomateiro e meloeiro (Inácio, 1997).

Outras doenças de relevo da alface são o míldio e a podridão cinzenta. O míldio é uma das doenças mais importantes e estudadas em alface. É provocada pelo agente patogénico *Bremia lactucae* Regel, podendo surgir nas várias regiões em que a alface é cultivada, e pode ser particularmente problemática em ambientes frios e húmidos. Surgem manchas amarelas na página superior das folhas que podem coalescer, tornar-se castanhas, podendo destruir parte ou a totalidade da folha onde surgem (Ryder, 1999). Na página inferior das folhas, nas zonas correspondentes às lesões na face superior, surge um micélio branco. Nas plântulas, se o ataque for muito intenso, a esporulação pode surgir nas duas faces das folhas. Provoca ataques frequentemente graves que podem comprometer a colheita (Thicoïpé, 1997).

A podridão cinzenta, provocada pelo patogénio *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., pode infectar as plântulas e alfaces adultas, podendo atacar igualmente ao nível do colo levando a estragos irreparáveis nas plantas. No entanto, surge frequentemente como um grave problema na pós-colheita. Nas zonas

infectadas desenvolve-se uma podridão e, sobre esta, surge um micélio cinzento (Thicoïpé, 1997; Ryder, 1999).

Além dos métodos culturais não existem métodos eficazes para combater os patogénios *Sclerotinia* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn, *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. emend. W.C. Snyder & H.N. Hans. f. sp. *lactucum* forma specialis nov., *Pythium* spp. e *Verticillium dahliae* Kleb. durante o decorrer da cultura (Miranda *et al.*, 2004). Assim, torna-se de primordial importância a prevenção e detecção do aparecimento destas doenças.

2.2. A doença da esclerotinia de alface

2.2.1. Agente causal

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é um patogénio que causa a doença designada por podridão branca (Purdy, 1979; Boland e Hall, 1994).

É um agente patogénico do solo que ataca as plantas ao nível do colo. Pode afectar e destruir as plântulas, embora os ataques mais frequentes ocorram no momento da maturação da planta (Thicoïpé, 1997).

A classificação taxonómica do fungo é: Domínio *Eukaryota*. Reino *Fungi*. Divisão *Ascomycota*. Classe *Leotiomycetes*. Ordem *Helotiales*. Família *Sclerotiniaceae*. Género *Sclerotinia*. Espécie *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Andrew e Kohn, 2009).

Kohn (1979) desenvolveu chaves dicotómicas, umas com base no crescimento do micélio e esclerotos em cultura, e outras baseadas na formação de apotecas e dos ascósporos, que podem ser utilizadas nos métodos clássicos para identificar as espécies de *Sclerotinia*.

2.2.1.1. Características morfológicas e culturais

O patogénio *S. sclerotiorum* apresenta como forma vegetativa um micélio branco, hialino, septado, ramificado e multinucleado (Bolton *et al.*, 2006). Sobre o micélio formam-se umas estruturas negras, duras e de forma muito variável designadas por esclerotos (Figura 1).

Dependendo das condições ambientais de temperatura, humidade e luminosidade, os esclerotos germinam produzindo micélio (estado assexuado), ou originam apotecas em forma de trompete (Figura 1), com produção de ascos contendo ascósporos (estado sexuado) (Bardin e Huang, 2001). Os esclerotos são formados por filamentos de micélio entrelaçados e funcionam como órgãos de

resistência (Abawi e Grogan, 1979; Messiaen *et al.*, 1991; Ryder, 1999), podendo permanecer viáveis por mais de oito a dez anos (Ben-Yephet *et al.*, 1993) sob condições desfavoráveis de crescimento (Bolton *et al.*, 2006).

O escleroto é uma estrutura plectenquimatosa, de forma ovóide, esférica ou em crescente, com prosênquima na parte interna e pseudoparênquima na parte externa, que acaba por se soltar do micélio ficando livre. Quando as condições se tornam favoráveis, origina os órgãos de frutificação sexuada ou produz simplesmente o micélio que, depois, vai formar frutificações assexuadas (Tomaz, 2001).

As apotecas, geralmente castanhas e com estipes longas, são ascocarpos em forma de taça (2 a 10 mm de diâmetro) apresentando cavidades mais ou menos fechadas onde se formam os ascos, no interior dos quais se formam, por sua vez, os ascósporos.

Os ascósporos são esporos sexuados endógenos, geralmente hialinos, unicelulares, ovais ou pouco alongados e achatados, formados no interior das hifas em forma de saco ou clave denominadas ascos (Tomaz, 2001).



Figura 1 – Apotecas germinadas carpogenicamente a partir de esclerotos de *S. sclerotiorum*.

Quando ascósporos, micélio ou esclerotos, são colocados num meio nutritivo sólido, as hifas desenvolvem-se formando uma camada fina de micélio à superfície do meio. Quando a colônia atinge a borda da placa de Petri ou quando o crescimento começa a ficar condicionado, o micélio torna-se espesso e produz esclerotos cobertos com pequenas gotas de líquido. Quando o escleroto aumenta de tamanho, a sua superfície começa a escurecer e grandes gotas de exsudado surgem. A superfície do escleroto continua a escurecer até ficar preta, e as gotas de exsudado desaparecem. Dentro de cerca de

uma semana o processo está completo e um escleroto maduro pode ser retirado do substrato. Muitas vezes os esclerotos formam-se na bordadura da placa de Petri, mas outras vezes cobrem o substrato numa série de círculos concêntricos (Figura 2a) ou em padrões irregulares (Figura 2b).



2a)



2b)

Figura 2 – Micélio com produção de esclerotos de *S. sclerotiorum* em meio de cultura PDA a) em círculos concêntricos; b) em padrões irregulares.

2.2.1.2. Hospedeiros

O fungo *S. sclerotiorum* infecta mais de 400 espécies vegetais, desde plantas agrícolas, ornamentais e infestantes (Purdy, 1979; Boland e Hall, 1994).

Relatos prévios indicam que a alface é um hospedeiro de *S. sclerotiorum* (Boland e Hall, 1994) e de *Sclerotinia minor* Jagger, referindo-se adiante por *S. minor* (Melzer *et al.*, 1997).

2.2.2. Ciclo da doença

Cerca de 90 % do ciclo de vida de *S. sclerotiorum* (Figura 3) é passado na forma de esclerotos, que podem sobreviver oito a dez anos (Ben-Yephet *et al.*, 1993). Em algumas alturas do ano, dependendo da natureza inerente do patogénio e de vários factores ambientais, o escleroto pode germinar miceliogenicamente ou carpogenicamente (Adams e Ayers, 1979), infectando plantas hospedeiras pela produção de micélio ou pela produção de ascósporos, em apotecas, que infectam a planta (Abawi e Grogan, 1979; Clarkson *et al.*, 2004). A infecção com *S. sclerotiorum* pode, assim, ser iniciada com dois tipos de inóculo, micélio ou ascósporos (Lumsden, 1979). Os esclerotos que germinam miceliogenicamente, no solo, produzem hifas que podem infectar os tecidos hospedeiros (Adams e Ayers, 1979; Le Tourneau, 1979; Bardin e Huang, 2001), conduzindo a infecções ao nível do colo das plantas e das folhas basais (Messiaen *et al.*, 1991; Ryder, 1999). Este tipo de germinação é condicionado por factores ambientais, principalmente pela humidade (Huang *et al.*, 1998).

Os esclerotos que germinam carpogenicamente produzem apotecas e subsequentemente ascósporos que, depois de libertados, são disseminados pelo vento e infectam os órgãos aéreos dos hospedeiros susceptíveis que se encontram à superfície do solo ou perto dela (Adams e Ayers, 1979; Messiaen *et al.*, 1991; Ryder, 1999; Bolton *et al.*, 2006). As apotecas de *S. sclerotiorum*, que produzem ascósporos, são formadas por germinação carpogénica de um escleroto localizado à superfície ou ligeiramente enterrado no solo sob certas condições ambientais (Purdy, 1979; Bolton *et al.*, 2006). Após a colonização do tecido hospedeiro pelo micélio, formam-se esclerotos. Esses novos esclerotos retornam ao solo eventualmente, onde sobrevivem a períodos adversos e esperam por uma próxima cultura susceptível para a infectar (Adams e Ayers, 1979).

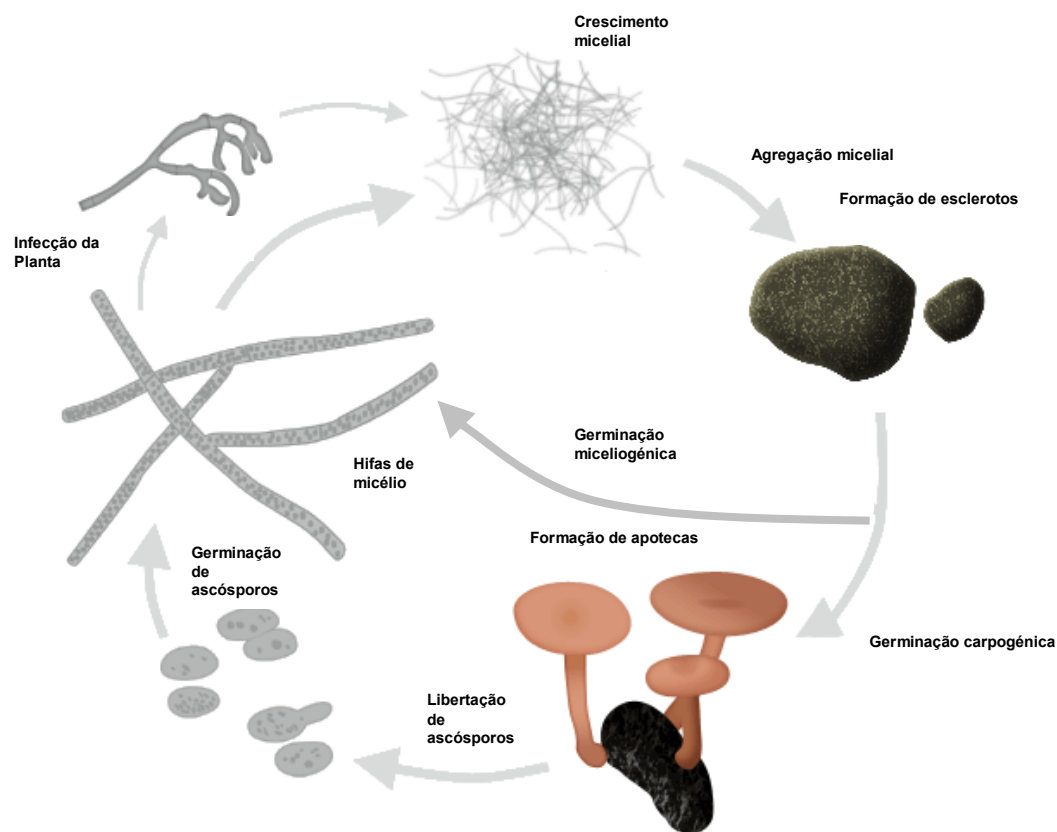


Figura 3 – Ciclo da doença causada por *S. sclerotiorum* (Adaptado de Rollins, 2007).

A maior parte dos hospedeiros, incluindo a alface, são infectados através dos ascósporos (Patterson e Grogan, 1985; Ben-Yephet *et al.*, 1993), sendo a produção de apotecas pela germinação carpogénica de esclerotos uma parte fundamental do ciclo de vida do patógeno (Clarkson *et al.*, 2004).

A capacidade do fungo *S. sclerotiorum* em infectar e penetrar os tecidos do hospedeiro depende do tipo de inóculo, do estado nutricional do patógeno, e das condições ambientais. Os ascósporos podem germinar na superfície de tecidos saudáveis mas não conseguem infectar a planta sem a presença de uma fonte de nutrientes exógena e de uma película de água. Por isso, os tecidos senescentes ou

necróticos geralmente servem como fonte de nutrientes para iniciar a germinação dos ascósporos, dando origem à infecção do hospedeiro (Abawi e Grogan, 1979; Lumsden, 1979; Patterson e Grogan, 1985).

O patógeno *S. sclerotiorum* produz uma grande variedade de enzimas líticas, degradativas, como endo e exopectinases, celulases, hemicelulases e proteases, que facilitam a colonização e a degradação da parede celular do hospedeiro (Lumsden, 1979).

A podridão branca é uma doença geograficamente cosmopolita, tendo a sua presença sido relatada em diversos países localizados em todos os continentes (Purdy, 1979), apesar de ser mais comum em zonas temperadas (Winton *et al.*, 2006). O seu óptimo de desenvolvimento situa-se entre os 18 e 20 °C, embora possam ocorrer ataques graves a partir de 10 °C.

O elevado potencial reprodutivo, associado à capacidade de sobrevivência a longo termo, tornam o escleroto o componente central na epidemiologia do patógeno *S. sclerotiorum* (Bolton *et al.*, 2006). A viabilidade dos esclerotos é afectada pela profundidade a que estão localizados no solo, o tempo que estão enterrados, a humidade e a temperatura do solo. A viabilidade dos esclerotos diminui ao longo do tempo e com o aumento de humidade do solo (Ben-Yephet *et al.*, 1993). Assim, embora a humidade ao nível do colo das plantas favoreça o desenvolvimento de *S. sclerotiorum*, o excesso de água no solo é-lhe prejudicial. É ainda muito sensível ao teor em dióxido de carbono, desenvolvendo-se melhor à superfície do solo do que em profundidade (Thicoïpé, 1997).

Temperaturas próximas do ponto de congelação (0 °C) ou superiores a 32 °C inactivam o fungo *S. sclerotiorum* (Purdy, 1979). Cerca de 90 % dos esclerotos são inactivados termicamente a 35 °C (Ben-Yephet *et al.*, 1993).

As apotecas germinam carpogenicamente a partir de um escleroto perto ou à superfície do solo sob certas condições ambientais (Bolton *et al.*, 2006). Os factores que condicionam a germinação carpogénica incluem a temperatura do solo (Huang e Kozub, 1991) e a humidade (Morrall, 1977; Bolton *et al.*, 2006), e também a temperatura a que os esclerotos são produzidos (Huang e Kozub, 1991; Huang e Kozub, 1993). Huang e Kozub (1991) verificaram que esclerotos produzidos por isolados originários de regiões frias (10 °C) germinam mais rapidamente do que os produzidos a temperaturas superiores (25 a 30 °C), indicando que a origem geográfica dos isolados tem um papel importante na capacidade de germinação carpogénica.

Os esclerotos enterrados no solo germinam carpogenicamente, depois de duas ou mais semanas de frio (4 °C) e uma humidade do solo perto da saturação, formando apotecas que produzem e libertam milhões de ascósporos (Kohn, 1979; Dillard *et al.*, 1995; Bardin e Huang, 2001), que podem ser responsáveis por uma epidemia de *S. sclerotiorum* (Abawi e Grogan, 1979; Bolton *et al.*, 2006). Segundo Abawi e Grogan (1979) e Clarkson *et al.* (2004), estes dois factores ambientais estão

directamente relacionados. Subbarao (1998) refere que temperaturas entre os 8 e 16 °C são particularmente favoráveis à formação de apotecas, estando esta também fortemente dependente do fotoperíodo (Kohn, 1979). Embora a luz não seja necessária para a formação dos primórdios das estipes, luz com comprimento de onda inferior a 390 nm é necessária para a completa expansão das apotecas (Smith e Boland, 1989; Thaning e Nilsson, 2000).

Pelos requisitos de condições específicas para que os esclerotos produzam apotecas e ocorra a libertação de ascósporos, a podridão branca da alface é imprevisível (Subbarao, 1998), podendo estar inactiva um ano e no ano seguinte provocar uma epidemia grave (Abawi e Grogan, 1979), mas surge com maior frequência em solos com historial de infecções por esta doença (Messiaen *et al.*, 1991; Ryder, 1999), que pode ocorrer em qualquer estágio de crescimento da alface, sendo as maiores perdas económicas mais frequentes durante a fase comercial da cultura.

A podridão branca da alface pode ser provocada por duas espécies muito próximas de *Sclerotinia* que se diferenciam pelo tamanho dos esclerotos. A espécie *S. minor* com pequenos esclerotos, inferiores a 2 mm, e a espécie *S. sclerotiorum* com grandes esclerotos, superiores a 3 mm (Thicoïpé, 1997; Ryder, 1999).

2.2.3. Sintomas

O primeiro sintoma, após a infecção pelo patógeno, é o estiolamento e murchidão das folhas basais que se estende a toda a planta, com o aumento do amarelecimento e necrose até provocar a morte do hospedeiro (Figura 4). O colo da planta apresenta uma podridão húmida sobre a qual se desenvolve um micélio branco característico, e também sobre as folhas da base (Figura 5). Na superfície do micélio formam-se umas pequenas estruturas brancas de forma irregular, que se tornam negras e duras, designadas esclerotos (Figura 6) (Thicoïpé, 1997; Ryder, 1999). Numa fase mais avançada, a parte aérea das plantas destaca-se facilmente da raiz (Almeida, 2006).

As plantas infectadas colapsam em menos de dois dias. O colapso da alface ocorre em qualquer fase do ciclo vegetativo, sendo mais frequente em duas das fases. A primeira em plântulas jovens, com cerca de três a quatro semanas, levando à sua morte rápida. A segunda fase economicamente importante, onde os maiores ataques têm lugar, ocorre próximo da colheita, ou seja, perto da, ou já, na maturação da cultura. O sintoma inicial é o emurhecimento das folhas exteriores da alface (Subbarao, 1998).



4a)



4b)

Figura 4 – Aparência geral de alfaces contaminadas com *S. sclerotiorum* a) no campo (<http://www.usask.ca/agriculture/plantsci/vegetable/vegetable/vpestmgmt.htm>, acesso em 12-11-2009); b) em laboratório.



Figura 5 – Podridão húmida no colo da planta (alface) com desenvolvimento de micélio branco de *S. sclerotiorum*.



Figura 6 – Formação de esclerotos na superfície do micélio de *S. sclerotiorum* em alface.

As infecções a partir de esclerotos são diferentes de infecções por ascósporos. Como a infecção originada pelo escleroto progride através dos vários níveis de folhas, toda a planta murcha. As folhas colapsadas caem na superfície do solo, ficando a planta com uma coloração amarelada. Subsequentemente, sob condições de humidade, o patógeno produz um micélio branco nas partes infectadas das plantas. Os esclerotos pretos são produzidos na página inferior das folhas que estão em contacto com o solo.

Quando os ascósporos iniciam a infecção, as perdas podem atingir os 70 %. Os sintomas são idênticos aos verificados pela infecção com esclerotos, excepto que são originados em áreas expostas da alface, onde os ascósporos se instalaram e infectaram. Desenvolve-se um abundante micélio cotonoso e branco nos tecidos afectados, produzindo subsequentemente esclerotos pretos grandes e irregulares (Lumsden, 1979).

A penetração da cutícula do hospedeiro é realizada por pressão mecânica. Após a penetração, os tecidos rapidamente ficam desorganizados como resultado de processos enzimáticos que afectam a lamela média entre células. O primeiro sintoma que surge nas folhas são manchas amarelas que ficam húmidas e moles, e que aumentam de dimensão e se tornam numa podridão mole e húmida, levando ao seu emurchecimento, amarelecimento, acastanhamento e morte.

A infecção latente de órgãos da planta antes da colheita normalmente resulta no desenvolvimento da doença na pós-colheita, pela propagação do patógeno de zonas doentes da planta para zonas saudáveis no armazenamento e transporte.

Os sinais no hospedeiro revelam-se através de grandes quantidades de micélio branco cotonoso, quando as condições ambientais são favoráveis, e a subsequente produção de esclerotos pretos de tamanho e forma variável (Purdy, 1979).

2.2.4. Meios de luta

A podridão branca tem sido tradicionalmente difícil de controlar, não existindo elevados níveis de resistência nas culturas mais afectadas por este patogénio (Lumsden, 1979; Bolton *et al.*, 2006). Devido a esta falta de níveis adequados de resistência dos hospedeiros, o recurso a fungicidas tem sido o método mais utilizado de controlo deste patogénio (Bardin e Huang, 2001; Steadman, 1979). No entanto, como o fungo *S. sclerotiorum* sobrevive no solo na forma de esclerotos é muito difícil de controlar pela utilização de fungicidas, que podem por sua vez levar à poluição ambiental (Shiyun *et al.*, 2005), ao desenvolvimento de resistências a outros patogénios, e a maiores custos económicos. Além disso, a aplicação de fungicidas após a plantação da alface é possível, mas tem-se revelado pouco eficaz, pois o produto não atinge as zonas propícias de infecção junto ao colo da planta e folhas basais (Thicoïpé, 1997).

Utilizam-se os fungicidas iprodiona e ciprodinil+fludioxonil (Tu, 1983), homologados em Portugal (Oliveira, 2009), para prevenir a infecção por ascósporos (Young *et al.*, 2004). No entanto, existe pouca informação disponível para determinar o momento óptimo de utilização dos fungicidas de modo a assegurar um eficaz controlo da doença e evitar tratamentos desnecessários (Clarkson *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2004).

A luta cultural é a melhor forma de controlar a podridão branca efectuando a prevenção da doença através da destruição de fontes de inóculo antes da plantação da cultura, removendo os restos de culturas anteriores.

A desinfecção do solo e a solarização são eficazes, assim como a utilização de fungos antagonistas, como *Trichoderma* spp. (Thicoïpé, 1997) e *Coniothyrium minitans* (Viegas, 2000).

Em estudos efectuados na Bélgica com patogénios que provocam podridão basal, em alface de estufa, verificou-se que o fungo *S. sclerotiorum* surge mais frequentemente na Primavera, Verão e Outono. Esta informação pode ser útil para o desenvolvimento de uma estratégia alternativa de controlo deste agente causal da podridão branca (Van Beneden *et al.*, 2009).

2.3. Métodos de diagnóstico

Têm vindo a ser desenvolvidos métodos adicionais de diagnóstico das doenças das plantas e respectivos agentes causais, numa tentativa de contrariar a morosidade dos métodos clássicos (como os postulados de Koch), assim como a capacidade de realização e conhecimentos taxonómicos que eles exigem. No entanto, aqueles que exigem uma tecnologia mais especializada, como microscopia electrónica e de fluorescência, cromatografia, electroforese, materiais radioactivos, etc., apresentam ainda grandes limitações devidas, sobretudo, ao elevado custo do equipamento e materiais necessários, bem como à necessidade de uma conveniente especialização dos recursos humanos (Tomaz, 2001).

Nos últimos anos, as técnicas moleculares têm sido amplamente utilizadas para detectar ou identificar inúmeros patógenos (Henson e French, 1993). Alguns avanços na biologia molecular e biotecnologia têm sido aplicados no desenvolvimento de ferramentas rápidas, específicas e sensíveis para a detecção precoce de agentes patogénicos das plantas, como o uso de técnicas imunológicas e de manipulação de ácidos nucleicos (Miller e Martin, 1988).

Ocorreram grandes progressos no que respeita ao desenvolvimento dos imunoensaios para fungos, embora permaneçam problemas na obtenção de anticorpos monoclonais específicos convenientemente adaptados à detecção do agente patogénico, e na extracção dos antígenos do fungo do material infectado (Tomaz, 2001). No entanto, recentemente, Yajima *et al.* (2008) desenvolveram um anticorpo de fragmento variável (scFv), dímero em cadeia simples, com afinidade para *S. sclerotiorum*, que consegue detectar a presença de micélio em pétalas de colza inoculadas. Este é o primeiro relato de um dímero scFv com afinidade para aquele agente patogénico com potencial para o desenvolvimento de um novo teste de diagnóstico, que constituiria uma ferramenta viável de diagnóstico para ajudar, por exemplo, nas decisões de ordem fitotécnica.

Há pouca inovação relativamente à utilização de proteínas parcialmente purificadas como fonte de antígeno para imunização (Tomaz, 2001).

A análise genética tem como base a utilização de ferramentas que permitam diferenciar organismos a vários níveis. Para a distinção taxonómica de fungos ao nível da espécie, tradicionalmente utilizavam-se caracteres morfológicos e fisiológicos, sendo, no entanto, os resultados muitas vezes incorrectos e por vezes de difícil obtenção (Goosen e Debets, 1996). Em níveis taxonómicos inferiores, como na análise de isolados de uma população, a taxonomia convencional é de difícil aplicação, mas os marcadores moleculares podem ser usados a este nível com grande fiabilidade. Estes têm origem em modificações no DNA de um ou mais organismos (Casimiro, 2000).

A aplicação de várias técnicas com base na análise do DNA reorganizou a sistemática de fungos e originou métodos eficazes de discriminação de fungos filogeneticamente muito próximos, a quase todos os níveis de resolução pretendidos, e também de detecção de novas espécies com uma elevada sensibilidade, superior à demonstrada pela metodologia clássica (Hillis e Dixon, 1991). Assim, a biologia molecular é actualmente a ferramenta mais eficaz de identificação, classificação e caracterização inter e intraespecífica de muitos organismos.

Qualquer técnica que vise detectar e avaliar estas diferenças deve ter um elevado poder de diferenciação, permitindo a distinção clara de isolados não relacionados, e detectar a semelhança de réplicas de um mesmo isolado. Além disso deve ser reprodutível, ou seja, ter a capacidade de obter resultados iguais em quaisquer repetições efectuadas (Casimiro, 2000).

Variadas técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas na identificação e caracterização de fungos, a diferentes níveis taxonómicos, como a análise de polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição do DNA mitocondrial (mtDNA) – RFLPs (Buscot *et al.*, 1996; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999), DNA polimórfico aleatoriamente amplificado – RAPDs (Kano *et al.*, 1997), polimorfismos de ampliação de microsátélites – MSP-PCR (Buscot *et al.*, 1996), e polimorfismos de dimensão e restrição do DNA ribossomal (rDNA) – ITS (Espaçadores Transcritos Internos) e IGS (Espaçadores Intergénicos) (Buscot *et al.*, 1996; Kurtzman e Robnett, 1997; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

O desenvolvimento de técnicas moleculares, como a sequenciação de DNA e particularmente a análise de sequências nucleotídicas dos genes do RNA ribossomal (rRNA), contribuíram grandemente para a taxonomia e sistemática dos fungos (Seifert *et al.*, 1995). O DNA codificante para o rRNA parece estar entre as sequências mais conservadas, permitindo detectar afinidades acima do nível da espécie (Kurtzman, 1985). Analisando sequências de DNA altamente variáveis é possível individualizar genótipos específicos, e analisando sequências que são altamente conservadas podem-se realizar estudos sobre relações filogenéticas a vários níveis taxonómicos (Hwang e Kim, 1999). Deste modo, as sequências nucleotídicas do gene nuclear ribossomal DNA 5,8S e as regiões flanqueadoras ITS1 e ITS2 têm sido largamente utilizadas (Jacobs e Rehner, 1998).

Jacobs e Rehner (1998) utilizaram sequências ITS de rDNA para revelar relações filogenéticas entre espécies de *Botryosphaeria*, confirmando que existe alguma coerência entre caracteres morfológicos e culturais e as sequências ITS, pelo menos em alguns *taxa* (Lopes, 2008).

As técnicas de detecção molecular são baseadas na capacidade que as moléculas de ácidos nucleicos têm de hibridar com moléculas alvo que possuam sequências nucleotídicas complementares (Chawla, 2000).

No que se refere ainda às técnicas baseadas nos ácidos nucleicos, tem havido um rápido desenvolvimento existindo grandes expectativas nos métodos com base na reacção em cadeia da polimerase (PCR) (Tomaz, 2001). A técnica de PCR, desenvolvida por investigadores na Cetus Corporation- Estados Unidos da América, em 1985-86, baseia-se na hibridação entre moléculas de ácidos nucleicos, e consiste na ampliação exponencial de fragmentos genómicos a partir da hibridação selectiva de oligonucleótidos (iniciadores ou primers), desenhados para o efeito, com regiões específicas do genoma do organismo alvo. De um modo simples, consiste na síntese enzimática, pela DNA polimerase, de um segmento específico de DNA a partir da molécula de DNA molde que contém a sequência a ampliar, cuja finalidade é a produção de múltiplas cópias, em poucas horas, de um segmento de DNA previamente seleccionado (Chawla, 2000).

A técnica de reacção de PCR tem como vantagens o facto de não depender do isolamento dos microrganismos em meio de cultura; ser uma alternativa à clonagem, pois envolve a ampliação de genes *in vitro* em oposição à clonagem *in vivo*; ser um processo simples e automatizado, conseguindo-se uma ampliação fácil, muito rápida e selectiva de fragmentos de DNA específicos; ter uma elevada sensibilidade, pois é possível ampliar uma molécula específica numa mistura complexa de moléculas de DNA e/ou RNA; produzir uma elevada quantidade de moléculas de DNA idênticas a partir de uma quantidade diminuta de material inicial (Chawla, 2000; Videira, 2001).

Estes métodos, considerados muito sensíveis, muito específicos e rápidos, com a vantagem ainda de poderem quantificar rigorosamente a infecção provocada pelo fungo, apresentam todas as qualidades teóricas dos sistemas de detecção ideais. No entanto, existem ainda alguns problemas técnicos de ampliação pela PCR e de detecção dos produtos específicos que origina. Esta detecção é feita normalmente por electroforese, técnica pouco prática para ensaios de rotina. Assim, torna-se desejável o desenvolvimento de técnicas especiais de detecção directa na reacção de PCR (Tomaz, 2001).

Em 1988 foi possível automatizar a técnica de PCR com a introdução de uma DNA polimerase estável a temperaturas elevadas. A enzima Taq DNA polimerase, que permitiu o desenvolvimento da técnica de PCR, foi isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus* que, sendo resistente ao calor, suporta as altas temperaturas utilizadas durante cada ciclo de PCR para desnaturar o DNA, permitindo a automatização do processo de PCR que envolve vários ciclos (Henson e French, 1993; Chawla, 2000). A automatização da técnica de PCR surgiu com o desenvolvimento dos termocicladores, aparelhos de fácil manuseamento, que controlam e alternam automaticamente a temperatura durante um período de tempo programado para um conjunto de ciclos sucessivos, em que apenas é necessário programar os ciclos de temperaturas (Rocha, 1999).

A Taq DNA polimerase polimeriza desoxirribonucleótidos necessitando, para iniciar a polimerização, de uma pequena sequência de nucleótidos (oligonucleótidos) designada de iniciador ou primer. É este

primer que possibilita que a detecção por PCR seja específica. O desenho da sequência dos primers é um passo fundamental na detecção por PCR. Os primers são sintetizados de modo a serem complementares às extremidades do segmento de DNA a ampliar, delimitando-o, sendo assim necessário ter alguma informação sobre a sequência do DNA, ou de sequências flanqueantes, para se fazer uma reacção de PCR (Chawla, 2000).

Para a ampliação por PCR de determinada zona do genoma são necessários dois primers diferentes. Um que hibrida com uma cadeia e outro que hibrida com a cadeia complementar. A sequência nucleotídica entre os dois primers é preferencialmente ampliada ao fim do primeiro ciclo (Figura 7).

A técnica de PCR consiste numa série de ciclos em que, cada um dos quais, envolve reacções efectuadas a temperaturas diferentes, compreendendo cada um deles três etapas fundamentais (Figura 7):

1ª desnaturação térmica do DNA, com separação das duas cadeias de DNA molde;

2ª emparelhamento (hibridação) dos iniciadores ou primers com as sequências complementares, que delimitam o fragmento a ser ampliado, nas cadeias desnaturadas do DNA alvo;

3ª síntese de DNA, com a extensão dos primers realizada pela Taq DNA polimerase, usando como molde a cadeia a que cada primer está emparelhado (Henson e French, 1993; Videira, 2001).

A DNA polimerase começa o processo de síntese na região flanqueada pelos primers, sintetizando novas moléculas de DNA idênticas à região alvo da cadeia dupla do DNA original, facilitando a junção dos nucleótidos complementares que estão livres na solução.

A seguir à síntese de DNA inicia-se um novo ciclo com nova desnaturação do DNA e assim sucessivamente. As três etapas enumeradas podem ser repetidas dezenas de vezes no aparelho de PCR sem intervenção manual.

Só ao terceiro ciclo de PCR se obtêm moléculas de DNA, em cadeia dupla, com o tamanho apropriado, cujas extremidades são definidas pelas extremidades 5' dos primers utilizados. Durante cada ciclo posterior de PCR estas moléculas são duplicadas levando à ampliação exponencial da sequência entre os dois primers usados na reacção (Figura 7) (Videira, 2001).

Cada ciclo duplica o número de fragmentos sintetizados no ciclo anterior pelo que, após uma série de ciclos sucessivos, se obtêm uma quantidade elevada de fragmentos de DNA alvo, aproximadamente 2^n , em que n é o número de ciclos realizados, partindo de uma mistura complexa em que ele está presente em cópia única. Esta quantidade é suficiente para que o DNA possa ser directamente visualizado num gel de agarose (Videira, 2001).

A dificuldade de implementação da técnica de PCR em testes de detecção de agentes fitopatogênicos na rotina dos laboratórios de diagnóstico resulta do elevado custo do termociclador e dos reagentes, que poderá ser ultrapassada pela rapidez e especificidade da técnica (Videira, 2001).

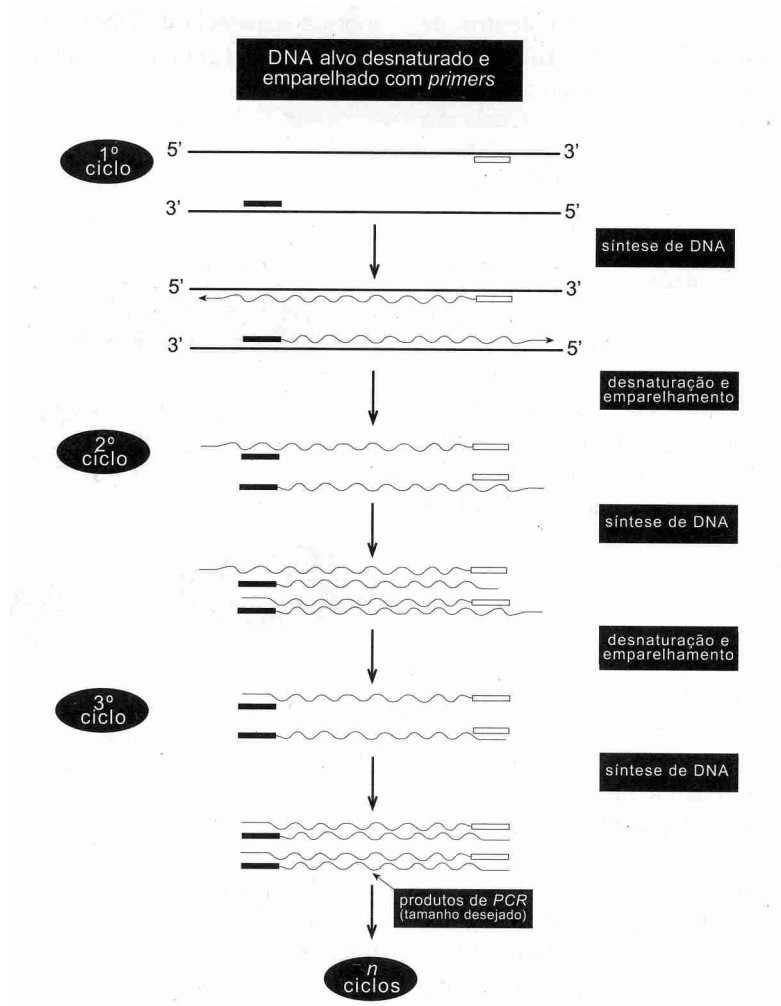


Figura 7 – Amplificação de uma sequência específica de DNA através da técnica de PCR (Chawla, 2000; Videira, 2001).

São várias as zonas do genoma de fungos que têm sido seleccionadas para o desenho de primers, como o mtDNA (Hillis e Dixon, 1991; Ferreira *et al.*, 1996), o gene da proteína actina (Lartey *et al.*, 2003), ou a unidade génica correspondente ao rRNA (Hillis e Dixon, 1991).

Em Eucariotas, os três maiores genes do rRNA encontram-se agrupados numa unidade génica e codificam para as regiões ribossomais 18S (pequena subunidade ribossomal-SSU), 5,8S e 28S (grande subunidade ribossomal-LSU), encontrando-se separados por regiões espaçadoras não codificantes.

Existem dois tipos de regiões espaçadoras, as regiões ITS e as regiões IGS. Os espaçadores ITS são transcritos, enquanto os espaçadores intergênicos IGS podem ou não sê-lo, designando-se ETS (Espaçadores Transcritos Externos) ou NTS (Espaçadores Não-Transcritos), respectivamente. São as regiões espaçadoras IGS que fazem a ligação em série das várias unidades gênicas, separando as regiões ribossomais 18S e 28S. Ao nível dos espaçadores ITS existem duas regiões denominadas ITS1 e ITS2, localizadas entre as regiões codificantes rRNA 18S e 5,8S, e entre as regiões codificantes rRNA 5,8S e 28S, respectivamente (Figura 8) (Hwang e Kim, 1999).

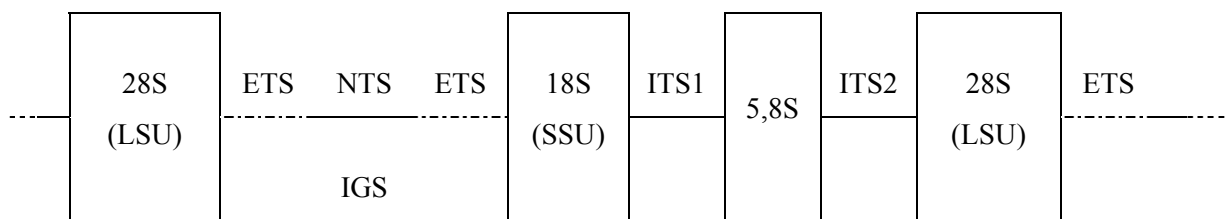


Figura 8 – Unidade gênica do rRNA (Adaptado de Hwang e Kim, 1999).

A zona do DNA genómico que contém os genes do rRNA é a mais utilizada para o desenho de primers específicos na detecção de microrganismos (Henson e French, 1993), porque possui zonas conservadas e zonas variáveis, e um elevado número de cópias ligadas em tandem. Podem utilizar-se primers para PCR baseados em regiões conservadas do rRNA para ampliar cada uma destas regiões ou o conjunto das regiões ITS1 e ITS2, denominado ITStotal (White *et al.*, 1990). Esta região, que compreende ambos os espaçadores ITS e inclui o gene 5,8S, tem, normalmente, uma dimensão igual ou inferior a 1000 bp (Duncan *et al.*, 1998).

Os genes rRNA têm sido largamente utilizados em estudos filogenéticos de fungos. Embora funcionais e evolutivamente conservados, não são iguais e, encontrando-se em todos os seres vivos em múltiplas cópias, podem funcionar como um eficaz marcador taxonómico. As cópias destas unidades parecem evoluir em simultâneo como se fossem um único gene. A baixa taxa de polimorfismo na transcrição da unidade de rDNA, em adição ao facto de que as diferentes regiões codificantes do rDNA repetidas normalmente demonstram taxas de evolução distintas, permitem a este DNA providenciar informação a qualquer nível sistemático (Hillis e Dixon, 1991). Sendo a evolução destes genes lenta, permite a sua utilização em estudos filogenéticos ao nível dos grupos taxonómicos supragenéricos, enquanto que o polimorfismo entre as regiões espaçadoras ITS é elevado, devido à elevada taxa de evolução, podendo ser utilizado ao nível da diferenciação inter e intraespecífica (Hwang e Kim, 1999). Segundo Esteve-Zarzoso *et al.* (1999), o gene rRNA 5,8S é mais discriminante do que os genes 18S e 28S que demonstram menos diferenças interespecíficas. A localização das regiões ITS, flanqueadas por genes altamente conservados, facilita a ampliação por PCR com primers dos genes conservados. O facto de

também possuem um tamanho menor que as regiões espaçadoras IGS, torna-as num objecto preferencial em estudos filogenéticos (Hwang e Kim, 1999). Assim, a região ITS é a região espaçadora mais largamente sequenciada de DNA, em fungos, sendo útil para comparações taxonómicas de espécies e géneros relativamente próximos (Berbee e Taylor, 2001), em que a região ITS1 tem revelado uma maior variabilidade do que a região ITS2 (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

A ampliação de regiões ITS permite a distinção de grupos de organismos baseada em polimorfismos de dimensão, isto é, na diferença de tamanho do fragmento ampliado. Esta análise pode ser ainda mais discriminante com a restrição de qualquer um dos fragmentos ITS com endonucleases, técnica designada ARDRA (Buscot *et al.*, 1996).

Recentemente, sequências de genes codificantes de proteínas, como o gene que codifica a β -tubulina, têm sido combinadas com sequências ITS. As tubulinas (α e β) não são consideradas marcadores ideais para a filogenia de fungos, devido à elevada taxa de heterogeneidade entre os diferentes taxa. No entanto, um número importante de estudos na evolução de fungos foi suportado pela filogenia de ambas as tubulinas. Correntemente, as tubulinas são as mais utilizadas como genes codificantes de proteínas em fungos, e fornecem alguns conhecimentos interessantes na evolução profunda e na estrutura genética dos fungos (Keeling, 2003).

Vários trabalhos baseados em técnicas moleculares têm sido desenvolvidos, aplicados ao patógeno *S. sclerotiorum*.

Os microsatélites estão largamente dispersos e regularmente distribuídos no genoma dos eucariotas, sendo usados para estudar a variabilidade genética intraespecífica dentro de populações. Sirjusingh e Kohn (2001) utilizaram microsatélites na caracterização de *S. sclerotiorum*, desenhando 25 primers que produziram produtos de ampliação inequívocos de microsatélites daquele patógeno, dos quais 11 permitiram distinguir a diversidade existente na espécie *S. sclerotiorum* em várias regiões geográficas, dois ampliaram também a espécie *S. minor*, e 12 ampliaram simultaneamente as espécies *S. minor* e *Sclerotinia trifoliorum* Eriks, patógeno adiante mencionado como *S. trifoliorum*.

Meinhardt *et al.* (2002) estudaram a diversidade genética existente entre isolados de *S. sclerotiorum* no Brasil na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Numa tentativa de determinar a variabilidade genética, e encontrar novos marcadores genéticos entre os isolados, testaram ITS/RFLPs ampliando a região ITS na PCR com os primers ITS1 e ITS4 descritos por White *et al.* (1990), que não revelaram diferenças genéticas entre os isolados. No entanto, observaram diversidade genética entre os isolados de *S. sclerotiorum* através da ampliação da região cromossómica com primers baseados na sequência do telómero e um microsatélite.

Sexton e Howlett (2004) utilizando os microsátélites estudados por Sirjusingh e Kohn (2001), como marcadores para determinar a variação genética e diferenciação em populações de *S. sclerotiorum* em colza na Austrália, verificaram que existe um nível moderado a elevado de diferenciação genética entre populações do patógeno originárias de duas regiões diferentes da Austrália.

Winton *et al.* (2006) utilizaram marcadores microsátélites e do rDNA, sequências de DNA de zonas ITS e IGS, para estudar a diversidade genética de *S. sclerotiorum* em alface, couve, batata e feijão no Alaska, revelando a existência de duas espécies de *Sclerotinia*. A espécie *S. sclerotiorum* e uma espécie relacionada, já identificada em espécies vegetais selvagens e batateira cultivada na Noruega (*Sclerotinia* sp. 1). Estas duas espécies evoluíram paralelamente não se recombinando entre si.

Mert-Türk *et al.* (2007) relataram a primeira demonstração da variação genética e morfológica dentro de uma população de *S. sclerotiorum* na Turquia, através de marcadores moleculares (microsátélites) e características morfológicas. Numa colecção de 36 isolados analisados, observaram 23 isolados distintos indicando uma elevada diversidade genética dentro da população do patógeno naquele país.

Para demonstrar que é possível desenvolver primers específicos para detecção directa de patógenos, Vettrano *et al.* (2005) investigaram o agente patogénico *Sclerotinia pseudotuberosa* Rehm, responsável pela podridão preta no castanheiro (*Castanea sativa* Mill.), em tecidos assintomáticos do hospedeiro. Ensaio com a PCR foram desenvolvidos para a detecção específica deste patógeno. Desenhamos dois primers específicos (RAC1 e RAC2) dentro da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA por comparação de sequências de 24 isolados de *Sclerotinia pseudotuberosa* Rehm e espécies relacionadas. A especificidade dos primers foi testada em géneros relacionados e não relacionados, e no DNA total do castanheiro. Os ensaios realizados provaram ser altamente sensíveis e capazes de detectar picogramas de DNA do patógeno, em tecidos assintomáticos de castanheiro.

Outros trabalhos realizados permitiram a identificação de duas novas espécies de *Sclerotinia*, na China e no Japão, assim como a sua diferenciação de outras espécies já conhecidas pertencentes a este género.

Li *et al.* (2000) revelaram uma nova espécie de *Sclerotinia* no centro da China diferente de *S. sclerotiorum*, *S. trifoliorum* e *S. minor*, com base em características morfológicas e culturais, na germinação carpogénica e proteínas solúveis dos esclerotos (SDS-PAGE – Electroforese em gel de poliacrilamida). Foi identificada como *Sclerotinia nivalis* sp. nov., adiante mencionada como *S. nivalis*, sendo o primeiro relato da sua ocorrência na China, e na alface como um novo hospedeiro para este patógeno. Saito (1997) relatou que plantas herbáceas da família das *Asteraceae*, *Apiaceae*,

Lamiaceae, *Plantaginaceae* e *Brassicaceae* são hospedeiros da espécie *S. nivalis*, parecendo ter uma variedade menor de hospedeiros do que no caso de *S. sclerotiorum* (Boland e Hall, 1994) e *S. minor* (Melzer *et al.*, 1997).

Narumi *et al.* (2001) identificaram e descreveram uma nova espécie de *Sclerotinia* que ataca plantas do género *Trillium* L. no Japão. Essa nova espécie, designada *Sclerotinia trilli* sp. nov., distingue-se das espécies *S. sclerotiorum*, *S. minor*, *S. trifoliorum* e *S. nivalis*, pelos esclerotos de grande dimensão, a aparência cultural da colónia, e as relativamente grandes apotecas de cor vermelho acastanhado a amarelo acastanhado, em adição à sua natureza parasítica no *Trillium* spp. Estas espécies podem ainda ser distinguidas pelos padrões electroforéticos das proteínas principais em extractos de esclerotos (SDS-PAGE), em que todos são diferentes. Patogenicamente esta espécie até agora, que se saiba, só ocorreu em *Trillium* spp.

Em sequência de vários trabalhos desenvolvidos, o genoma do patógeno *S. sclerotiorum* foi sequenciado em Março de 2005, apresentando cerca de 14500 genes e 39 Mb de tamanho (Bolton *et al.*, 2006; Dickman, 2007). As sequências foram depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI), tendo ficado disponíveis em Outubro de 2005 (Bolton *et al.*, 2006).

3. Material e Métodos

Todos os produtos químicos utilizados na preparação de soluções e géis foram comprados à Merck ou à Sigma, quando não especificado em contrário. Os reagentes de PCR foram comprados à Bioline, os dNTPs e os vectores à Invitrogen, os primers à STAB VIDA, as enzimas de restrição e os marcadores de electroforese à Fermentas.

A composição dos meios de cultura, soluções, tampões e géis utilizados na realização do presente trabalho encontra-se descrita nos Anexo 1 e Anexo 2.

3.1. Obtenção de inóculos de *S. sclerotiorum*, *B. cinerea* e *B. lactucae*

3.1.1. Obtenção de material infectado proveniente de campos de alface

Este estudo do patogénio baseou-se em duas amostras de alface infectadas com *S. sclerotiorum* (Quadro 1).

Quadro 1 – Amostras de alface infectadas com *S. sclerotiorum* utilizadas no presente trabalho.

Espécie	Hospedeiro de origem	Região de colheita	Data de colheita	Amostra (código)
<i>S. sclerotiorum</i>	Alface	Silveira	16/01/2008	SSM1
<i>S. sclerotiorum</i>	Alface	Torres Vedras	19/01/2009	SSM2

Colheram-se plantas de alface no campo manifestando sintomas e sinais de podridão na base e ao longo da nervura principal, assim como na zona do colo da planta. Seleccionaram-se zonas das plantas que não apresentavam nem sintomas nem sinais do patogénio (B), outras zonas com sintomas mas sem sinais do agente patogénico (A), e outras zonas fortemente infectadas com sintomas e sinais da doença (F). O material seleccionado foi seccionado em porções de 350 mg, colocado em papel de alumínio, congelado em azoto líquido e armazenado a -80 °C.

Paralelamente à recolha de amostras de alface infectadas com *S. sclerotiorum*, recolheram-se também amostras do mesmo hospedeiro infectadas com *B. cinerea* e *B. lactucae*, para utilizar como controlo negativo nas reacções de PCR. Foram seleccionadas duas amostras de alface infectadas com *B. cinerea* e três amostras de alface contaminadas com *B. lactucae* (Quadro 2).

Quadro 2 – Amostras de alface infectadas com *B. cinerea* e *B. lactucae* utilizadas no presente trabalho.

Espécie	Hospedeiro de origem	Região de colheita	Data de colheita	Amostra (código)
<i>B. cinerea</i>	Alface	Lisboa	19/01/2009	Bo1
<i>B. cinerea</i>	Alface	Montargil	02/05/2009	Bo2
<i>B. lactucae</i>	Alface	Tapada da Ajuda	12/05/2006	Br2
<i>B. lactucae</i>	Alface	Tapada da Ajuda	20/01/2009	Br3
<i>B. lactucae</i>	Alface	Montargil	02/05/2009	Br4

Colheram-se plantas de alface no campo manifestando sintomas e sinais de *B. cinerea* e de *B. lactucae* nas folhas, tendo-se procedido como descrito para *S. sclerotiorum*.

3.1.2. Multiplicação de inóculos

Para o agente patogénico *S. sclerotiorum*, efectuaram-se isolamentos a partir de esclerotos existentes sobre folhas de alface infectadas com o patogénio, de acordo com Rego (comunicação pessoal).

Para o efeito, após a recolha dos esclerotos do material vegetal infectado para placas de Petri esterilizadas, efectuou-se, em câmara de fluxo laminar, a desinfecção superficial dos esclerotos por imersão numa solução de hipoclorito de sódio a 1 %, durante 5 segundos, a que se seguiu uma passagem rápida por água destilada esterilizada para remover o desinfectante. Este passo teve como finalidade assegurar que no material recolhido não estariam presentes outros agentes patogénicos ou saprófitas. Secaram-se os esclerotos entre duas folhas de papel absorvente, previamente esterilizado, e colocaram-se quatro esclerotos por placa de Petri, contendo meio de agar de batata dextrosada (PDA). Selaram-se as placas de Petri com Parafilm “M”, deixando-as na bancada sem luz solar directa e à temperatura ambiente de ± 20 °C, valor considerado óptimo para o desenvolvimento de *S. sclerotiorum* (Thicoïpé, 1997; Vettrano *et al.*, 2005). O meio de cultura PDA foi previamente esterilizado por autoclavagem a 120 °C, a 1,4 bar de pressão, durante 20 minutos, e distribuído em placas de Petri esterilizadas.

Para obtenção de culturas puras de *S. sclerotiorum*, para utilizar em estudos posteriores, efectuaram-se repicagens sucessivas de esclerotos, sob condições de assepsia, para placas de Petri contendo meio de cultura PDA, segundo a metodologia acima descrita.

O isolamento de *B. cinerea* foi efectuado a partir de alfaves com sintomas e sinais visíveis da doença, provenientes de superfícies comerciais, de onde se retirou micélio com conídios à lupa binocular com

o auxílio de um estilete. O micélio foi transferido para uma placa de Petri com meio PDA, colocada à temperatura ambiente (± 20 °C) e sem luz solar directa, segundo Rego (comunicação pessoal).

Para obtenção de culturas puras do patogénio, efectuaram-se repicagens sucessivas, em condições de assepsia, com quadrados de meio PDA (0,5 cm x 0,5 cm) com micélio de culturas com 7 dias, até à obtenção de culturas puras (Figura 9). As culturas puras assim obtidas repicaram-se, nas mesmas condições, para placas de Petri contendo meio PDA (Mirzaei *et al.*, 2007), para serem utilizadas nos testes de detecção molecular.

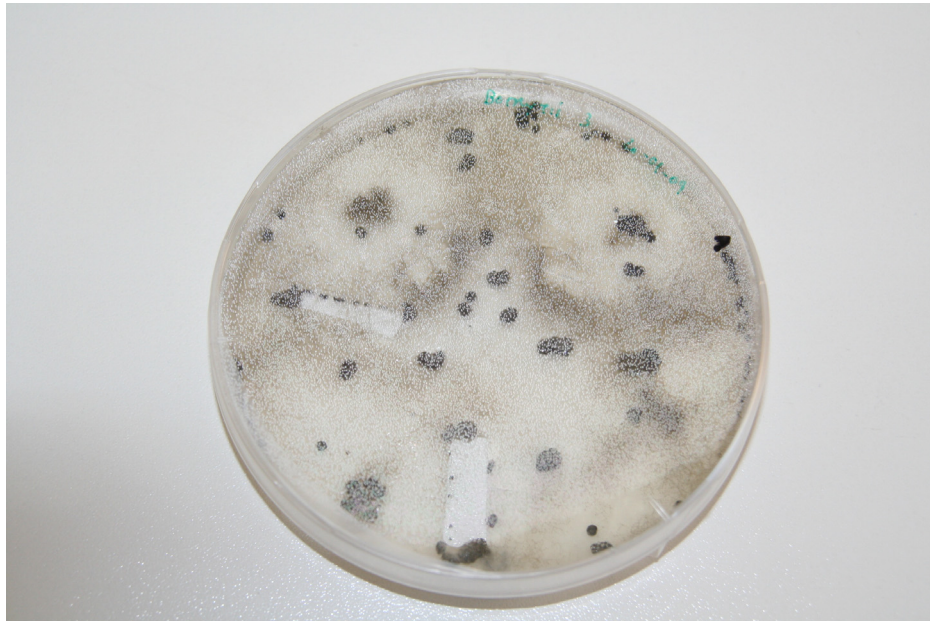


Figura 9 – Cultura de *B. cinerea* em placas de Petri com meio PDA.

Para a manutenção de *B. lactucae*, o material infectado recolhido no campo foi colocado, dentro de sacos de plástico, numa câmara de crescimento às escuras a 16 ± 1 °C, durante 24 h para promover a esporulação do patogénio. O método de infecção seguido baseou-se em Coelho (2001). Recolheram-se pedaços de folhas com esporulação (2 cm x 2 cm) para um frasco SCHOTT de 250 ml, adicionando 25 ml de água destilada. Agitou-se o frasco no vortex para promover a libertação dos esporos. Decantou-se para um tubo de centrífuga esterilizado de 50 ml, e efectuou-se a contagem dos esporos ao microscópio óptico composto, com uma ampliação total de 100x, numa câmara de contagem (Neubauer). Ajustou-se a concentração de esporos para 5×10^5 esporos/ml, mantendo-se em gelo até à inoculação das plantas, não excedendo este período as 2 h, de acordo com Coelho (2001).

O patogénio *B. lactucae*, por ser um organismo biotrófico, necessita de ser mantido constantemente em material vegetal fresco, impossibilitando a sua conservação *in vitro*.

3.2. Ensaio de inoculação artificial com os diferentes agentes patogénicos

3.2.1. Obtenção de material vegetal

Para obtenção de plantas sãs de alface semearam-se, em tabuleiros alveolados de plástico rígido, sementes de alface cultivar Dos Mercados. Os 28 alvéolos do tabuleiro foram preenchidos com substrato de turfa Levington F2 (Fisons, UK), composto de estrutura fina, nível médio de nutrientes, sem areia e com pH neutro. De seguida, colocaram-se 3-4 sementes de alface em cada alvéolo e cobriram-se com vermiculite de granulometria fina. Após pulverização com água, o tabuleiro foi colocado num tabuleiro propagador (24 cm x 38 cm x 6 cm), onde se adicionou água, e transferido para uma câmara de crescimento com ambiente controlado a 20 ± 1 °C, humidade relativa de 70 % e fotoperíodo de 20 h, fornecido por tubos fluorescentes Osram de luz fria branca a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para germinação das sementes e crescimento das plântulas (Figura 10). Quando as plantas atingiram o estado de 2-3 folhas verdadeiras foram transplantadas para vasos de plástico rígido, com cerca de 300 cm^3 de capacidade, contendo o mesmo substrato de turfa que o tabuleiro alveolado (Figura 11). Os vasos foram mantidos nas mesmas condições ambientais atrás descritas até produzirem 3-4 folhas verdadeiras, altura em que se procedeu à inoculação. Para inocular com *B. cinerea* e *B. lactucae*, quando as alfaces atingiram as 2-3 folhas verdadeiras efectuou-se a repicagem das plantas, no tabuleiro alveolado, ficando apenas uma alface por alvéolo.

Durante o decorrer do ensaio as plantas foram mantidas com rega diária por capilaridade.



Figura 10 – Sementeira de alfaces num tabuleiro alveolado de plástico rígido.



Figura 11 – Transplantação de alfaces para vasos de plástico rígido.

3.2.2. Inoculação de material vegetal

A partir das colónias de *S. sclerotiorum* em estudo, em placas de Petri com meio PDA, sem luz solar directa e à temperatura ambiente (± 20 °C), colheram-se esclerotos que foram colocados em novas placas de Petri, com o mesmo meio de cultura, e conservados a 4 °C até serem utilizados para inocular as alfaces envasadas (Leiner e Winton, 2006).

Com base nos trabalhos desenvolvidos por Koike e Subbarao (1995) e Arbaoui *et al.* (2004), procedeu-se à inoculação das plantas de alface envasadas, quando atingiram 3-4 folhas verdadeiras.

Em câmara de fluxo laminar seleccionaram-se esclerotos que foram desinfectados com hipoclorito de sódio a 1 % e posteriormente lavados com água destilada esterilizada, ficando armazenados numa placa de Petri com água destilada esterilizada, para não desidratarem, até à inoculação. Colocaram-se quatro esclerotos à superfície do substrato, pressionando ligeiramente para que ficassem enterrados a 0,5 cm de profundidade, distando 1 cm do colo das plantas. Os esclerotos, e toda a superfície do substrato, foram cobertos com vermiculite e pulverizados com água, de modo a manter a humidade. Os vasos foram colocados num tabuleiro de plástico rígido, ao qual se adicionou água, sendo de seguida transferidos para uma câmara de crescimento com ambiente controlado a 20 ± 1 °C, humidade relativa de 70 % e fotoperíodo de 20 h, fornecido por tubos fluorescentes Osram de luz fria branca a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Foram inoculadas quatro plantas com esclerotos e duas plantas testemunha com água. Os vasos foram observados diariamente, a partir dos 8-10 dias após a inoculação, para a detecção dos primeiros

sintomas, visto estar descrito na bibliografia um período de incubação do patogénio de cerca de 2-3 semanas (Inácio, 1997).

Para o patogénio *B. cinerea*, trabalhando em condições de assepsia e seguindo uma adaptação ao método utilizado por Edwards e Seddon (2001), colocaram-se 10 ml de água destilada esterilizada na placa de Petri com micélio de *B. cinerea*, com 7 dias, de modo a cobrir todo o micélio do patogénio presente na placa. A placa foi selada com Parafilm “M” e colocada no agitador horizontal a 300 rpm, durante cerca de 3 h. Na câmara de fluxo laminar, com o auxílio de um pincel libertaram-se o micélio e os esporos do meio PDA. Decantou-se a suspensão para tubos de centrifuga esterilizados de 50 ml, que foram centrifugados a 3000 rpm, durante 3 minutos, à temperatura ambiente. Eliminou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o “pellet” em 2 ml de água destilada esterilizada. Filtrou-se a suspensão por Miracloth e efectuou-se a contagem dos esporos ao microscópio óptico composto, com uma ampliação total de 100x, numa câmara de contagem (Neubauer). Ajustou-se a concentração de esporos para 3×10^5 esporos/ml.

Quando as plantas atingiram 2-3 folhas verdadeiras, e após repicagem, picaram-se as folhas, em dois locais distintos, com uma agulha esterilizada. Colocaram-se 15 ml da suspensão de esporos concentrada a 3×10^5 esporos/ml num pulverizador manual pequeno, e pulverizaram-se totalmente as folhas das alfaces previamente picadas. As plantas testemunha, 1/6 do total, não foram inoculadas com a suspensão de esporos. O propagador foi fechado e selado, com a respectiva tampa, para assegurar o efeito de câmara húmida. Colocou-se numa câmara de crescimento a 20 ± 1 °C, às escuras, durante 4 dias consecutivos, transferindo-se para uma câmara de crescimento a 20 ± 1 °C, com um fotoperíodo de 20 h (Figura 12). A observação e avaliação dos sintomas nas plantas tiveram início 8-10 dias após a inoculação.

No caso do patogénio *B. lactucae*, quando as plantas atingiram 2-3 folhas verdadeiras, e após repicagem, foram inoculadas com uma suspensão de esporos concentrada a 5×10^5 esporos/ml, colocando duas gotas de 10 µl em cada folha de alface. As plantas testemunha, 1/6 do total, não foram inoculadas com a suspensão de esporos. Fechou-se e selou-se o propagador com a respectiva tampa, para assegurar o efeito de câmara húmida. Colocou-se numa câmara de crescimento a 16 ± 1 °C, às escuras, durante 24 h, sendo depois transferido para uma câmara de crescimento a 20 ± 1 °C, com um fotoperíodo de 20 h (Figura 12). Após 12 dias de desenvolvimento da doença o propagador, totalmente fechado, foi colocado numa câmara de crescimento a 16 ± 1 °C, às escuras, durante 24 h, para promover a esporulação do patogénio. De seguida procedeu-se à avaliação dos sintomas nas plantas (Coelho, 2001).



Figura 12 – Ilustração de alfaces inoculadas com *B. cinerea* ou *B. lactucae*.

3.2.3. Colheita de material vegetal das plantas artificialmente inoculadas

Cada uma das amostras foi colhida de plantas de alface apresentando sintomas e sinais das doenças. Seleccionaram-se zonas das plantas que não apresentavam nem sintomas nem sinais (B), outras com sintomas e sem estruturas visíveis (A), e outras zonas fortemente infectadas com sintomas e sinais muito intensos (F). O material seleccionado foi seccionado em porções de 500-700 mg e preparado como em 3.1.1.

3.2.4. Reisolamento do agente causal da podridão branca da alface

Após a observação dos sintomas e sinais nas plantas envasadas, procedeu-se ao reisolamento do agente causal, com o objectivo de confirmar a sua presença e relação com o fenótipo observado, utilizando o método de isolamento a partir de esclerotos referido por Rego (comunicação pessoal). A análise do crescimento em placa foi feita como em 3.1.2., mas colocando apenas um escleroto por placa de Petri com meio PDA.

3.3. Germinação carpogénica de *S. sclerotiorum*

Para que os esclerotos originem o estado sexuado e formem apotecas, é necessário que ultrapassem a fase de dormência ou repouso, o que sucede sob a influência de um conjunto de condições ambientais ou estímulos (Bolton *et al.*, 2006), sobre cuja duração há referências discrepantes e variadas. Assim, com base em Finlayson *et al.* (1989), Dillard *et al.* (1995), Inácio (1997) e Young *et al.* (2004), os esclerotos formados em placas de Petri com meio PDA foram colocados a 4 °C e na ausência de luz, durante 5 semanas consecutivas. Após receberem o estímulo pelas baixas temperaturas, os esclerotos ficaram em condições de ser incubados para a produção de apotecas. Foram então colocados em placas de Petri de 15 cm de diâmetro com algodão hidrófilo, saturado de água destilada esterilizada, que se cobriu com papel de filtro. Adicionou-se água destilada esterilizada sempre que necessário, para assegurar uma elevada humidade no interior das placas. Estas foram mantidas numa câmara de crescimento à temperatura de 18±1 °C e um fotoperíodo de 16 h, até à formação das apotecas.

3.4. Identificação molecular de *S. sclerotiorum*, *B. cinerea* e *B. lactucae*, em alfaces contaminadas, por reacção em cadeia da polimerase (PCR)

3.4.1. Extracção de DNA total

Para a extracção de DNA do material vegetal de campo infectado, e inoculado artificialmente, com *S. sclerotiorum*, *B. cinerea* e *B. lactucae*, utilizou-se uma adaptação do protocolo desenvolvido por Doyle e Doyle (1990), para extracção de DNA total, que se detalha no Anexo 3. Todo o material e utensílios utilizados na extracção de DNA foram previamente esterilizados.

3.4.2. Quantificação de DNA extraído

A quantificação e avaliação da qualidade do DNA extraído foram efectuadas num espectrofotómetro UV (Ultravioleta), através da medição da absorvância a 230 nm, 260 nm e 280 nm, segundo Sauer *et al.* (1998). O espectrofotómetro mede a concentração de DNA na absorvância de 260 nm. As leituras de 280 nm e 230 nm dão uma ideia sobre a concentração de proteínas e a concentração de polissacáridos, respectivamente.

Para a quantificação de DNA no espectrofotómetro procedeu-se a uma diluição 1:50 da amostra de DNA extraído com água ultra pura (água destilada, esterilizada e filtrada, por um filtro de 0,20 µm numa câmara de fluxo laminar). A calibração do aparelho foi realizada com uma diluição 1:50 de TE com água ultra pura.

A quantidade de DNA ($\mu\text{g/ml}$) na amostra foi calculada de acordo com a seguinte fórmula de conversão: $\text{OD} \times \text{AO} \times \text{FDI}$, em que OD é a absorvância ou densidade óptica medida a 260 nm, AO é a absorvância óptica do DNA ($50 \mu\text{g/ml}$) e FDI é o factor de diluição.

O DNA extraído foi também quantificado por electroforese em gel de agarose a 1,2 % (Anexo 2), corado com brometo de etídio (EtBr), com tampão TAE 1x, por comparação com o marcador λ DNA/EcoRI+HindIII (500 ng), num transiluminador UV.

3.4.3. Reacções de ampliação por PCR

Para o desenho dos primers utilizaram-se as sequências de *S. sclerotiorum* e *S. minor* disponíveis na base de dados GenBank, no site da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), à data de 17/04/2008, que foram trasladadas e comparadas recorrendo ao software CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), no site da EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk>), tendo sido analisadas as zonas conservadas.

Para o patogénio *S. sclerotiorum* desenhou-se, manualmente, um par de primers (SSM-fwd e SSM-rev) devido à inexistência de primers específicos e inequívocos para esta espécie: o primer forward emparelha na região do rDNA 18S e o primer reverse na região do rDNA 28S, ampliando o rDNA desde a extremidade 3' do gene 18S até à extremidade 5' do gene 28S, incluindo o gene 5,8S e as duas regiões espaçadoras ITS. Utilizou-se ainda outro par de primers desenhado por Freeman *et al.* (2002), considerado, pelos autores, específico para *S. sclerotiorum* (SSFWD e SSREV).

Para o agente patogénico *S. minor* desenhou-se um par de primers (SM-fwd e SM-rev) utilizando o software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Para o patogénio *B. lactucae* utilizou-se um par de primers desenhados por Mota (comunicação pessoal), considerado específico para o míldio da alface (Br-fwd e Br-rev). Para controlar a qualidade do DNA extraído, nas reacções de PCR, utilizou-se um par de primers, 18S-fwd e 18S-rev, que ampliam uma sequência de DNA dos genes ribossomais de alface, com cerca de 450 bp (Mota, comunicação pessoal). As sequências dos cinco pares de primers referidos encontram-se no Quadro 3.

Os primers, entregues liofilizados, foram dissolvidos em TE pH8,0 para uma concentração stock de 1 mM, e para uma diluição de trabalho de 10 μM com água ultra pura. A temperatura de desnaturação (T_m) foi calculada considerando 2 °C por cada A ou T, e 4 °C por cada G ou C. A temperatura de emparelhamento dos primers deve ser menos 2 °C do que a T_m calculada. Optou-se por fazer as reacções de PCR com uma temperatura de emparelhamento de 60 °C para os vários primers.

Quadro 3 - Primers utilizados para identificação diferencial das sequências de *S. sclerotiorum*, *S. minor*, *B. lactucae* e alface.

Designação do primer	Tamanho	Sequência	Tm (°C)
SSM-fwd	21 nt	5' AGGTGAACCTGCGGAAGGATC 3'	66
SSM-rev	21 nt	5' ATCCCTACCTGATCCGAGGTC 3'	66
SSFWD	21 nt	5' GCTCTTCGGGGCCTTGTATGC 3'	68
SSREV	23 nt	5' GACATGGACTCAATACCAAGCTG 3'	68
SM-fwd	20 nt	5' GGAACATACGAGCGGTCTCT 3'	62
SM-rev	20 nt	5' GGCTCTTGGACATTGCTCTC 3'	62
Br-fwd	23 nt	5' GCTCAAAAATCATGGTGTACTG 3'	64
Br-rev	21 nt	5' GACTGGCTACGAATGACTTCC 3'	64
18S-fwd	22 nt	5' GATAAAAGGTTCGACGCGGACTC 3'	68
18S-rev	22 nt	5' GACCCAACCCAAGGTCCAATA 3'	68

Na preparação da mistura de reacção foram utilizados os pares de primers anteriormente referidos.

Cada reacção de ampliação foi realizada num volume final de 25 µl em tubos tipo eppendorf de 500 µl, contendo Tampão NH₄ 1x, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTPs, 0,2 µM de cada primer, e 0,5 U Taq DNA polimerase.

As reacções de ampliação decorreram num termociclador Biometra UNO-Thermoblock, com tampa aquecida. Os ciclos incluem um passo de desnaturação inicial de DNA durante 5 minutos a 94 °C, seguindo-se 35 ciclos de desnaturação de 45 segundos a 94 °C, o emparelhamento dos primers durante 1 minuto a 60 °C, e um período de extensão de 1 minuto e 30 segundos a 72 °C, com um passo de extensão final que decorre a 72 °C durante 10 minutos. No final da reacção os tubos com as amostras foram conservados a 4 °C até à observação dos produtos de ampliação.

3.4.4. Observação de produtos de PCR

10 µl de produto de PCR foram separados por electroforese em gel de agarose a 2 % (Anexo 2), com tampão TAE 1x, tendo sido usado o marcador 100 bp DNA Ladder (500 ng). O gel foi corado com EtBr e visualizado com luz UV.

3.4.5. Clonagem de produtos de PCR e transformação

A clonagem do produto de PCR foi realizada através de uma adaptação do kit “TA Cloning[®] Dual Promoter (pCR[®]II)” (Invitrogen).

Na reacção de ligação foram utilizados entre 20 a 40 ng de produto de PCR, tampão 1x Buffer T4 DNA Ligase, 2,5 U de enzima T4 DNA Ligase e 50 ng de vector pCRII, colocados em tubos de 500 µl.

O vector pCRII com 3 948 bp, e com Amp^r e Kan^r, contém o promotor *lac* e o gene *lacZ* interrompido pelos múltiplos locais de clonagem, fornecendo assim α -complementação para a selecção da cor azul/branco das células recombinantes. Incubou-se a reacção de ligação a 22 °C, durante 18 h, após as quais se procedeu à desnaturação da enzima, colocando os tubos com a reacção a 65 °C, durante 15 minutos. A reacção de ligação foi conservada a -20 °C até ser utilizada na transformação das células competentes.

Na transformação das células competentes realizou-se uma adaptação do kit “TA Cloning[®] Dual Promoter (pCR[®]II)” (Invitrogen), descrita no Anexo 5, utilizando-se a bactéria *E. coli* (*Escherichia coli*) INV α F'. Esta estirpe permite a α -complementação com o N-terminal da β -galactosidase codificada no vector pCRII pelo gene *lacZ*.

3.4.6. Crivagem de colónias recombinantes

Seleccionaram-se as colónias recombinantes, de cor branca, e procedeu-se à inoculação de culturas bacterianas de pequena escala (“minipreps”), segundo uma adaptação do protocolo de Sambrook *et al.* (1989), para que as bactérias (*E. coli*) se repliquem e repliquem também o plasmídeo, vector pCRII (Anexo 6).

A extracção e purificação de DNA plasmidico com o fragmento clonado proveniente de culturas de *E. coli*, foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Sambrook *et al.* (1989) (Anexo 7).

Utilizou-se o DNA plasmidico purificado numa reacção de PCR, com primers específicos para o vector, M13 primer reverse e T7 primer forward, cujas sequências se encontram no Quadro 4.

Quadro 4 - Primers do vector pCRII.

Designação do primer	Vector	Tamanho	Sequência	Tm (°C)
T7SEQ	pCRII	21 nt	5' ACTAAAGGGAACAAAAGCTGG 3'	60
M13pUC-48rev	pCRII	24 nt	5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3'	78

3.4.7. Sequenciação

Antes de se realizar a sequenciação é necessário fazer a purificação dos produtos de PCR. Para isso, utilizou-se o kit “QIAquick® PCR Purification” (QIAGEN), segundo as instruções do fabricante (Anexo 4), tendo sido realizada uma reacção de PCR num volume final de 100 µl.

Este protocolo é utilizado para purificar fragmentos de DNA de reacções de PCR, onde os fragmentos na ordem dos 100 bp a 10 kb são purificados dos primers, nucleótidos, polimerases, e sais de reacções enzimáticas anteriores, usando colunas ‘spin’ QIAquick numa microcentrifuga. A sequenciação do fragmento obtido foi realizada na empresa STAB VIDA (Oeiras) de acordo com o método de Sanger *et al.* (1977). Foi feita a sequenciação de uma cadeia de DNA, utilizando o primer T7 fwd para sequenciação da cadeia 3' – 5'. O software Chromas 1.45 foi utilizado para visualização dos cromatogramas.

3.4.8. Análise de sequências

A análise de sequências (alinhamentos, reunião de sequências, traduções) foi realizada utilizando os softwares CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), e JAVASCRIPT (<http://www.ualberta.ca/~stothard/javascript/index.html>). As bases de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) foram utilizadas para identificação de homologias entre sequências, usando os algoritmos do BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

A pesquisa de locais de restrição nas sequências identificadas foi realizada utilizando o software RESTRICTIONMAPPER (<http://www.restrictionmapper.org/>).

3.4.9. Digestão com endonucleases de restrição

Amostras de 10 µl de produtos de ampliação foram digeridas com duas endonucleases de restrição: RsaI, que reconhece a sequência GTAC, e HindIII, que reconhece a sequência AAGCTT. Para cada conjunto de amostras e enzima foi preparada uma mistura de digestão com 8 U de enzima e Tampão

1x respectivo, num volume de reacção de 12 μ l. Incubou-se a mistura durante 1h e 30 minutos a 37 °C, segundo as condições do fabricante. Após a digestão enzimática as amostras foram conservadas a 4 °C até à separação por electroforese de 12 μ l dos produtos de digestão, realizada como em 3.4.4.

4. Resultados

4.1. Estabelecimento de infecções artificiais de alface com *S. sclerotiorum*, *B. cinerea* e *B. lactucae*

4.1.1. *S. sclerotiorum* como agente causal da podridão branca

A verificação dos postulados de Koch:

- 1) isolamento do agente patogénico em cultura pura a partir de material de campo
- 2) germinação carpogénica dos esclerotos, onde se verificou a formação de apotecas características desta espécie, isto é, apresentando uma coloração castanha, estipes longas e forma de trompete (Figura 13)
- 3) inoculação de alfaces com *S. sclerotiorum*, verificando-se a ocorrência de sintomas e sinais característicos da podridão branca da alface (Figura 14 e Figura 15)
- 4) observação de características do patogénio reisolado em cultura pura idênticas às observadas no isolado

permitiu concluir que o isolado de *S. sclerotiorum* em estudo é patogénico e é o agente causal da podridão branca da alface.



Figura 13 – Germinação carpogénica de esclerotos de *S. sclerotiorum*.



Figura 14 – Alfaces com sintomas de *S. sclerotiorum*, apresentando murchidão nas folhas basais.



Figura 15 – Alfaces com sintomas e sinais de *S. sclerotiorum*, apresentando podridão húmida e micélio branco no colo da planta.

4.1.2. Inoculações artificiais de alface com *B. cinerea* e *B. lactucae*

O método utilizado para as inoculações artificiais de alfaces com *B. cinerea* e *B. lactucae* permitiu a reprodução dos sintomas de *B. cinerea* (Figura 16) e *B. lactucae* (Figura 17).



Figura 16 – Alfaces com sintomas e sinais de *B. cinerea*, apresentando murchidão e esporulação cinzenta nas folhas.



Figura 17 – Alfaces com sintomas e sinais de *B. lactucae*, apresentando manchas amarelas e esporulação branca na página superior das folhas.

4.2. Identificação das regiões ITS de *S. sclerotiorum*

A ampliação da amostra SSM1 (Quadro 1) com os primers SSM e SS (Quadro 3), resultou em fragmentos com cerca de 500 bp (Quadro 5) e 270 bp, respectivamente. Esses fragmentos foram sequenciados obtendo-se, respectivamente, as seguintes sequências:

5' AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGT
 GTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCTCTTCGGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATATCAA
 AACTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTGG
 TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
 ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTT
 CAACCCTCAAGCTCAGCTTGGTATTGAGTCCATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGG
 CGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCAAAAACCC
 CAATTTCTATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT 3'

5' GCTCTTCGGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATATCAAACTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTA
 CTATATAATAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
 AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC
 CCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCAGCTTGGTATTGA
GTCCATGTC 3'

Os nucleótidos sublinhados correspondem aos primers SSM e SS, forward na extremidade 5' e reverse na extremidade 3' das sequências, respectivamente.

A análise com software BLAST sugere que ambas as sequências são de *S. sclerotiorum*, mostrando homologia de 100 % quando alinhadas com software CLUSTALW2. A dimensão do fragmento obtido com os primers SS é cerca de metade da do fragmento obtido com os primers SSM. A sequência obtida com os primers SSM é idêntica às sequências disponíveis na base de dados GenBank para *S. sclerotiorum*, onde se identificaram as regiões conservadas dos genes ribossomais (18S, 5,8S e 28S) e as regiões ITS. Verifica-se que o fragmento obtido com os primers SS apenas contém parte da região ITS1, a região 5,8S, e parte da região ITS2. Utilizaram-se os primers SSM, em algumas das reacções de PCR realizadas no presente trabalho, por permitirem obter um fragmento de maior dimensão, conferindo maior especificidade na detecção molecular por reacção de PCR do que os primers SS.

A ampliação controlo com os primers 18S (Quadro 3), originando um fragmento com cerca de 450 bp, revelou que o extracto de DNA utilizado não apresentava inibidores da enzima Taq DNA polimerase. Após sequenciação deste fragmento de DNA e sua análise (Anexo 8), verificou-se que não existem sequências homólogas de alface na base de dados GenBank, ocorrendo homologia com muitos outros organismos.

4.3. Identificação das regiões ITS de *S. minor*

Na ampliação da amostra SSM1 com os primers SM (Quadro 3), que hibridam na região dos genes ribossomais de *S. minor*, não surgiu nenhum fragmento, mesmo aplicando uma gama variada de quantidades de DNA e temperaturas de emparelhamento. Como a utilização destes primers não permitiu a detecção de *S. minor* na amostra testada, a fonte de inóculo, estes primers não foram incluídos nos estudos posteriores de estabelecimento de limiar de detecção e reacção multiplex.

4.4. Limiar de detecção de *S. sclerotiorum*

O limiar de detecção de *S. sclerotiorum* na amostra SSM1(B), ampliada com os primers SSM, foi na ordem dos $1,25 \times 10^{-3}$ ng de DNA, em alfaces aparentemente saudáveis mas já infectadas com aquele patógeno.

Na reacção de PCR com 4 ng, 0,08 ng, 0,04 ng, 0,02 ng, 0,0025 ng, 0,00125 ng de DNA de alfaces infectadas, mas sem sintomas ou sinais da doença, verificou-se a presença de fragmentos em todos os casos. Com os primers 18S não se verificou o efeito de diluição, no entanto, com os primers SSM esse efeito é perfeitamente visível, observando-se bandas menos intensas quando a quantidade de DNA na reacção é menor (Figura 18).

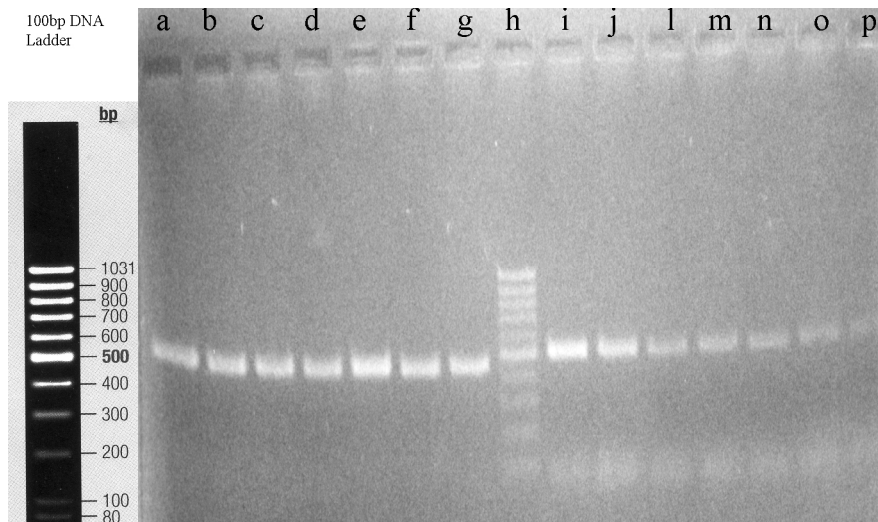


Figura 18 – Limiar de detecção de *S. sclerotiorum* em alfaces contaminadas: reacção de PCR com os primers 18S utilizando 4 ng (a), 0,08 ng (b), 0,004 ng (c), 0,02 ng (d, e), 0,0025 ng (f) e 0,00125 ng (g) de DNA, e com os primers SSM utilizando as mesmas quantidades de DNA (i, j, l, m, n, o, p), comparando com 500 ng de marcador 100 bp DNA Ladder (h).

4.5. Digestão enzimática de produtos de ampliação

Obteve-se um fragmento com cerca de 500 bp, ampliado com os primers SSM, na amostra SSM1, cuja sequenciação e análise sugeriu ser de *S. sclerotiorum*.

A ampliação da amostra Br2(F) com os primers SSM originou um fragmento com cerca de 530 bp (Quadro 5). A análise da sequência ampliada sugere tratar-se de um fragmento de *Alternaria* sp., indicando que estes primers podem ampliar fragmentos de outros patógenos. No entanto, os primers SSM não originaram qualquer fragmento que apresentasse homologia com sequências de *B. lactucae*. O alinhamento da sequência correspondente ao patógeno *Alternaria* sp. com as obtidas para *S. sclerotiorum* revelou 75 % de homologia entre elas, sendo esta homologia maior nas zonas conservadas dos genes ribossomais e menor nas zonas ITS. Assim, para distinguir as sequências destes dois organismos, procuraram-se enzimas de restrição que cortem os dois fragmentos, correspondentes aos patógenos *Alternaria* sp. e *S. sclerotiorum*, em zonas específicas das regiões ITS, de modo a originar fragmentos de dimensões diferentes.

Quadro 5 – Primers utilizados, dimensão, homologia ao nível nucleotídico e probabilidade Blast dos fragmentos obtidos nas amostras SSM1, SSM2, Br2, Br3 e Bo1.

Amostra (código)	Fragmento	Primers	Tamanho do fragmento sequenciado (pb)	Homologia BLAST	Acesso	Prob. (E value)
SSM1	SSM_10	SSM	500	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> strain 05WM33	EU082466	0.0
SSM2	SSM_1	SSM	499	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> strain ATCC MYA-4521	FJ810516	0.0
Br2	Br_9	SSM	530	<i>Alternaria tenuissima</i>	EF364096	0.0
Bo1	Bo_2	SSM	499	<i>Botrytis fabae</i> strain BroadbeanBC-25	EU563125	0.0
Bo2	MBBr_2	SSM	499	<i>Botrytis fabae</i> isolate 2465	EU821471	1e-173
Bo2	MBBo_13	SSM	498	<i>Botrytis fabae</i> isolate 2465	EU821471	0.0
SSM1	Br_1	Br	605	<i>Bremia lactucae</i>	DQ665664	0.0
Br2	SpB11	Br	605	<i>Bremia lactucae</i>	DQ665664	0.0
Br3	Br_8	Br	605	<i>Bremia lactucae</i>	DQ665664	0.0
Br3	Br_12	Br	606	<i>Bremia lactucae</i> voucher SMK19108	DQ235796	0.0
Br4	MBBo_10	Br	598	<i>Bremia lactucae</i> voucher SMK19108	DQ235796	0.0
Br4	MBBo_11	Br	629	<i>Bremia lactucae</i> voucher SMK19108	DQ235796	0.0
Br4	MBBo_6	Br	604	<i>Bremia lactucae</i> voucher SMK19108	DQ235796	0.0
Br4	MBBr_18	Br	605	<i>Bremia lactucae</i>	DQ665664	0.0

A análise de restrição (Anexo 9) dos fragmentos obtidos de *S. sclerotiorum* e *Alternaria* sp. com os primers SSM, revelou que a enzima RsaI permite a distinção entre os dois agentes patogênicos (Quadro 7), pois corta os fragmentos de *S. sclerotiorum* em dois fragmentos com tamanhos distintos (Quadro 6) quando observados num gel de agarose (Figura 19 b, Figura 20 a, b, e Figura 21 a, b, c, d, e, f), e corta o fragmento de *Alternaria* sp. em duas posições resultando num padrão electroforético com três fragmentos de dimensões diferentes (Quadro 6) (Figura 19 c e Figura 20 f).

Na ampliação da amostra Br3 (Quadro 2), variantes (B), (A) e (F), com os primers SSM, em que se utilizaram duas quantidades diferentes de DNA, obtiveram-se fragmentos com cerca de 500 bp sugerindo a presença de *S. sclerotiorum* e/ou *Alternaria* sp.. Verificou-se que as variantes (B) e (A) apresentam bandas mais intensas quando se utiliza o dobro da quantidade de DNA, enquanto que a variante (F) apresenta bandas menos intensas com o dobro da quantidade de DNA. O mesmo aconteceu com Br2(F).

Os primers SSM ampliaram fragmentos com cerca de 500 bp (Quadro 5) na amostra Bo1 (Quadro 2), nas variantes (B), (A) e (F), e na amostra SSM2(F) (Quadro 1), e a análise das sequências obtidas (Anexo 8) na amostra Bo1 sugere que correspondem a fragmentos de *Botrytis fabae* ou *Botryotinia fuckeliana*, surgindo uma homologia de 98 % com *S. sclerotiorum*. Essa homologia é menor nas regiões espaçadoras ITS e maior nas zonas dos genes ribossomais. Para distinguir os genes dos dois agentes patogênicos em causa, procuraram-se enzimas de restrição que dêem origem a padrões de digestão distintos ao cortarem os produtos ampliados das duas amostras. O alinhamento das sequências obtidas da amostra Bo1 com sequências de *B. cinerea*, retiradas da base de dados GenBank, revelou 100 % de homologia entre elas, ocorrendo uma diferença de tamanho em cerca de 23 bp. Assim, considerou-se que o fragmento sequenciado pertence à espécie *B. cinerea*, existindo isolados de *B. cinerea* com 100 % de homologia com *S. sclerotiorum* neste fragmento, e isolados em que isto não acontece.

Na análise de restrição (Anexo 9) dos fragmentos obtidos de *S. sclerotiorum* da amostra SSM2(F) e *B. cinerea* da amostra Bo1, verificou-se que a HindIII permite distinguir *S. sclerotiorum* de alguns isolados de *B. cinerea* (Quadro 7), já que não corta o fragmento de *S. sclerotiorum* (Quadro 6) e corta o fragmento de *B. cinerea* num local de restrição originando dois fragmentos com tamanhos distintos (Quadro 6).

A digestão enzimática dos fragmentos ampliados de *S. sclerotiorum* e *B. cinerea*, originou um fragmento de 500 bp que deverá corresponder a *S. sclerotiorum*, em que o fragmento não foi cortado, e dois fragmentos mais pequenos com cerca de 160 bp e 340 bp, correspondendo ao corte esperado em *B. cinerea* (Quadro 6) (Figura 19 d, e, e Figura 20 i, j, l).

A enzima de restrição HindIII origina no fragmento sequenciado de *Alternaria* sp. dois fragmentos de dimensão semelhante aos obtidos no fragmento de *B. cinerea* (Quadro 6), o que impede a distinção entre estes fragmentos destes dois organismos (Figura 20 l, o).

Quadro 6 – Dimensão dos fragmentos obtidos após digestão enzimática de produtos de PCR com as enzimas de restrição RsaI e HindIII, das regiões ITS sequenciadas de *S. sclerotiorum*, *B. lactucae*, *B. cinerea* e *Alternaria* sp..

Enzima restrição	ITS <i>S. sclerotiorum</i>	ITS <i>B. lactucae</i>	ITS <i>B. cinerea</i>	ITS <i>Alternaria</i> sp.
RsaI	158 bp/342 bp 157 bp/342 bp	166 bp/439 bp 166 bp/440 bp 8 bp/166 bp/431 bp 160 bp/438 bp 191 bp/438 bp 165 bp/439 bp	156 bp/343 bp 153 bp/346 bp 155 bp/343 bp	98 bp/181 bp/251 bp
HindIII	500 bp 499 bp	605 bp 285 bp/321 bp 598 bp 629 bp 284 bp/320 bp	161 bp/338 bp 499 bp 498 bp	174 bp/356 bp

A digestão enzimática com RsaI dos produtos de PCR obtidos das amostras Br3(F) e SSM2(F) com os primers SSM, originou três fragmentos com 98 bp, 181 bp e 251 bp na amostra Br3(F), sugerindo corresponder ao patógeno *Alternaria* sp., e dois fragmentos de 158 bp e 342 bp na amostra SSM2(F), sugerindo ser *S. sclerotiorum*, respectivamente. Os produtos de PCR obtidos das amostras Bo1(F) e SSM2(F), com os primers SSM, foram digeridos com a enzima de restrição HindIII obtendo-se dois fragmentos com 161 bp e 338 bp na amostra Bo1(F), o que sugere corresponder ao patógeno *B. cinerea*, e um fragmento de 500 bp (não cortado) que deverá corresponder ao patógeno *S. sclerotiorum* (Quadro 6) (Figura 19). Estes resultados, comparados com os produtos de PCR das mesmas amostras não digeridas (Figura 19), evidenciam que estas enzimas permitem distinguir os vários fragmentos dos patógenos em causa (Quadro 7).

Na digestão do produto de PCR da amostra Br3(F) com a enzima de restrição RsaI verificou-se uma ligeira inibição das actividades enzimáticas.

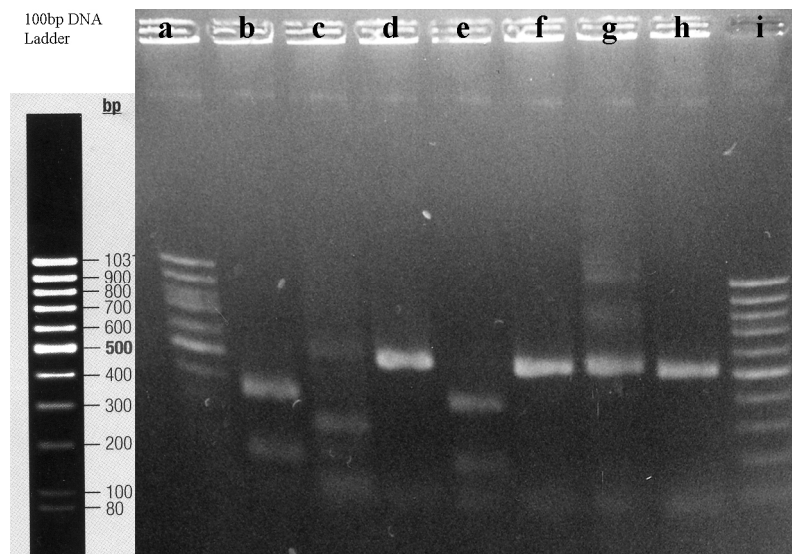


Figura 19 – Digestão enzimática do produto de PCR das amostras SSM2(F) e Br3(F), ampliado com os primers SSM, utilizando a enzima de restrição RsaI (b, c), e do produto de PCR das amostras SSM2(F) e Bo1(F), ampliado com os primers SSM, utilizando a enzima de restrição HindIII (d, e), comparando com o produto de PCR das amostras SSM2(F), Br3(F) e Bo1(F) não digerido (f, g, h), e com 500 ng de marcador 100 bp DNA Ladder (a, i).

Quadro 7 – Distinção dos agentes patogênicos presentes nas várias amostras através da digestão enzimática dos produtos de PCR, ampliados com os primers SSM, com as enzimas RsaI e HindIII.

Amostra	RsaI	HindIII
SSM2	<i>S. sclerotiorum</i>	
Br2	<i>Alternaria</i> sp.	
Br4	<i>Alternaria</i> sp.	
Bo1		<i>B. cinerea</i>

A digestão enzimática com RsaI de alguns dos fragmentos sequenciados, e sua comparação com os fragmentos não digeridos (Figura 20), permitiu distinguir *S. sclerotiorum* de *Alternaria* sp., mas não de *B. cinerea*, como era esperado (Quadro 7). Com a enzima HindIII distinguiu-se *S. sclerotiorum* de *Alternaria* sp. e de apenas alguns isolados de *B. cinerea* (Quadro 7). A digestão enzimática não funcionou com um dos fragmentos de *Alternaria* sp. (g, p), mas no fragmento não digerido também se observou algum arrastamento (x), indicando que existe algum factor de inibição na reacção, o que se reflectiu na sequência, apresentando o fragmento apenas 198 bp (Anexo 8).

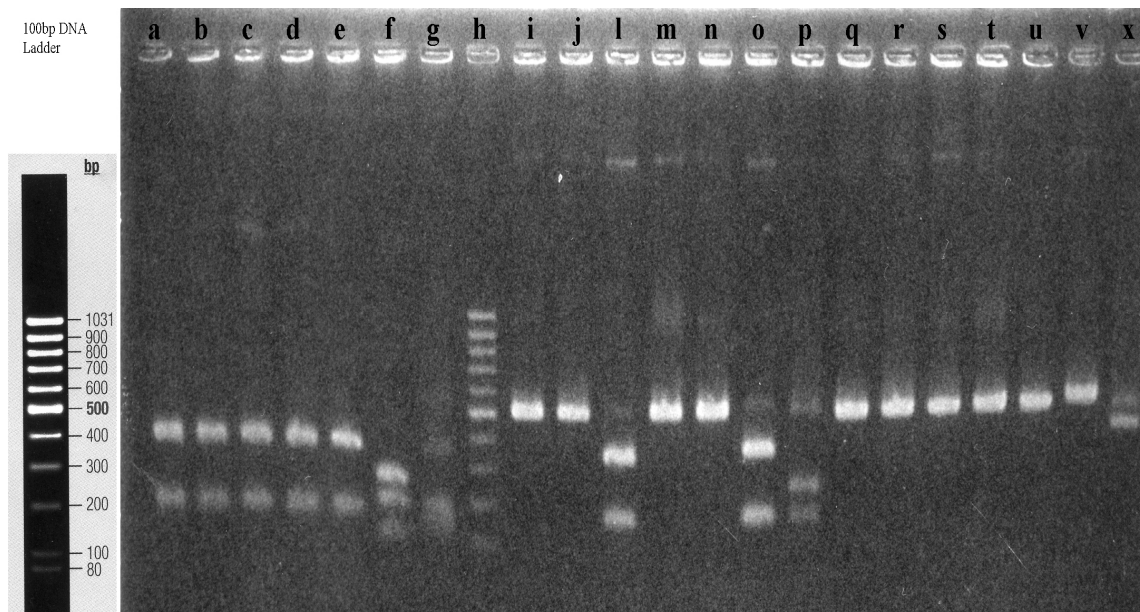


Figura 20 – Digestão enzimática com *RsaI* de produtos de PCR ampliados com os primers SSM de *S. sclerotiorum* (a, b), *B. cinerea* (c, d, e) e *Alternaria* sp. (f, g), e com *HindIII* de produtos de PCR ampliados com os primers SSM de *S. sclerotiorum* (i, j), *B. cinerea* (l, m, n) e *Alternaria* sp. (o, p), comparando com os produtos de PCR não digeridos (q, r, s, t, u, v, x) e com 500 ng de marcador 100 bp DNA Ladder (h).

A ampliação da amostra SSM1(A) realizada com os primers Br (Quadro 3) originou um fragmento com cerca de 600 bp, sugerindo que o míldio também está presente nesta amostra (Quadro 5). A banda observada no gel de agarose, correspondente a este fragmento, apresentou uma fraca intensidade, recorrendo-se à reampliação do produto de PCR para posterior sequenciação. A análise da sequência obtida (Anexo 8) sugere tratar-se de um fragmento muito específico de *B. lactucae*. A comparação da sequência obtida de *B. lactucae* com as sequências obtidas para *S. sclerotiorum*, revela que não ocorre qualquer homologia entre elas, não sendo previsível que os primers SSM ampliem *B. lactucae*.

Um resultado semelhante foi obtido na amostra Br2(F) (Quadro 2) com os primers Br (Anexo 8) (Quadro 5). O fragmento obtido apresenta 98 % de homologia com o fragmento obtido com os mesmos primers na amostra SSM1(A). Fazendo o alinhamento com as sequências obtidas para *S. sclerotiorum* não se verificou qualquer homologia entre elas, demonstrando que os fragmentos dos dois patógenos são muito diferentes.

Da ampliação da amostra Br3 (Quadro 2), variantes (B), (A) e (F), com os primers Br, utilizando as mesmas quantidades de DNA como para os primers SSM, resultaram fragmentos com cerca de 600 bp (Quadro 5) em todas as variantes efectuadas, sugerindo a presença de míldio em todas elas, com maior

intensidade na amostra Br3(F). Também com os primers Br se verificou que as variantes (B) e (A) apresentam bandas mais intensas quando se utiliza o dobro da quantidade de DNA, enquanto que a variante (F) apresenta bandas menos intensas com o dobro da quantidade de DNA.

Embora as sequências de *B. lactucae* sejam obtidas com os primers Br, efectuou-se a digestão enzimática dos produtos de PCR ampliados por estes primers, para verificar quantos fragmentos surgem e qual a sua dimensão, pois são também utilizados nas reacções de PCR multiplex.

Na digestão com *RsaI* (Quadro 6) do produto ampliado obtido nas amostras SSM2(F) e Br3(F) com os primers SSM e Br, respectivamente, surgiu uma banda com cerca de 450 bp, que deve corresponder a um fragmento de *B. lactucae*, outra banda na ordem de 350 bp, que deverá corresponder a um fragmento de *S. sclerotiorum* e/ou *B. cinerea*, e outra banda com cerca de 150 bp, provavelmente correspondente a um fragmento de *B. lactucae* e/ou *S. sclerotiorum* e/ou *B. cinerea*. Conclui-se que o patógeno *Alternaria* sp. não deverá estar presente pois não surgiu um fragmento na ordem de 250 bp (Figura 21 a-m).

Na digestão com *HindIII* (Quadro 6) surgiu uma banda com cerca de 500 bp, devendo corresponder a um fragmento de *S. sclerotiorum*, que não é cortado por esta enzima (Anexo 9), e outra banda com cerca de 600 bp, que deve corresponder a um fragmento de *B. lactucae*, que também não é cortado por esta enzima (Anexo 9) (Figura 20 u, v, x, e Figura 21 o-x). Conclui-se que as amostras analisadas não deverão conter *Alternaria* sp. e *B. cinerea*, pois não surgiram fragmentos com cerca de 170 bp e 350 bp (Figura 21). Assim, na amostra SSM2(F) só deverá estar presente *S. sclerotiorum*, e na amostra Br3(F) só deverá haver *B. lactucae*.

A análise das sequências obtidas (Anexo 8) sugere que o fragmento da amostra SSM2(F) corresponde a um fragmento de *S. sclerotiorum*, que apresenta 100 % de homologia com a sequência obtida na amostra SSM1, e que o fragmento da amostra Br3(F) corresponde a um fragmento específico de *B. lactucae*.

Na ampliação das amostras Br4(B), Br4(F), Bo2(B) e Bo2(F), com os primers SSM e Br, observaram-se bandas nas amostras Br4 com os primers SSM, detectando provavelmente *Alternaria* sp. e/ou *B. cinerea*, e nas amostras Bo2, detectando possivelmente *B. cinerea*. Com os primers Br surgiram bandas em todas as amostras detectando provavelmente *B. lactucae*. A sequenciação destes fragmentos e a análise das sequências (Anexo 8), sugeriu que os fragmentos obtidos com os primers Br correspondem de facto a fragmentos muito específicos de *B. lactucae*, enquanto que os fragmentos obtidos com os primers SSM podem corresponder a fragmentos de *Alternaria* sp. ou *Botrytis fabae* ou *Botryotinia fuckeliana*, considerando-se, nos dois últimos casos, corresponder a fragmentos de *B. cinerea* pelas razões apresentadas anteriormente.

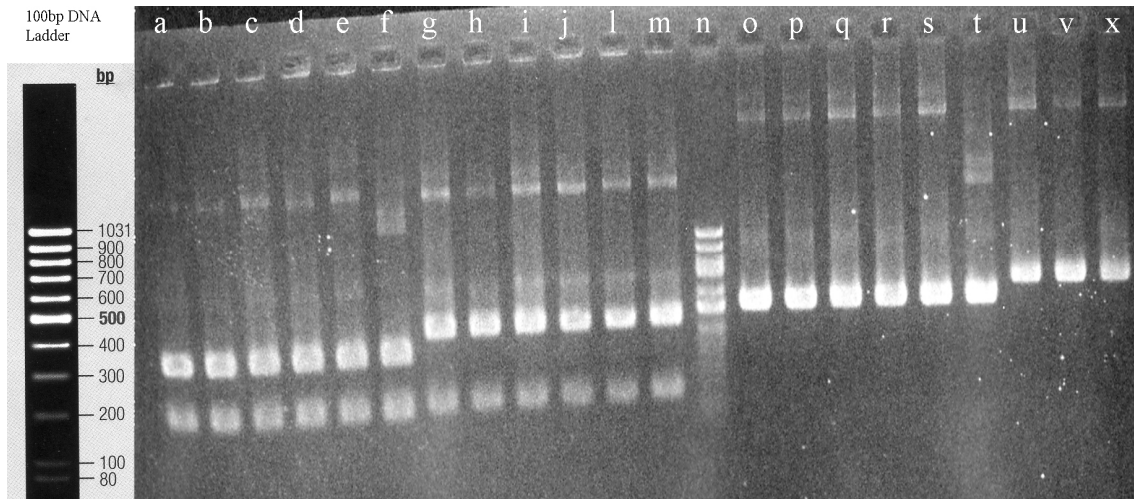


Figura 21 – Digestão enzimática do DNA plasmídico de colónias transformadas em *E. coli* das amostras SSM2(F) ampliado com os primers SSM, com RsaI (a, b, c, d, e, f) e HindIII (o, p, q, r, s, t), e de Br3(F) com os primers Br, com RsaI (g, h, i, j, l, m) e HindIII (u, v, x), comparando com 500 ng de marcador 100 bp DNA Ladder (n).

Verificou-se que a enzima de restrição HindIII não corta dois dos fragmentos sequenciados de *B. cinerea* (Quadro 6), obtidos na amostra Bo2 (Quadro 2) com os primers SSM, ficando com cerca de 500 bp, tamanho idêntico ao obtido para os fragmentos de *S. sclerotiorum* com esta enzima, impedindo a diferenciação entre estes fragmentos destes dois patogénios (Figura 20 i, j, m, n). As sequências obtidas em diferentes colónias das amostras Br3 e Br4 ampliadas com os primers Br (Anexo 9) revelaram a presença de fragmentos com mapas de restrição distintos, pelo que o padrão de digestão com a enzima HindIII não é constante para os diferentes isolados de *B. lactucae* (Quadro 6).

4.6. Reacções de PCR multiplex

As reacções de PCR multiplex efectuadas com as amostras SSM2(F), Br3(F) e Bo1(F), e com os primers SSM e Br em simultâneo, realizadas em paralelo com a ampliação das amostras utilizando os primers individualizados como controlo positivo, resultaram em fragmentos bem visíveis verificando-se que não ocorre a inibição dos primers. Com os primers SSM surgiram bandas, com cerca de 500 bp, nas três amostras ampliadas, detectando-se possivelmente *S. sclerotiorum* na amostra SSM2(F) e, provavelmente, *Alternaria* sp. na Br3(F) e/ou *B. cinerea* na Bo1(F), como sucedeu em reacções de PCR anteriormente realizadas e nas quais se realizou a sequenciação dos fragmentos obtidos. Com os primers Br apenas surgiu uma banda na amostra Br3(F), correspondendo, muito provavelmente, a um fragmento de *B. lactucae*, com cerca de 600 bp.

Na ampliação num multiplex da mistura de DNA das amostras SSM2(F), Br3(F) e Bo1(F), com os primers SSM e Br em simultâneo, verificou-se a presença de duas bandas intensas, com cerca de 500 bp e 600 bp, provavelmente correspondendo a fragmentos de *S. sclerotiorum* e/ou *B. cinerea* e/ou *Alternaria* sp. e *B. lactucae*, respectivamente (Figura 22).

Nas ampliações paralelas da mistura de DNA realizadas com os primers individualmente surgiu, com os primers SSM, uma banda intensa com a dimensão do fragmento de *S. sclerotiorum*, e provavelmente *B. cinerea* e/ou *Alternaria* sp., na ordem de 500 bp. Com os primers Br observou-se uma banda bem visível com o tamanho do fragmento de *B. lactucae*, cerca de 600 bp.

A sequenciação dos fragmentos de SSM2(F), obtidos com os primers SSM, e de Br3(F), obtidos com os primers Br, para tentar confirmar os organismos em causa, *S. sclerotiorum* e *B. lactucae*, respectivamente, sugeriu que o fragmento de SSM2(F) deve corresponder a um fragmento de *S. sclerotiorum*, e o fragmento de Br3(F) a um fragmento específico de *B. lactucae*.

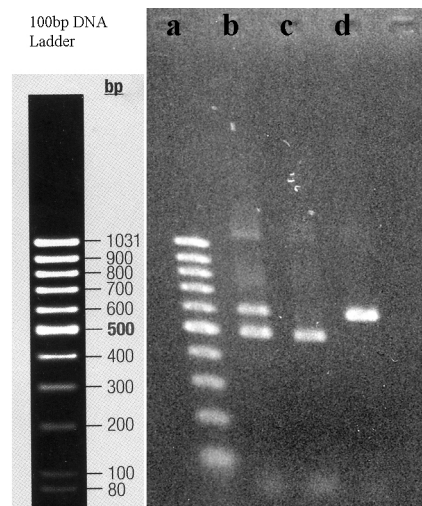


Figura 22 – Reacção de PCR multiplex com mistura de DNA das amostras SSM2(F), Br3(F) e Bo1(F), com os primers SSM e Br em simultâneo (b), os primers SSM (c) e os primers Br (d), comparando com 500 ng de marcador 100 bp DNA Ladder (a).

A ampliação num multiplex de uma mistura de DNA das amostras SSM2(F), Br3(F), Bo1(F) e Br2(F), utilizando os primers SSM e Br em conjunto, originou duas bandas intensas na ordem dos 600 bp e dos 500 bp, que devem corresponder a um fragmento de *B. lactucae* e de *S. sclerotiorum* e/ou *B. cinerea* e/ou *Alternaria* sp., respectivamente.

A obtenção de um padrão, na digestão enzimática dos produtos de multiplex com a enzima *RsaI* (Figura 23), semelhante ao observado na Figura 19 a-m sugere que o patógeno *Alternaria* sp. não deverá estar presente, pois não se observou nenhuma banda na ordem de 250 bp. Com a enzima *HindIII* obteve-se uma banda com cerca de 500 bp, provavelmente correspondente a um fragmento de

S. sclerotiorum não cortado, outra na ordem de 600 bp, que deve corresponder a um fragmento de *B. lactuca* não cortado, e outras duas com cerca de 350 bp e de 150 bp, que poderão corresponder a um fragmento de *B. cinerea*, pois a digestão com a enzima *RsaI* sugere que o patógeno *Alternaria* sp. não está presente nas amostras.

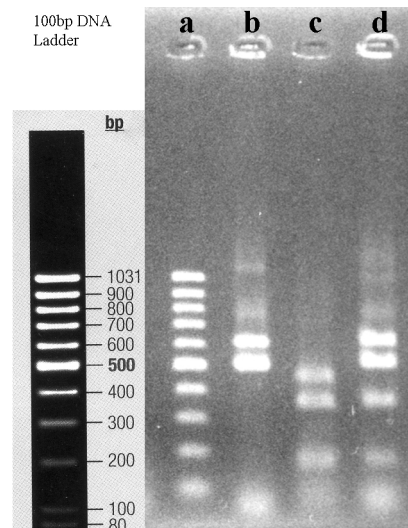


Figura 23 – Digestão enzimática dos produtos de PCR multiplex, obtidos com mistura de DNA das amostras SSM2(F), Br3(F), Bo1(F) e Br2(F), e com os primers SSM e Br em simultâneo, utilizando as enzimas de restrição *RsaI* (c) e *HindIII* (d), comparando com os produtos de PCR das amostras não digeridos (b) e com 500 ng de marcador 100 bp DNA Ladder (a).

Na ampliação num multiplex de uma mistura de DNA das amostras SSM2(F), Br3(F), Bo1(F) e Br2(F), com os primers SSM, Br e 18S em simultâneo, surgiram três bandas intensas, provavelmente correspondentes a fragmentos de DNA dos patógenos (SSM e Br) e da alface (18S), presentes nas amostras, que foram ampliados pelos três pares de primers.

5. Discussão dos resultados

Este trabalho visou a identificação de uma sequência específica de DNA de *S. sclerotiorum* facilmente ampliável por reacção de PCR; o desenvolvimento de um teste rápido, específico, reprodutível e barato, para detecção precoce da contaminação de alfaces com este agente patogénico; o rastreio de outros patogénios da alface, através da digestão enzimática de produtos de PCR com enzimas de restrição; e o desenvolvimento de uma reacção de PCR multiplex que detecte simultaneamente outros agentes patogénicos da alface.

Neste contexto, desenhou-se um par de primers, SSM, que amplia uma região dentro do DNA ribossomal, desde a extremidade 3' do gene 18S até à extremidade 5' do gene 28S, incluindo o gene 5,8S e as duas regiões ITS, e que mostrou detectar uma sequência característica de DNA de *S. sclerotiorum*, e permitiu a sua ampliação por PCR. A ampliação por reacção de PCR de uma sequência de *S. sclerotiorum*, com os primers SSM, realizada com sucesso em amostras de alface (SSM1 e SSM2), nos diferentes tipos de amostras testadas, indica que este par de primers permite detectar sequências de *S. sclerotiorum* em alfaces aparentemente sãs, mas que já se encontram infectadas com este patogénio, para além de alfaces com infecções visíveis. Essa sequência inclui uma sequência obtida com os primers SS, utilizados por Freeman *et al.* (2002), do mesmo agente patogénico. Segundo Freeman *et al.* (2002), os primers SS não ampliam DNA de outros agentes patogénicos comuns como patogénios da colza, incluindo *B. cinerea*, ampliando apenas o DNA de *Sclerotinia* sp., em particular de *S. sclerotiorum*. No presente trabalho em alface ampliaram-se sequências de *B. cinerea* com os primers SSM, que incluem a sequência ampliada pelos primers SS. Este comportamento diferente resultará provavelmente do facto dos isolados de *B. cinerea* analisados nos dois trabalhos serem diferentes. A amostra onde os primers SS foram testados estava infectada com *S. sclerotiorum* e *B. lactucae*, sugerindo que estes primers não ampliam o míldio da alface.

As sequências da região espaçadora ITS (ITS1, 5,8S rDNA, ITS2) são os alvos comuns utilizados nos métodos baseados na reacção de PCR para identificação de patogénios filamentosos. Dentro da família *Sclerotiniaceae* a região ITS é homogénea, com sequências quase idênticas, dificultando uma identificação precisa (Freeman *et al.*, 2002). Além disso, segundo Hirschhäuser e Fröhlich (2007), a falta de dados da região espaçadora intergénica, IGS, requer novos genes marcadores específicos para uma rápida identificação dos agentes patogénicos pertencentes à família *Sclerotiniaceae*. Estes autores sequenciaram e analisaram novas sequências do gene codificador da laccase2 (*lcc2*) localizadas no genoma de espécies filogeneticamente relacionadas, *S. sclerotiorum*, *S. minor*, e *Monilinia fructigena* Honey. Uma análise comparativa revela diferenças importantes no tamanho e na sequência desses genes quando comparados com o gene *lcc2* de *B. cinerea*, causadas por um número diferente de sequências de intrões. Estes resultados possibilitaram o desenvolvimento de um conjunto de primers, utilizados em reacção de PCR multiplex, para uma rápida identificação e detecção de diferentes

espécies de patogénios em amostras de campo. A aplicação desta técnica permitiu a detecção e identificação simultânea de diferentes fitopatogénios da família *Sclerotiniaceae* em material vegetal, através da utilização do par de primers específico, em que todos os patogénios demonstraram o padrão e comprimento de sequências esperado após a reacção de PCR multiplex. Estes autores pretendem propor a utilização dos genes laccase como marcadores específicos para um variado número de patogénios pertencentes à família *Sclerotiniaceae*. Nos testes de detecção molecular de *S. sclerotiorum* em alfaces desenvolvidos no presente trabalho não se utilizou o gene codificador da laccase2, pois quando os ensaios tiveram início não havia conhecimento dos resultados obtidos por aqueles autores. A reacção de PCR multiplex utilizada por Hirschhäuser e Fröhlich (2007) sugere uma base para a possibilidade de detectar populações de patogénios diferentes em simultâneo em plantas infectadas, tal como foi realizado no presente estudo em alface. Neste caso, também a reacção de PCR multiplex funcionou com sucesso na detecção de alguns agentes patogénicos da alface, utilizando primers específicos, e recorrendo-se a um esquema de digestão enzimática para discriminar os vários patogénios presentes, embora, em alguns casos, apenas se fizesse a distinção entre alguns isolados desses patogénios.

O cumprimento dos quatro postulados de Koch aplicados à fitopatologia (Tomaz, 2001), confirmou que o microrganismo isolado é responsável pela doença da podridão branca da alface. O estabelecimento de um método para inoculações artificiais de alfaces com *S. sclerotiorum*, *B. cinerea* e *B. lactucae* permitiu a obtenção de material vegetal infectado para ser usado nos testes de detecção molecular, sendo a *B. cinerea* e a *B. lactucae*, responsáveis pela podridão cinzenta da alface e míldio da alface respectivamente, utilizados como controlo negativo nos testes de detecção molecular de *S. sclerotiorum*.

Com o par de primers SM, que foi desenhado para identificar uma sequência específica de *S. minor*, nunca se conseguiu obter qualquer ampliação por reacção de PCR nas amostras testadas. Isto pode ser justificado por uma pequena quantidade de DNA do patogénio presente nas amostras, não sendo suficiente para ser detectado, ou não estar mesmo presente, ou pelo facto do inóculo deste agente patogénico, que pode estar presente nas amostras, não ser ampliável por estes primers. A justificação mais provável para o facto dos primers SM não terem funcionado deverá estar relacionada com a ausência de *S. minor* nas amostras analisadas, pois esta não foi visualmente detectada, nem depois de incubação em câmara húmida. O problema não deverá advir da qualidade do DNA extraído pois a ampliação controlo realizada com os primers 18S permitiu verificar a boa qualidade do DNA. Nesta ampliação, os fragmentos obtidos foram sempre mais intensos, quando observados num gel de electroforese, do que os obtidos com os outros pares de primers, o que se justifica, pois os primers 18S ampliam o DNA de alface que estará presente em maior quantidade nas amostras analisadas do que o DNA dos patogénios.

Embora os sintomas gerais causados pelas duas espécies de *Sclerotinia*, *S. sclerotiorum* e *S. minor*, sejam similares, uma análise mais profunda das plantas afectadas revela diferenças entre os dois agentes patogénicos (Hao e Subbarao, 2005). Como critério para distinguir as espécies *S. sclerotiorum* e *S. minor*, sendo as únicas espécies detectadas em alface no nosso país (Viegas, 2000), utilizou-se a dimensão dos esclerotos, segundo Ryder (1999), e os diferentes modos de infecção empregues pelas duas espécies para a infecção do material vegetal (Hao e Subbarao, 2005). A presença de pequenos esclerotos circulares de 0,5-2 mm de diâmetro facilmente distingue *S. minor* de *S. sclerotiorum*, que tem esclerotos grandes (Kohn, 1979; Tariq *et al.*, 1985; Ekins *et al.*, 2005). Outros aspectos incluem a extremamente rara germinação carpogénica e formação de apotecas em *S. minor* porque os esclerotos germinam miceliogenicamente (Abawi e Grogan, 1979; Kohn, 1979; Subbarao, 1998). Assim, esta espécie infecta a alface exclusivamente por micélio resultante da germinação dos esclerotos, localizados perto do sistema radicular ou do colo da planta (Ben-Yephet *et al.* 1993), infectando apenas plantas próximas umas das outras através de hifas emergentes que tocam na planta mais próxima (Ryder, 1999). Em contraste, os esclerotos de *S. sclerotiorum* têm forma irregular, medindo 2-20x3-7 mm, e cada um deles pode germinar carpogenicamente produzindo uma a várias apotecas, brancas, amarelas ou acastanhadas, que têm geralmente a forma de taça (Kohn, 1979), infectando a alface por ascósporos (Ben-Yephet *et al.*, 1993). A infecção a partir da germinação de esclerotos de *S. sclerotiorum* é similar à de *S. minor*, mas facilmente identificada pelo elevado tamanho dos esclerotos de *S. sclerotiorum* nas plantas infectadas (Hao e Subbarao, 2005). Nos ensaios realizados, os esclerotos, irregulares com mais de 2 mm de diâmetro, e as apotecas, acastanhadas em forma de taça, apontam para que o inóculo de estudo se tratasse de *S. sclerotiorum*.

De acordo com os autores Freeman *et al.* (2002), os primers SS podem ampliar a espécie *S. minor*. No presente estudo, quando se utilizaram os primers SS, não surgiu nenhuma sequência que parecesse ser de *S. minor*, por comparação com a base de dados GenBank, o que sugere que este patogénio não se encontrava a infectar as alfices analisadas, pois caso contrário teria sido detectado por aqueles primers. Para confirmação destes resultados seria necessário efectuar uma cultura pura de *S. minor*, ou ter uma amostra de alface nitidamente contaminada com este agente patogénico, de modo a funcionarem como controlo positivo.

Na determinação do limiar de detecção de *S. sclerotiorum* utilizaram-se várias quantidades de DNA da amostra de alface SSM1(B), ampliadas com os primers SSM por reacção de PCR, e os primers 18S como controlo da qualidade do DNA. A não observação do efeito de diluição da amostra com o último par de primers advém do facto da abundância dos genes ribossomais em alface ser tão elevada que, mesmo com as diluições efectuadas, ainda se encontra uma grande quantidade de DNA alvo presente. Com os primers SSM verificou-se a ampliação de uma sequência de *S. sclerotiorum* com sucesso, sendo perfeitamente visível o efeito de diluição da amostra ao observar-se uma diminuição da

intensidade das bandas no gel quando as diluições são mais elevadas, correspondendo a uma menor quantidade de DNA alvo do patógeno.

O limiar de detecção de *S. sclerotiorum* conseguido, na ordem de $1,25 \times 10^{-3}$ ng de DNA total, sugere que se consegue detectar *S. sclerotiorum* com quantidades bastante reduzidas de DNA. É de notar, no entanto, que este limiar de detecção depende muito do nível de infecção do material vegetal.

A detecção de um fragmento com os primers SSM numa amostra contaminada com *B. lactucae* (Br2(F)), cuja sequenciação sugere tratar-se de uma sequência de *Alternaria* sp., indica que este par de primers também amplia sequências de outros patógenos da alface que não sejam *S. sclerotiorum*. A sequência de *Alternaria* sp. apresenta uma homologia de 75 % com as sequências identificadas de *S. sclerotiorum*, sendo essa homologia maior nas zonas conservadas dos genes ribossomais, onde os primers hibridam, e menor nas regiões ITS. A utilização da enzima RsaI para cortar os produtos de PCR permitiu distinguir os dois organismos.

Numa amostra contaminada com *B. cinerea* (Bo1) identificou-se uma sequência ampliada com os primers SSM cuja análise sugere corresponder a uma sequência de *Botrytis* sp., indicando, tal como sucedeu na amostra Br2(F) na ampliação com SSM, que este par de primers amplia sequências que provavelmente pertencem a outros agentes patogénicos da alface que não sejam *S. sclerotiorum*. A sequência deste fragmento obtido de *Botrytis* sp. revela homologia total com sequências de *B. cinerea* retiradas da base de dados GenBank. No entanto, a análise Blast revela maior homologia com *Botrytis fabae* e *Botryotinia fuckeliana* do que com *B. cinerea*. Esta diferença poderá dever-se a uma diferença de tamanho de 23 bp, o que provavelmente faz com que a espécie *B. cinerea* não tenha surgido nas sequências homólogas iniciais. Como *B. cinerea* é a espécie parasita da alface dentro do género *Botrytis*, segundo Almeida (2006), e há uma homologia total do alinhamento da sequência do fragmento obtido com sequências de *B. cinerea* armazenadas na base de dados, diferindo apenas no tamanho em 23 bp, considerou-se que o fragmento sequenciado deverá pertencer à espécie *B. cinerea*. O mesmo foi verificado na ampliação da amostra Bo2 com os primers SSM. Por outro lado, os resultados indicam que existem isolados de *Botrytis* sp. com 100 % de homologia nesta sequência com o patógeno *S. sclerotiorum*, e outros isolados em que isto não se verifica. Assim, para distinguir melhor estes dois organismos será necessário encontrar sequências nos dois patógenos, tal como sucede com o patógeno *Alternaria* sp., que apresentem maiores diferenças entre eles, genes menos conservados, ou utilizar fragmentos de maior dimensão.

As sequências dos fragmentos obtidos de *B. cinerea* apresentam uma homologia com as sequências de *S. sclerotiorum* maior nas zonas conservadas dos genes ribossomais, onde ocorre a hibridação dos primers, e menor nas regiões ITS. A utilização de uma enzima de restrição no produto de PCR que corta os fragmentos correspondentes a *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* em zonas específicas das regiões ITS (HindIII), não permitiu diferenciar todos os fragmentos sequenciados dos dois organismos em

questão, indicando que esta enzima apenas permite a distinção entre alguns isolados de *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*, sendo necessário encontrar outras enzimas. A enzima HindIII também não permitiu a distinção entre os fragmentos de *B. cinerea* e de *Alternaria* sp., pois, a partir deste último fragmento, originou fragmentos de dimensão semelhante aos obtidos no fragmento de *B. cinerea*.

A detecção de um fragmento com cerca de 600 bp com os primers Br numa amostra contaminada com *S. sclerotiorum* (SSM1) sugere que a amostra também se encontrava infectada com *B. lactucae*, provavelmente em menor intensidade do que com *S. sclerotiorum*, pois as bandas que surgiram no gel de electroforese foram mais ténues do que as obtidas, na mesma amostra e com a mesma quantidade de DNA, com os primers SSM. Verificou-se, também, que sequências de *B. lactucae* são facilmente ampliadas por PCR com os primers Br em amostras de alface Br2, Br3 e Br4. A sequenciação dos fragmentos obtidos com os primers Br indicou tratar-se de sequências muito específicas de ITS de *B. lactucae*, que não apresentam homologia com as sequências obtidas de *S. sclerotiorum*, demonstrando que as sequências dos dois patógenos são muito diferentes, não sendo previsível que os primers SSM ampliem sequências parciais de *B. lactucae*. Realizando o alinhamento das sequências obtidas de ITS de *B. lactucae* verificou-se uma elevada homologia entre elas, demonstrando que as sequências são muito semelhantes e que os primers Br detectam o míldio da alface.

Na ampliação da amostra Br3 nas variantes (B), (A) e (F) com os primers Br verificou-se a presença de bandas mais intensas quando se utiliza o dobro da quantidade de DNA nas variantes (B) e (A), observando-se o efeito da quantidade de DNA, enquanto que na variante (F) se observam bandas menos intensas com o dobro da quantidade de DNA, verificando-se o efeito de inibição da reacção de PCR pelos contaminantes presentes na extracção de DNA, pois esta foi efectuada em folhas mais degradadas.

Os produtos da digestão enzimática, com as enzimas de restrição RsaI e HindIII, de fragmentos ampliados de *S. sclerotiorum*, *B. cinerea* e/ou *Alternaria* sp., quando comparados com os produtos de PCR correspondentes não digeridos, SSM2(F), Bo1(F) e Br3(F) ampliados com os primers SSM, permitiram distinguir os fragmentos dos patógenos presentes pela dimensão dos fragmentos obtidos. A análise de restrição com a enzima RsaI sugere a presença de fragmentos de *Alternaria* sp. e de *S. sclerotiorum* nos produtos de PCR das amostras Br3(F) e SSM2(F), respectivamente. A análise dos produtos de PCR das amostras Bo1(F) e SSM2(F) digeridos com HindIII sugere a presença de *B. cinerea* e de *S. sclerotiorum*, respectivamente. Assim, com a RsaI conseguiu-se distinguir os fragmentos de *S. sclerotiorum* e *Alternaria* sp., e com a HindIII apenas alguns fragmentos de *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*. Verificou-se também que a amostra Br3(F), além do míldio da alface já detectado anteriormente pelos primers Br, também deverá ter presente *Alternaria* sp.. A detecção de *Alternaria* sp. nesta amostra deve-se ao facto de se ter utilizado os primers SSM, que aparentemente detectam outros dos patógenos da alface, como *Alternaria* sp., e inicialmente a amostra só ter sido

ampliada com os primers Br, que em todas as reacções de PCR efectuadas não detectaram outros agentes patogénicos para além de *B. lactucae*. Este, por sua vez, não foi detectado nesta reacção de PCR pois não se utilizaram os primers Br, sugerindo, mais uma vez, a especificidade destes primers para a *B. lactucae*.

Na digestão dos produtos de PCR da amostra Br3(F) com a enzima RsaI verificou-se uma ligeira inibição da digestão, indicando que há uma parte do fragmento que não foi digerido, observando-se o mesmo efeito no produto ampliado da amostra Br3(F) não digerida, sugerindo que existe um factor inibidor das enzimas (Taq e endonucleases).

No estabelecimento de reacções de PCR multiplex conseguiu-se detectar simultaneamente alguns dos patogénios da alface, como *S. sclerotiorum*, *B. lactucae*, e alguns isolados de *Alternaria* sp. e de *B. cinerea*, numa mistura de DNA de amostras de alfaves contaminadas, utilizando em simultâneo os primers SSM, Br e 18S, sendo os últimos utilizados como controlo da boa qualidade do DNA extraído. Os resultados sugerem que não ocorreu inibição daqueles primers quando colocados em conjunto numa reacção de PCR, dado que originaram resultados semelhantes aos observados com os primers individualmente. Esta reacção permite, assim, a detecção dos vários patogénios em simultâneo, e os primers 18S confirmaram a boa qualidade do DNA a ampliar e a não ocorrência de inibição da reacção de PCR. Para realizar uma possível distinção entre os fragmentos dos diferentes agentes patogénicos presentes, seria necessário proceder-se à digestão enzimática com as enzimas de restrição RsaI e HindIII, ou outras.

Possivelmente o DNA de *Alternaria* sp., presente nas amostras Br3(F) e Br2(F), não foi ampliado na reacção de PCR multiplex porque existe em menor quantidade do que o DNA dos outros patogénios ou é menos competitivo pelos lugares de emparelhamento dos primers SSM.

O teste molecular estabelecido no presente estudo não permitiu distinguir com exactidão os géneros *Botrytis* e *Sclerotinia*, pelo menos entre determinados isolados destes dois patogénios. Para abreviar a caracterização morfológica clássica Van Beneden *et al.* (2009) propõem a utilização de uma SDS-PAGE, pois os esclerotos dos isolados identificados como *B. cinerea* apresentam padrões proteicos que são diferentes dos padrões verificados nos isolados de *Sclerotinia* sp.. No entanto, é necessário a presença de esclerotos para a aplicação deste teste, tornando este método menos eficaz para a detecção destes agentes patogénicos antes do aparecimento dos seus sintomas ou sinais, objectivo deste trabalho.

A análise desenvolvida em alface, no presente trabalho, onde se ampliou as regiões ITS e a subunidade 5,8S do DNA nuclear ribossomal e combinou a técnica de reacção de PCR com a digestão enzimática, também foi abordada por Powers *et al.* (1999), na caracterização de isolados de *S. sclerotiorum*, de *S. trifoliorum* e de *S. minor*, que estabeleceram um método rápido de detecção molecular. Estes autores

conseguiram uma análise em 24 h, mas utilizaram directamente o micélio de culturas puras de *Sclerotinia* sp.. O método estabelecido neste trabalho, apesar de demorar 48 h, permite a detecção do patogénio em material de campo, não obrigando a preparação de culturas puras.

À semelhança dos trabalhos realizados com *Sclerotinia pseudotuberosa* Rehm em castanheiro por Vettrano *et al.* (2005), e com o patogénio *Botrytis* sp. em cebola por Chilvers *et al.* (2007), o método de detecção baseado em reacção de PCR desenvolvido no presente trabalho para o agente patogénico *S. sclerotiorum* em alface permite uma diagnose prévia do estado de infecção do material vegetal antes do armazenamento, avaliando rapidamente a eficácia das estratégias de gestão em relação a alguns agentes patogénicos, assim como o potencial de armazenamento da cultura colhida, de modo a assegurar a presença de produtos não infectados no mercado. Em adição à detecção da presença de pequenas quantidades de patogénio associado à podridão branca em tecidos de alface, este método aumenta a capacidade de um diagnóstico correcto de agentes causais de algumas infecções, através da digestão enzimática dos produtos de PCR obtidos em reacção de PCR, tal como aconteceu também nos trabalhos desenvolvidos por Nielsen *et al.* (2002) em cebola com isolados de *Botrytis* sp., e por Ristaino *et al.* (2007) em míldio no tabaco. No entanto, o esquema de enzimas de restrição estabelecido no presente trabalho serve apenas para distinguir grupos de isolados, pois existe alguma conservação ao nível das sequências dos isolados utilizados, não permitindo a distinção entre todas as sequências obtidas.

No presente trabalho não se encontrou uma grande diversidade ao nível das sequências obtidas em *S. sclerotiorum*, provavelmente devido ao reduzido número de isolados que, no tempo útil para a realização deste estudo, se conseguiram encontrar em alface no nosso país. É importante estimar a diversidade em *S. sclerotiorum* utilizando um maior número de isolados, até porque outros autores, como Leiner e Winton (2006), verificaram a existência de diversidade genética entre isolados desta espécie em alface no Alaska, assim como Mert-Türk *et al.* (2007) em colza na Turquia.

6. Conclusões

Para o sector da 4ª gama, onde as saladas (alface, rúcula) representam o produto principal, prevê-se um futuro promissor com elevado crescimento. Todavia, um dos principais problemas fitopatológicos que tem vindo a surgir nos sistemas de cultura intensiva destinada à 4ª gama é a podridão branca da alface, provocada pelo patogénio *S. sclerotiorum* (Gilardi *et al.*, 2006). Assim, deve ocorrer uma monitorização da contaminação das alfaces, com este e outros patogénios, para assegurar uma boa qualidade dos produtos, quer as alfaces sejam destinadas à 4ª gama ou não, de modo a diminuir os prejuízos, evitando que material vegetal contaminado, mas sem sintomas e sinais visíveis de doenças, seja embalado e enviado para o mercado.

Este trabalho visou a identificação de uma sequência de DNA específica de *S. sclerotiorum*, que causa a podridão branca da alface, facilmente ampliável por reacção de PCR e o desenvolvimento de um teste rápido, específico, facilmente exequível, reprodutível e barato, para detectar precocemente a contaminação de alfaces assintomáticas com este patogénio. Procurou-se também com este trabalho a identificação de alguns dos patogénios da alface, através da digestão dos produtos ampliados por PCR, com enzimas de restrição e o estabelecimento de uma reacção de PCR multiplex que permita detectar em simultâneo alguns dos agentes patogénicos desta cultura.

A utilização de primers específicos (SSM), desenhados com base nas sequências das regiões ITS do DNA ribossomal de sequências armazenadas na base de dados GenBank, permitiu identificar uma sequência específica de DNA de *S. sclerotiorum*. Estes primers permitem, através da técnica de reacção de PCR, a detecção de *S. sclerotiorum* em alfaces contaminadas, mas com ausência de sintomas e de sinais deste agente patogénico, num limiar de detecção estimado na ordem dos $1,25 \times 10^{-3}$ ng de DNA total. Este limiar depende muito do nível de infecção do material vegetal, mas consegue-se detectar *S. sclerotiorum* com quantidades bastante reduzidas de DNA.

Não é previsível que o par de primers SSM amplie sequências de DNA de *Bremia lactucae*, causador do míldio, outro agente patogénico frequentemente encontrado em alface, pois, em todas as reacções de PCR efectuadas com estes primers e amostras contaminadas com *B. lactucae*, tal nunca se verificou. O patogénio *B. lactucae* apenas foi detectado com os primers Br que ampliam sequências parciais da região ITS de *B. lactucae*. No entanto, os primers SSM detectaram outros patogénios da alface, como *Alternaria* sp. e *Botrytis cinerea*, que se podem distinguir, em alguns casos, através da digestão enzimática dos produtos de PCR, com recurso a enzimas de restrição (RsaI e HindIII), pois originam diferenças significativas nos perfis electroforéticos. O método de reacção de PCR conjugado com estas enzimas de restrição apenas permite discriminar certos isolados de *B. cinerea*, pois a variabilidade existente ao nível das sequências de ITS dos isolados utilizados de *B. cinerea*, dando origem a sequências de DNA de *B.*

cinerea mais próximas de *S. sclerotiorum* do que de *B. cinerea*, não permite a diferenciação entre todas as sequências de DNA obtidas dos dois patogénios.

Estabeleceu-se uma reacção de PCR multiplex, conjugando os primers SSM e Br, onde se detectam em simultâneo alguns dos patogénios da alface, como *S. sclerotiorum*, *B. lactucae*, *B. cinerea* e *Alternaria* sp., utilizando os primers 18S como controlo da qualidade do DNA extraído e da não ocorrência de inibição da reacção. Alguns destes patogénios podem ainda ser distinguidos uns dos outros usando as enzimas de restrição RsaI e HindIII nos produtos de PCR multiplex, mantendo-se a ressalva, como referido anteriormente, de apenas ser possível a distinção de alguns isolados de *B. cinerea* em relação aos isolados de *S. sclerotiorum*.

A pouca variabilidade genética verificada no presente estudo deveu-se ao reduzido número de isolados disponíveis de *S. sclerotiorum*, *B. lactucae*, *B. cinerea* e *Alternaria* sp.. Para estabelecer um método que permitisse distinguir cabalmente as diferentes espécies presentes, seria necessário dispor de uma amostra representativa da variabilidade existente dentro de cada espécie para obter um conjunto de sequências representativo de cada espécie. Nestas condições seria possível escolher enzimas de restrição para agrupar as espécies e distinguir os diferentes isolados dentro de cada espécie. Outra possibilidade seria utilizar outros genes menos conservados entre espécies, em alternativa aos genes ribossomais.

Referências Bibliográficas

- Abawi, G.S. e Grogan, R.G., 1979. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* **69**: 899-904.
- Adams, P.B. e Ayers; W.A., 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* **69**: 896-899.
- Almeida, D., 2006. *Manual de Culturas Hortícolas*. Volume I. Editorial Presença, Lisboa, Portugal. 346 pp.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. e Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Andrew, M. e Kohn, L.M., 2009. Single nucleotide polymorphism-based diagnostic system for crop-associated *Sclerotinia* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 5600-5606.
- Arbaoui, M., Huszár, J. e Gregusková, R., 2004. Comparison of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates originating from Algeria and Slovakia. *Acta Fytotechnica et Zootéchnica* **7**: 15-19.
- Bardin, S.D. e Huang, H.C., 2001. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* **23**: 88-98.
- Ben-Yephet, Y., Genizi, A. e Siti, E., 1993. Sclerotial survival and apothecial production by *Sclerotinia sclerotiorum* following outbreaks of lettuce drop. *Phytopathology* **83**: 509-513.
- Berbee, M.L. e Taylor, J.W., 2001. Fungal molecular evolution: gene trees and geological time. In *The Mycota VII, Systematics and Evolution, Part B*, McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G. e Lemke, P.A. (eds.), pp.229-245. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Boland, G.J. e Hall, R., 1994. Index of host plants of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Pathol.* **16**: 93-108.
- Bolton, M.D., Thomma, B.P.H.J. e Nelson, B.D., 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* **7**: 1-16.

- Buscot, F., Wipf, D., Di Battista, C., Munch, J.-C., Botton, B. e Martin, F., 1996. DNA polymorphism in morels: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed PCR. *Mycological Research* **100**: 63-71.
- Casimiro, S.C., 2000. *Diversidade molecular em Peronospora parasitica (Pers. ex fr.) Fr. agente causal do mildio das crucíferas*. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 153 pp.
- Chawla, H.S., 2000. Polymerase chain reaction. In *Introduction to plant biotechnology*, pp.259-264. Science Publishers Inc., Enfiel, NH, USA.
- Chilvers, M.I., Toit, L.J., Akamatsu, H. e Peever, T.L., 2007. A real-time, quantitative PCR seed assay for *Botrytis* spp. that cause neck rot of onion. *Plant Dis.* **91**: 599-608.
- Clarkson, J.P., Phelps, K., Whipps, J.M., Young, C.S., Smith, J.A. e Watling, M., 2004. Forecasting *Sclerotinia* disease on lettuce: Toward developing a prediction model for carpogenic germination of sclerotia. *Phytopathology* **94**: 268-279.
- Coelho, M.P., 2001. *Caracterização da resistência ao mildio em plantas adultas de Brassica oleracea L.*. Tese de Doutoramento, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 293 pp.
- Dias, M.R e Lucas, M.T., 1978. *Fungi Lusitaniae XXVI. Agronomia Lusitana* **38**: 285-295.
- Dickman, M., 2007. Approaches for improving crop resistance to soilborne fungal diseases through biotechnology using *Sclerotinia sclerotiorum* as a case study. *Australasian Plant Pathology* **36**: 116-123.
- Dillard, H.R., Ludwing, J.W. e Hunter, J.E., 1995. Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. *Plant Dis.* **79**: 411-415.
- Doyle, J.J. e Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15.
- Duncan, J.M., Cooke, D., Birch, P. e Toth, R., 1998. Molecular variability in sexually reproducing fungal plant pathogens. In *Molecular Variability of Fungal Pathogens*, Bridge, P.D., Couteaudier, Y. e Clarkson, J.M. (eds.), pp.19-39. CAB International, Wallingford, UK.

- Edwards, S.G. e Seddon, B., 2001. Selective media for the isolation and enumeration of *Botrytis cinerea* conidia. *Letters in Applied Microbiology* **32**: 63-66.
- Ekins, M.G., Aitken, E.A. e Goulter, K.C., 2005. Identification of *Sclerotinia* species. *Australasian Plant Pathology* **34**: 549-555.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. e Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5,8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 329-337.
- Ferreira, M.A., Tooley, P.W., Hatziloukas, E., Castro, C. e Schaad, N.W., 1996. Isolation of a species-specific mitochondrial DNA sequence for identification of *Tilletia indica*, the karnal bunt of wheat fungus. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 87-93.
- Finlayson, J.E., Rimmer, S.R. e Pritchard, M.K., 1989. Infection of carrots by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Pathol.* **11**: 242-246.
- Freeman, J., Ward, E., Calderon, C. e McCartney, A., 2002. A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 877-886.
- Gilardi, G., Gullino, M.L. e Garibaldi, A., 2006. Difesa delle insalate perl a IV gamma. *Informatore Fitopatológico* **12**: 15-19.
- Goosen, T.E. e Debets, F., 1996. Molecular genetic analysis. In *Fungal genetics, principles and practices*, Bos, C.J. (ed.), pp.97-118. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Hao, J.J. e Subbarao, K.V., 2005. Comparative analysis of lettuce drop epidemics caused by *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. *Plant Dis.* **89**: 717-725.
- Henson, J.M. e French, R., 1993. The polimerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**: 81-109.
- Hillis, D.M. e Dixon, M.T., 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* **66**: 411-453.

- Hirschhäuser, S., Fröhlich, J., 2007. Multiplex PCR for species discrimination of *Sclerotiniaceae* by novel laccase introns. *International Journal of Food Microbiology* **118**: 151-157.
- Huang , H.C., Chang, C. e Kozub, G.C., 1998. Effect of temperature during sclerotial formation, sclerotial dryness, and relative humidity on myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Bot.* **76**: 494-499.
- Huang, H.C. e Kozub, G.C., 1993. Influence of inoculum production temperature on carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Microbiol.* **39**: 548-550.
- Huang, H.C. e Kozub, G.C., 1991. Temperature requirements for carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different geographic origin. *Bot. Bull. Academia Sinica* **32**: 279-286.
- Hwang, U. e Kim, W., 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology* **37**: 215-228.
- Inácio, M.L., 1997. *Estudo da podridão da alface causada por Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary e Sclerotinia minor Jagger*. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 99 pp.
- Jacobs, K.A. e Rehner, S.A., 1998. Comparisons of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia* **90**: 601-610.
- Kano, R., Matshushiro, H., Watari, T., Tsujimoto, H. e Hasegawa, A., 1997. Differentiation of *Arthroderma* spp. by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and southern hybridization. *Mycoses* **40**: 335-341.
- Keeling, P., 2003. Congruent evidence from α -tubulin and β -tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. *Fungal Genetics and Biology* **38**: 298-309.
- Kohn, L.M., 1979. Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. *Phytopathology* **69**: 881-886.
- Koike, S.T. e Subbarao, K.V., 1995. First report of endive and escarole as hosts of *Sclerotinia minor*. *Plant Dis.* **79**: 642.

- Kurtzman, C.P., 1985. Molecular Taxonomy of the Fungi. In *Gene Manipulations in Fungi*, Bennett, J.W. e Lasure, L.L. (eds.), pp.35-63. Academic Press, Orlando, USA.
- Kurtzman, C.P. e Robnett, C.J., 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 1216-1223.
- Leiner, R.H. e Winton, L.M., 2006. Differential production of sclerotia by isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* from Alaska. *Can. J. Plant Pathol.* **28**: 435-440.
- Le Tourneau, D., 1979. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. *Phytopathology* **69**: 887-890.
- Li, G., Wang, D., Jiang, D., Huang, H.C. e Laroche, A., 2000. First report of *Sclerotinia nivalis* on lettuce in central China. *Mycological Research* **104**: 232-237.
- Lopes, J.F., 2008. *Resolving cryptic species complexes in Diplodia*. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 122 pp.
- Lucas, M.T. e Lopes, M.C., 1987. *Sclerotinia sclerotiorum* on lettuce and other hosts in Portugal. *Agronomia Lusitana* **42**: 189-190.
- Lucas, M.T. e Lopes, M.C., 1980. Fungos do craveiro, em cultura protegida, em Portugal. *Actas I Congresso Português Fitiatría e Fitofarmacologia*, Lisboa. pp.225-234.
- Lumsden, R.D., 1979. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* **69**: 890-896.
- Meinhardt, L.W., Wulff, N.A., Bellato, C.M. e Tsai, S.M., 2002. Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil. *Fitopatologia Brasileira* **27**: 211-215.
- Melzer, M.S., Smith, E.A. e Boland, G.J., 1997. Index of plants hosts of *Sclerotinia minor*. *Can. J. Plant Pathol.* **19**: 272-280.

- Mert-Türk, F., Ipek, M., Mermer, D. e Nicholson, P., 2007. Microsatellite and morphological markers reveal genetic variation within a population of *Sclerotinia sclerotiorum* from oilseed rape in the Çanakkale province of Turkey. *J. Phytopathology* **155**: 182-187.
- Messiaen, C.M., Blancard, D., Rouxel, F. e Lafon, R., 1991. *Les maladies des plantes maraichères*. 3e édition. INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), Paris, France. 552 pp.
- Miller, S.A. e Martin, R.R., 1988. Molecular diagnosis of plant disease. *Annu. Ver. Phytopathol.* **26**: 409-432.
- Miranda, C., Henriques, S., Rodrigues, L., Rodrigues, A.S., Monteiro, A.A., Reis, M., Caço, J. e Antunes, L.E., 2004. *Manual de Culturas Hortícolas Sem Solo*. AIHO (Associação Interprofissional de Horticultura do Oeste), Lourinhã, Portugal. 152 pp.
- Mirzaei, S., Goltapeh, E.M. e Shams-bakhsh, M., 2007. Taxonomical studies on the genus *Botrytis* in Iran. *Journal of Agricultural Technology* **3**: 65-76.
- Morrall, R.A., 1977. A preliminary study of the influence of water potencial on sclerotium germination in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Bot.* **55**: 8-11.
- Narumi, T., Fujita, T., Sano, T. e Harada, Y., 2001. *Sclerotinia trillii*, sp. nov., causing a new sclerotinia disease on *Trillium* in Japan. *Mycoscience* **42**: 181-186.
- Nielsen, K., Yohalem, D.S. e Jensen, D.F., 2002. PCR detection and RFLP differentiation of *Botrytis* species associated with neck rot of onion. *Plant Dis.* **86**: 682-686.
- Oliveira, A.B., 2009. *Guia dos produtos fitofarmacêuticos: Lista dos produtos com venda autorizada*. DGADR, Lisboa, Portugal. 249 pp.
- Patterson, C.L. e Grogan, R.G., 1985. Differences in epidemiology and control of lettuce drop caused by *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. *Plant Dis.* **69**: 766-770.
- Powers, K., Steadman, J.R., Higgins, R. e Shaver Adams, M., 1999. Characterization of diverse isolates of *Sclerotinia* spp. *Proceedings 1998 International Sclerotinia Workshop*, Nelson, B.D. e Gulya, T.J. (eds.), Fargo, ND, USA. pp.14-17.

- Purdy, L.H., 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology* **69**: 875-880.
- Raid, R.N., 2004. Lettuce Diseases and their Management. In *Diseases of Fruits and Vegetables*, Volume II, Naqvi, S.A. (ed.), pp.121-147. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Ripado, M.F.B., 1993. *A Alface*. Publicações Europa América. Coleção Biblioteca do Agricultor, Lisboa, Portugal. 141 pp.
- Ristaino, J.B., Johnson, A., Blanco-Meneses, M. e Liu, B., 2007. Identification of the tobacco blue mold pathogen, *Peronospora tabacina*, by polymerase chain reaction. *Plant Dis.* **91**: 685-691.
- Rocha, R.F., 1999. *Caracterização clássica e biomolecular de isolamentos de Heterobasidion annosum (FR.) Bref. e de Phytophthora de Bary spp.*. Relatório de Licenciatura, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 81 pp.
- Rollins, J., 2007. Developmental life cycle of *S. sclerotiorum*. Disponível em: <<http://www.sclerotia.org./lifecycle>>. Acesso em: 23/09/2009.
- Ryder, E.J., 1999. *Lettuce, Endive and Chicory. Crop Production in Horticulture Series*. Volume 7. CABI Publishing, London, UK. 208 pp.
- Saito, I., 1997. *Sclerotinia nivalis*, sp. nov., the pathogen of snow mold of herbaceous dicots in northern Japan. *Mycoscience* **38**: 227-236.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. e Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sanger, F., Nicklen, S. e Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Sauer, P., Müller, M. e Kang, J., 1998. Quantitation of DNA. *QIAGENNews* **2**: 23-26.
- Seifert, K.A., Wingfield, B.D. e Wingfield, M.J., 1995. A critique of DNA sequence analysis in the taxonomy of filamentous Ascomycetes and ascomycetous anamorphs. *Can. J. Bot.* **73**: 760-767.

- Sexton, A.C. e Howlett, B.J., 2004. Microsatellite markers reveal genetic differentiation among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australian canola fields. *Curr. Genet.* **46**: 357-365.
- Shiyun, C., Baoyu, Y., Meiyang, G. e Shunying, D., 2005. Inhibition of sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.* **11**: 373-376.
- Sirjusingh, C. e Kohn, L.M., 2001. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Molecular Ecology Notes* **1**: 267-269.
- Smith, E.A. e Boland, G.J., 1989. A reliable method for the production and maintenance of germinated sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Pathol.* **11**: 45-48.
- Steadman, J.R., 1979. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* **69**: 904-907.
- Subbarao, K.V., 1998. Progress toward integrated management of lettuce drop. *Plant Dis.* **82**: 1068-1078.
- Tariq, V.-N., Gutteridge, C.S. e Jeffries, P., 1985. Comparative studies of cultural and biochemical characteristics used for distinguishing species within *Sclerotinia*. *Transactions of the British Mycological Society* **84**: 381-397.
- Thaning, C. e Nilsson, H.-E., 2000. A narrow range of wavelengths active in regulating apothecial development in *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Phytopathology* **148**: 627-631.
- Thicoïpé, J.-P., 1997. *Laitues*. Ctifl, SERAIL, Paris, France. 281 pp.
- Tomaz, I., 2001. *Doenças das plantas – Diagnóstico das Micoses e Taxonomia dos Seus Agentes*. Publicações Europa América. Coleção Euroagro 55, Mem Martins, Portugal. 246 pp.
- Tu, J.C., 1983. Efficacy of iprodione against alternaria black pod and white mold of white beans. *Can. J. Plant Pathol.* **5**: 133-135.
- Van Beneden, S., Pannecouque, J., Debode, J., De Backer, G. e Höfte, M., 2009. Characterisation of fungal pathogens causing basal rot of lettuce in Belgian greenhouses. *Eur. J. Plant Pathol.* **124**: 9-19.

Vettrai, A.M., Paolacci, A. e Vannini, A., 2005. Endophytism of *Sclerotinia pseudotuberosa*: PCR assay for specific detection in chestnut tissues. *Mycological Research* **109**: 96-102.

Vieira, A., 2001. Reacção em cadeia da polimerase (PCR). In *Engenharia Genética. Princípios e Aplicações*. Lidel, Lisboa, Portugal. 168 pp.

Viegas, E., 2000. *Estudos sobre a podridão da alface causada por Sclerotinia minor Jagger e Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary*. Relatório de Licenciatura, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 92 pp.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. e Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. e White, T.J. (eds.), pp.315-322. Academic Press, New York, USA.

Winton, L.M., Leiner, R.H. e Krohn, A.L., 2006. Genetic diversity of *Sclerotinia* species from Alaskan vegetable crops. *Can. J. Plant Pathol.* **28**: 426-434.

Yajima, W., Rahman, M.H., Das, D., Suresh, M.R. e Kav, N.N., 2008. Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* using a monomeric and dimeric single-chain fragment variable (scFv) antibody. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 9455-9463.

Young, C.S., Clarkson, J.P., Smith, J.A., Watling, M., Phelps, K. e Whipps, J.M., 2004. Environmental conditions influencing *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce. *Plant Pathology* **53**: 387-397.

Foi também consultado:

<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, acesso em 25-11-2009

http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

<http://www.ebi.ac.uk>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, acesso em 17/04/2008

<http://www.restrictionmapper.org/>

<http://www.ualberta.ca/~stothard/javascript/index.html>

Anexo 1: Composição dos meios de cultura utilizados

- **Meio de cultura para bactérias (Sambrook *et al.*, 1989):**

LB líquido (1000 ml): 25 g meio LB caldo; pH 7,0 (10 g triptona, 5 g extracto levedura, 10 g NaCl)

LB agar (1000 ml): LB líquido + 15 g agar (adicionado de 1 µl canamicina/ 1 ml meio LB, após autoclavagem do meio de cultura)

SOC (1000 ml): 20 g triptona, 5 g extracto de levedura, 0,58 g NaCl, 0,19 g KCl, 2,03 g MgCl₂.6H₂O, 3,96 g C₆H₁₂O₆.H₂O, 2,46 g MgSO₄.7H₂O; pH 7,0

- **Meio de cultura para fungos**

PDA (1000 ml): 24 g caldo de batata e dextrose (PDB), 15 g agar; pH 6,0

Anexo 2: Composição de soluções, tampões e géis utilizados

Quando não especificado, as soluções e tampões foram preparados de acordo com Sambrook *et al.* (1989).

- **Tampões e soluções**

TE pH 8,0: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0

Tampão de lavagem (200 ml): etanol 76 %, 10 mM acetato amónio (CH₃COONH₄)

High Salt TE: 2TE:1NaCl 5 M (v/v); pH 8,0

X-Gal: 50 mg X-Gal, 1 ml dimetilformamida

- **Extracção de DNA**

Tampão CTAB 2x para extracção de DNA vegetal (Doyle e Doyle, 1990): 2 % CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 1 % PVP; pH 8,0

CI: 24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico (v/v)

- **Géis DNA**

TAE 50x (1000 ml): 242 g Tris-base, 57,1 ml ácido acético glacial, 100 ml EDTA 0,5 M pH 8,0; pH 7,8

TAE 1x (tampão de electroforese): diluição 1:50 de TAE 50x

Gel de 1,2 % e 2 % agarose: 1,2 g ou 2,0 g agarose/ 100 ml (98 % água destilada e 2 % tampão TAE 50x)

Anexo 3: Protocolo de extracção de DNA total (Doyle e Doyle, 1990)

- Reduzir o material vegetal congelado a pó com azoto líquido, num almofariz previamente arrefecido
- Adicionar 350 mg material vegetal/ 800 µl CTAB 2x e 2 % mercaptoetanol, num tubo eppendorf
- Colocar no banho termostático a 65 °C durante 30'
- Deixar arrefecer à temperatura ambiente
- Adicionar CI 1:1 (v/v)
- Centrifugar 13000 rpm, 10', a 20 °C ou temperatura ambiente
- Retirar cuidadosamente o sobrenadante para um novo tubo eppendorf
- Adicionar isopropanol frio (2/3 volume)
- Colocar a -20 °C, no mínimo 2 h
- Centrifugar 13000 rpm, 10 a 30', a 4 °C
- Retirar o sobrenadante
- Lavagem do pellet, adicionando 500 µl de tampão de lavagem frio, no agitador horizontal 300 rpm, 30'
- Centrifugar 13000 rpm, 10', a 4 °C
- Retirar o sobrenadante
- Secar o pellet na estufa a 50 °C
- Adicionar 100-300 µl de High Salt TE
- Dissolver o pellet no banho termostático a 56 °C
- Breve centrifugação
- Adicionar CI (1:1) (v/v)
- Centrifugar 13000 rpm, 10', a 20 °C ou temperatura ambiente
- Retirar sobrenadante para um novo tubo eppendorf
- Adicionar 1 µg RNase por 100 µl extracto
- Colocar no banho termostático com agitação 30', a 37 °C (20 rpm)
- Breve centrifugação
- Adicionar CI (1:1) (v/v)
- Centrifugar 13000 rpm, 10', a 20 °C ou temperatura ambiente
- Retirar o sobrenadante para um novo tubo eppendorf
- Adicionar álcool absoluto frio (96 %) 2,5v
- Colocar a -20 °C para aumentar o rendimento
- Centrifugar 13000 rpm, 10', a 20 °C ou temperatura ambiente
- Retirar o sobrenadante
- Adicionar 300 µl de tampão de lavagem ou álcool 70 % frio
- Colocar no agitador horizontal 300 rpm, 30'

- Centrifugar 13000 rpm, 10', a 20 °C ou temperatura ambiente
- Retirar o sobrenadante
- Secar o pellet na estufa a 50 °C
- Hidratar com 20-50 µl de TE pH=8,0
- Colocar a 4 °C até ser utilizado

Anexo 4: Protocolo de purificação de produtos de PCR

Para purificação de produtos de PCR utilizou-se o kit “QIAquick® PCR Purification” (QIAGEN), de acordo com instruções do fabricante.

- Adicionar Buffer PB (5:1) (v/v) aos produtos de PCR
- Colocar a mistura numa coluna ‘spin’ QIAquick
- Centrifugar a mistura numa coluna ‘spin’ QIAquick a 13000 rpm, 1’
- Adicionar 750 µl de Buffer PE à coluna
- Centrifugar a coluna a 13000 rpm, 1’, duas vezes
- Colocar a coluna num novo tubo eppendorf 1,5 ml
- Adicionar 30 µl de água ultra pura no centro da coluna, 1’
- Centrifugar a coluna a 13000 rpm, 1’
- Armazenar a -20 °C

Anexo 5: Protocolo de transformação de células competentes (*E. coli*)

Para a transformação de células competentes utilizou-se uma adaptação do kit “TA Cloning® Dual Promoter (pcR® II)” (Invitrogen).

- Colocar duas placas de Petri, com meio de cultura para bactérias, invertidas na estufa a 37 °C, 1 h 30’ para secar
- À chama, adicionar à placa de Petri 1750 µg de substracto X-Gal com espalhador, o mais uniformemente possível até ser totalmente absorvido pelo meio
- Colocar a placa de Petri invertida a secar na estufa a 37 °C, até à sua utilização
- Descongelar as bactérias em gelo entre 15’ a 1 h
- Pipetar toda a ligação (5 µl), previamente desnaturada, para o tubo que contém as bactérias, em permanente contacto com o gelo
- Incubar em gelo 30’ a 1 h
- Choque térmico, colocando o tubo no banho termostático a 42 °C, 30’’
- Colocar imediatamente o tubo no gelo e adicionar 200 µl de meio SOC, mantido previamente à temperatura ambiente

- Colocar no banho com agitação a 37 °C, 170 rpm, 1 h
- Plaquear à chama 125 µl das bactérias em cada placa de Petri, com espalhador, o mais uniformemente possível até ser totalmente absorvido pelo meio
- Colocar a placa de Petri invertida na estufa a 37 °C, pelo menos 16 h
- Colocar a placa de Petri invertida a 4 °C, pelo menos 4 h, para permitir um bom desenvolvimento da cor

Anexo 6: Protocolo de preparação de DNA plasmidico em pequena escala (“minipreps”) (Sambrook *et al.*, 1989)

- Colocar, à chama, 25 ml de meio LB líquido num tubo de centrifuga de 50 ml
- Adicionar, à chama, 1 µl de canamicina/ 1 ml de meio LB (1:1000) (v/v)
- Colocar 1,5 ml do meio LB com canamicina em tubos de vidro esterilizados, numerados com 3-4 colónias por cada transformação
- Seleccionar nas placas de Petri as colónias positivas (brancas)
- À chama, e utilizando uma pinça previamente esterilizada, tocar com a ponta de um palito esterilizado na colónia seleccionada
- Colocar o palito no tubo de vidro correspondente
- Colocar os tubos de vidro no banho com agitação a 37 °C, 170 rpm, durante a noite (±16 h)

Anexo 7: Protocolo de extracção e purificação do DNA plasmidico (Sambrook *et al.*, 1989)

A. Colheita das bactérias

- À chama, drenar 1,5 ml da cultura de bactérias para um tubo eppendorf de 1,5 ml esterilizado
- Centrifugar a 13000 rpm, 4', a 4 °C
- Remover o sobrenadante por drenagem, de modo a que o pellet de bactérias fique o mais seco possível

B. Lise das bactérias com solução alcalina

- Resuspende o pellet bacteriano em 100 µl da Solução I fria no vortex, 5''

Solução I: 50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0)

Esta solução pode ser preparada em frascos de 100 ml, autoclavada a 120 °C, 1,4 bar de pressão, durante 20', e armazenada a 4 °C.

- Adicionar 200 µl da Solução II, preparada no momento

Solução II: 0,2 N NaOH diluída no momento dum stock 10 N, 1 % SDS

- Misturar o conteúdo invertendo rapidamente os tubos
- Colocar os tubos eppendorf no gelo 10'
- Adicionar 150 µl da Solução III fria

Solução III: 60 ml de 5 M acetato de potássio, 11,5 ml de ácido acético glacial, 28,5 ml de água destilada esterilizada

- Agitar os tubos gentilmente numa posição invertida durante 10''
- Colocar os tubos eppendorf 10' no gelo
- Centrifugar a 13000 rpm, 10', a 4 °C
- Transferir o sobrenadante, que contém o plasmídeo, para um novo tubo eppendorf
- Adicionar 1 µg RNase por 100 µl de volume
- Colocar no banho a 37 °C, 30'
- Adicionar CI (1:1) (v/v)
- Centrifugar 13000 rpm, 10' a 4 °C
- Retirar o sobrenadante para um novo tubo eppendorf
- Precipitar com 2,5v álcool absoluto frio (96 %)
- Colocar a -20 °C, no mínimo 2 h
- Centrifugar a 13000 rpm, 30' a 4 °C
- Remover, gentilmente, a totalidade do sobrenadante por drenagem
- Lavar o pellet em 100 µl de etanol 70 % a 4 °C, no agitador horizontal, 20', 300 rpm
- Centrifugar 13000 rpm, 20', a 4 °C
- Retirar o sobrenadante
- Secar o pellet na estufa a 50 °C
- Hidratar o pellet com 20-50 µl de água ultra pura
- Armazenar a 4 °C

Anexo 8: Sequências de fragmentos sequenciados

1. Sequências de fragmentos sequenciados de *Sclerotinia sclerotiorum*

1.1. Amostra SSM1 - Primers SSM – Colônia 10

AGGTGAACCTGCCGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTG
 CTCTTCGGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATATCAAAACTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACTTTCAACAACG
 GATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
 CATTGCGCCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTATTGAGTCCATGTCAGTAATGGC
 AGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCAAAAAACCAATTT
 TCTATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT

Fragmento com 500 bp

Sublinhado o SSM-fwd e a sequência complementar do SSM-rev

1.2. Amostra SSM1 – Primers SS – Colônia 8

GCTCTTCGGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATATCAAAACTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACTTTCAACAAC
 GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
 ACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTATTGAGTCCATGTC

Fragmento com 274 bp

Sublinhado o SSFWD e a sequência complementar do SSREV

1.3. Amostra SSM2 – Primers SSM – Colônia 1

GGTGAACCTGCCGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCGCGGTGCGGCCACCAGGTTGATTTGTCCAGCTGC
 TATTTCGGGTCTTGTATGCTCGCCAGAGAATATCAAAACTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACTTTCAACAACGG
 ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC
 ATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTATTGAGTCCATGTCAGTAATGGCA
 GGCTCTAAAATCAGTGGCGGCGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGTTTCTGCCAAAACCAAAATTTT
 CTATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT

Fragmento com 499 bp

Sublinhado o SSM-fwd e a sequência complementar do SSM-rev

2. Sequências de fragmentos sequenciados de *Lactuca sativa*

2.1. Amostra SSM1 – Primers 18S – Colônia 4

GATAAAAGGTCGACGCGGACTCTGCCCGTTGCTGCGATGATTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGCCCTCGTGCCGGCGACGCATCATTCAA
 ATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGTGGCTACTATGGTGGTGACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCC

TGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCAAATTACCCAATCCTGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGG
 CTCTTTTCGAGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATT
 CCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGACCTTGGGTTGGGTC

Fragmento com 444 bp

Sublinhado o 18S-fwd e a sequência complementar do 18S-rev

3. Sequências de fragmentos sequenciados de *Bremia lactucae*

3.1. Amostra SSM1 – Primers Br – Colônia 1

GCTCAAAAATCATGGTGTAAAGGATTCAGAGGAAGTCATTCGTAGCCAGTCAGCGATTAATATGAATGCTATAAATGAAATAGATTAAGGTTAG
 CGGTTTAGTTTGCTTCGGCGAATTAATAAAGCAGACTGAGATCGGTTTCTGCTGTGGCATGATAATTAATGTACCGTAGTTATGATTGACGTTG
 CCTTTGGATCGATTCGCTAATTTTATAGGTTGTGACGAATAGCCAGTCGGCGATCAATTTGAATGCTTAAGCTAAGAAATGAGTTTGTATTTG
 CAGGATTATTAGCTTCGGTTAATGAGAAATGTCTTATTTAAACTTGATTCTGCTATAGCAAGATGATTGATGAACCGTAGCTAAGAGTTGCATTG
 CCTTGAATTTGTGATTCCAATTTTGTAGTTGCTATGAATAGCCTGTGCGGTGACCGATTTGAATGCGTTAAGGAATCATGTTATAATTTGCAGTA
 TTGATGCTTCGGTAATCGATACAGCTTATTTAACTTGGTTCTGATGATGATGAAAATGTGGTGAGCCGTAGCTAGGAGTAGTGATACATTA
 AATGGAATATCCGAATTTATGGAAGTCATTCGTAGCCAGTC

Fragmento com 605 bp

Sublinhado o Br-fwd e a sequência complementar do Br-rev

3.2. Amostra Br2 – Primers Br – Colônia 1

GCTCAAAAATCATGGTGTACTGATTCAGAGGCTGTCATGATTAGCCAGTCGGCGATTAATATGAATGCTATAAATGAAATAGATTAAGGTTAG
 CGGTTTAGTTTGCTTCGGCGAATTAATAAAGCAGACTGAAATCGGTTTCTGCTGTGGCATGATAATTAATGTACCGTAGTTATAATTGACGTTG
 CCTTTGGATCGATTCGCTAATTTTATAGGTTGTGACGAATAGCCAGTCGGCGATCAATTTGAATGCTTAAGCTAAGAAATGAGTTTGTATTTG
 CAGGATTATTAGCTTCGGTTAATGAGAAATGTCTTATTTAAACTTGATTCTGCTATAGCAAGATGATTGATGAACCGTAGCTAAGAGTTGCATTG
 CCTTGAATTTGTGATTCCAATTTTGTAGTTGCTATGAATAGCCTGTGCGGTGACCGGTTTGAATGCGTTAAGGAATCATGTTATAATTTGCAGTA
 TTGATGCTTCGGTAATCGATACAGCTTATTTAACTTGGTTCTGATGATGATGAAAATGTGGTGAGCCGTAGCTAGGAGTAGTGATACATTA
 AATGGAATATCCGAATTTATGGAAGTCATTCGTAGCCAGTC

Fragmento com 605 bp

Sublinhado o Br-fwd e a sequência complementar do Br-rev

3.3. Amostra Br3 – Primers Br – Colônia 8

GCTCAAAAATCATGGTGTACTGATTCAGAGGCTGTCATGATTAGCCAGTCGGCGATTAATATGAATGCTATAAATGAAATAGATTAAGGTTAG
 CGGTTTAGTTTGCTTCGGCGAATTAATAAAGCAGACTGAAATCGGTTTCTGCTGTGGCATGATAATTAATGTACCGTAGTTATAATTGACGTTG
 CCTTTGGATCGATTCGCTAATTTTATAGGTTGTGACGAATAGCCAGTCGGCGATCAATTTGAATGCTTAAGCTAAGAAATGAGTTTGTATTTG
 CAGGATTATTAGCTTCGGTTAATGAGAAATGTCTTATTTAAACTTGATTCTGCTATAGCAAGATGATTGATGAACCGTAGCTAAGAGTTGCATTG
 CCTTGAATTTGTGATTCCAATTTTGTAGTTGCTATGAATAGCCTGTGCGGTGACCGGTTTGAATGCGTTAAGGAATCATGTTATAATTTGCAGTA
 TTGATGCTTCGGTAATCGATACAGCTTATTTAACTTGGTTCTGATGACGTATGAAAATGTGGTGAGCCGTAGCTAGGAGTAGTGATACATTA
 AATGGAATATCCGAATTTATGGAAGTCATTCGTACCCAGTC

Fragmento com 605 bp

Sublinhado o Br-fwd e a sequência complementar do Br-rev

3.4. Amostra Br3 – Primers Br – Colônia 12

GCTCAAAAATCATGGTGTACTGATTCAGAGGCTGTCATGATTAGCCAGTCGGCGATTAATATGAATGCTATAAATGAAATAGATTAAGGTTAG
CGGTTTAGTTTGCTTCGGCGAATTAATAAAGCAGACTGAAATCAGTTTCTGCTGTGGCATGATAATTAATGTACCGTAGTTATAATTGACGTTG
CCTTTGGATCGATTCGCTAATTTTATAGGTTGTGACGAATAGCCAGTCGGCGATCAATTTTAAATGCTTAAGCTAAGAAATGAGTTTGTATTTG
CAGGATTATTAGTTTCGGTTAATGAGAATGTCTTATTAAGCTTGATTCTGCTATAGCAAGATGATTGATGAACCGTAGCTAAGAGTTGCATTG
CCTTGAATTTGTGATTCCAATTTTGTAGTTGCTATGAATAGCCTGTGGTGACCAGTTTGAATGCGTTAAGGAATCATGTTATAATTTGCAGTA
TTGATGCTTCGGCTAATCGAAGCAGAATACTGAAGACTTGGTTCTCATAGCCGAAGACAAGGTGGTGCGCCGCGCTGGCAGTAGTGATACATT
AAATGGAATATCCGAATTTATGGAAGTCATTCGTAGCCAGTC

Fragmento com 606 bp

Sublinhado o Br-fwd e a sequência complementar do Br-rev

3.5. Amostra Br4 – Primers Br – Colônia 6

GCTCAAAAATATGGTGTACTGATTCAGAGGCTGTCATGATTAGCCAGTCGGCGATTAATATGAATGCTATAAATGAAATAGATTAAGGTTAGC
GGTTTAGTTTGCTTCGGCGAATTAATAAAGCAGACTGAAATCAGTTTCTGCTGTGGCATGATAATTAATGTACCGTAGTTATAATTGACGTTGC
CCTTTGGATCGATTCGCTAATTTTATAGGTTGTGACGAATAGCCAGTCGGCGATCAATTTTAAATGCTTAAGCTAAGAAATGAGTTTGTATTTGC
AGGATTATTAGTTTCGGTTAATGAGAATGTCTTATTAAGCTTGATTCTGCTATAGCAAGATGATTGATGAACCGTAGCTAAGAGTTGCATTGC
CTTGAATTTGTGATTCCAATTTTGTAGTTGCTATGAATAGCCTGTGGTGACCAGTTTGAATGCGTTAAGGAATCATGTTATAATTTGCAGTAT
TGATGCTTCGGCTAATCGATACAGCTTATTTAACTTGGTTCTGATGATGATGAAAAATGTGGTGAGCCGTAGCTAGGAGTAGTGATACATTA
AAGGAATATCCGAATTTATGGAAGTCATTCGTAGCCAGTC

Fragmento com 604 bp

Sublinhado o Br-fwd e a sequência complementar do Br-rev

3.6. Amostra Br4 – Primers Br – Colônia 10

GCTCAAAAATCATGGTGTACTGAGGAAGTCATTCGTAGCCAGTCAGCGATTAATATGAATGCTATAAATGAAATAGATTAAGGTTAGCGGTTT
AGTTTGCTTCGGCGAATTAATAAAGCAGACTGAAATCGGTTTCTGCTGTGGCATGATAATTAATGTACCGTAGTTATAATTGACGTTGCCTTTG
GATCGATTCGCTAATTTTATAGGTTGTGACGAATAGCCAGTCGGCGATCAACTTGAATGCTTAAGCTAAGAAATGAGTTTGTATTTGCAGGAT
TATTAGCTTCGGTTAATGAGAATGTCTTATTAAACTTGATTCTGCTATAGCAAGATGATTGATGAACCGTAGCTAAGAGTTGCATTGCCTTGA
ATTTGTGATTCCAATTTTGTAGTTGCTATGAATAGCCTGTGGTGACCAGTTTGAATGCGTTAAGGAATCATGTTATAATTTGCAGTATTGATG
CTTCGGCTAATCGATACAGCTTATTTAACTTGGTTCTGATGATGATGAAAAATGTGGTGAGCCGTAGCTAGGAGTAGTGATACATTAATGGA
ATATCCGAATTTATGGAAGTCATTCGTAGCCAGTC

Fragmento com 598 bp

Sublinhado o Br-fwd e a sequência complementar do Br-rev

3.7. Amostra Br4 – Primers Br – Colônia 11

CTCAAAAATATGGTGTACTGGATGAAAGATTATTTGATGGTAACTTAAATGACGGAAGTCATTCGTAGCCAGTCGGCGATTAATATGAATGC
TATAAATGAAATAGATTAAGGTTAGCGGTTTAGTTTGCTTCGGCGAATTAATAAAGCAGACTGAGATCGGTTTCTGCTGTGGCATGATAATTA
TGTACCGTAGTTATGATTGACGTTGCCTTTGGATCGATTCGCTAATTTTATAGGTTGTGACGAATAGCCAGTCGGCGATCAATTTGAATGCTT

AAGCTAAGAAATGAGTTTGTATTGTCAGGATTATTAGCTTCGGTAAATGAGAATGTCTTATTTAAACTTGATTCTGCTATAGCAAGATGATTGA
TGAACCGTAGCTAAGAGTTGCATTGCCTTGAATTTGTGATTCCAATTTTTGAGTTGCTATGAATAGCCTGTGGTGACCAGTTTGAATGCGTTA
AGGAATCATGTTATAATTTGCAGTATTGATGCTTCGGCTAATCGATACAGCTTATTTAAACTTGGTTCTGATGATGTATGAAAATGTGGTGAGC
CGTAGCTAGGAGTAGTGATACATTAATGGAATATCCGAATTTATGGAATCATTCGTAGCCAGTC

Fragmento com 629 bp

Sublinhado o Br-fwd e a sequência complementar do Br-rev

3.8. Amostra Br4 – Primers Br – Colônia 18

GCTCAAAAATCATGGTGTACTGATTCAGAGGAAGTCATTCGTAGCCAGTCGGCGATTAATATGAATGCTATAAATGGAATAGATTAAGGTTAG
CGGTTTAGTTTGTTCGGCGAATTAATAAAGCAGACTGAAATCGGTTTCTGCTGTGGCATGATAATTAATGTACCGTAGTTATAATTGACGTTG
CCTTTGGATCGATTCGCTAATTTTATAGGTTGTGACGAATAGCCAGTCGGCGATCAATTTGAATGCTTAAGCTAAGAAATGAGTTTGTATTTG
CAGGATTATTAGCTTCGGTAAATGAGAATGTCTTATTTAAACTTGATTCTGCTATAGCAAGATGATTGATGAACCGTAGCTAAGAGTTGCATTG
CCTTGAATTTGTGATTCCAATTTTTGAGTTGCTATGAATAGCCTGTGGTGACCAGTTTGAATGCGTTAAGGAATCATGTTATAATTTGCAGCA
TTGATGCTTCGGCTAATCGATACAGCTTATTTAAACTTGGTTCTGATGATGTATGAAAATGTGGTGAGTCGTAGCTAGGAGTAGTGATACATTA
AATAGAATATCCGAATTTATGGAAGTCATTCGTAGCCAGTC

Fragmento com 605 bp

Sublinhado o Br-fwd e a sequência complementar do Br-rev

4. Sequências de fragmentos sequenciados de *Alternaria* sp.

4.1. Amostra Br2 – Primers SSM – Colônia 9

AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACACAAATATGAAGCGGGCTGGAACCTCTCGGGTTACAGCCTTGTGAATTATCACCTTGTCTTTT
CGGTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTGCCCCACCCTAGGACAAACATAAACCTTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATT
ACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGC
GTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAG
CAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT

Fragmento com 530 bp

Sublinhado o SSM-fwd e a sequência complementar do SSM-rev

4.2. Amostra Br4 – Primers SSM – Colônia 11

GTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCG
GCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATC
AGGTAGGGAT

Não está a sequência completa (Fragmento com 198 bp)

Sublinhado a sequência complementar do SSM-rev

5. Sequências de fragmentos sequenciados de *Botrytis cinerea*

5.1. Amostra Bo1 – Primers SSM – Colônia 2

AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTG
 CCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAACTCTTTTTATTAAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGA
 TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA
 TTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAG
 GCTCTAAAATCAGTGGCGGGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTT
 CTATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT

Fragmento com 499 bp

Sublinhado o SSM-fwd e a sequência complementar do SSM-rev

5.2. Amostra Bo2 – Primers SSM – Colônia 2

GTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCGAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCCT
 TCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAACTCTTTTTATTAAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCT
 CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG
 CGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCGCGTGCCT
 CAAATCGACCGGTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGAAACTATTTCGCTAAAGGGTGTTCGGGAGGCTACGCCGTAACAACCCCATTT
 CTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT

Fragmento com 499 bp

Sublinhado o SSM-fwd e a sequência complementar do SSM-rev

5.3. Amostra Bo2 – Primers SSM – Colônia 13

AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTG
 CCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAACTCTTTTTATTAAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGA
 TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA
 TTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCAGCTTGGTATTGAGTCCATGTGTCAGTAATGGCAG
 GCTCTAAAATCAGTGGCGGGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGCGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTT
 CTATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT

Fragmento com 498 bp

Sublinhado o SSM-fwd e a sequência complementar do SSM-rev

Anexo 9: Locais de restrição das enzimas seleccionadas nos fragmentos sequenciados

Nome: Amostra SSM1 – Primers SSM – Colónia 10

HindIII – Não corta

RsaI – Corta na posição 158, a sequência GTAC

Nome: Amostra SSM2 – Primers SSM – Colónia 1

HindIII – Não corta

RsaI – Corta na posição 342, a sequência GTAC

Nome: Amostra SSM1 – Primers Br – Colónia 1

HindIII – Não corta

RsaI – Corta na posição 166, a sequência GTAC

Nome: Amostra Br2 – Primers Br – Colónia 1

HindIII – Não corta

RsaI – Corta na posição 166, a sequência GTAC

Nome: Amostra Br3 – Primers Br – Colónia 8

HindIII – Não corta

RsaI – Corta nas posições 166 e 597, a sequência GTAC

Nome: Amostra Br3 – Primers Br – Colónia 12

HindIII- Corta na posição 321, a sequência AAGCTT

RsaI – Corta na posição 166, a sequência GTAC

Nome: Amostra Br4 – Primers Br – Colónia 6

HindIII – Corta na posição 320, a sequência AAGCTT

RsaI – Corta na posição 165, a sequência GTAC

Nome: Amostra Br4 – Primers Br – Colónia 10

HindIII – Não corta

RsaI – Corta na posição 160, a sequência GTAC

Nome: Amostra Br4 – Primers Br – Colónia 11

HindIII – Não corta

RsaI – Corta na posição 191, a sequência GTAC

Nome: Amostra Br4 – Primers Br – Colónia 18

HindIII – Não corta

RsaI – Corta na posição 166, a sequência GTAC

Nome: Amostra Br2 – Primers SSM – Colónia 9

HindIII – Corta na posição 356, a sequência AAGCTT

RsaI – Corta nas posições 98 e 349, a sequência GTAC

Nome: Amostra Bo1 – Primers SSM – Colónia 2

HindIII – Corta na posição 338, a sequência AAGCTT

RsaI – Corta na posição 156, a sequência GTAC

Nome: Amostra Bo2 – Primers SSM – Colónia 2

HindIII – Não corta

RsaI – Corta na posição 153, a sequência GTAC

Nome: Amostra Bo2 – Primers SSM – Colónia 13

HindIII – Não corta

RsaI – Corta na posição 343, a sequência GTAC