

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ” (ESALQ/USP)
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

MAURÍCIO JAMPANI DE SOUZA

O genoma mitocondrial de *Neophysopella tropicalis*

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à COC Ciências Biológicas como parte dos requisitos de obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Claudia Barros
Monteiro-Vitorello

**PIRACICABA
2024**

Resumo

O fungo *Neophysopella tropicalis*, anteriormente denominado como *Phakopsora euvtis*, foi encontrado no país pela primeira vez em 2004 e tornou-se endêmico das regiões Sul e Sudeste, principais regiões da viticultura no país. É classificado como heteróico e macrocíclico, no entanto apresenta apenas os estágios de urédio, télio e basídio, uma vez que os estágios de pécnio e aécio desenvolvem-se em *Meliosma myriantha*, ausente no país. Dessa forma, o fungo coloniza as videiras de maneira assexuada pela disseminação dos urediniósporos e teliósporos. Os danos causados à produção de uva, seja para a comercialização in natura, produção de suco ou vinho, são gerados pelo desenvolvimento de pústulas amareladas que fazem com que a taxa fotossintética diminua, prejudicando a formação das bagas. A partir do surgimento da doença, o uso de fungicidas para o controle e manutenção da produção foi consideravelmente aumentado, possibilitando o desenvolvimento de isolados resistentes à longo prazo. Levando em consideração o recente reagrupamento da espécie, o presente trabalho almeja extrair, sequenciar, montar e anotar o genoma mitocondrial do fungo, assim como analisar a posição filogenética do mesmo em comparação à outras ferrugens relacionadas e a expressão de genes mitocondriais em esporos germinados e no início da infecção, para visualização de possíveis mutações relacionadas à resistência. Para isso, o sequenciamento será realizado a partir da extração de DNA de alto peso molecular para utilização da plataforma MinION (Oxford Nanopore), assim como a montagem e anotação, que serão feitas por ferramentas de bioinformática e curadas manualmente. A expressão gênica será avaliada de acordo com dados do transcriptoma do fungo disponibilizados pelo laboratório o qual o trabalho será realizado.

Palavras chave: ferrugem-da-videira, sequenciamento, *long reads*, anotação *de novo*

1. Introdução

1. 1. A ferrugem da videira no Brasil

A doença da ferrugem da videira foi reportada pela primeira vez no país em 2001 no estado do Paraná (TESSMANN, 2004). Através de sua disseminação, majoritariamente pelo vento, tornou-se uma doença endêmica das regiões Sul e Sudeste do Brasil (Figura 1) (PRIMIANO *et al.*, 2017; EPPO, 2023).



Figura 1: Mapa do Brasil de acordo com a distribuição de *Neophysopella tropicalis*. Fonte: Organização Europeia e Mediterrânea para a Proteção de Plantas, EPPO (2023).

Em ambas regiões, os vinhedos são compostos de variedades provenientes de *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera* (CAMARGO, 2008). Tais variedades, quando suscetíveis ao fungo *Neophysopella tropicalis*, agente causador da ferrugem da videira, podem sofrer desfolha prematura pelo amarelecimento das folhas e, conseqüentemente, redução da qualidade dos frutos (WILCOX; GUBLER; UYEMOTO, 2015).

Além do fungo *N. tropicalis*, outras espécies da família *Phakopsoraceae* e da família *Uredinales* estão relacionadas à doença da ferrugem da videira, conhecida também como *Asian grape rust leaf* (AGLR), no entanto, recentemente uma parte da família *Phakopsora* foi reorganizada filogeneticamente, transformando-se em um novo gênero: *Neophysopella* (JI *et al.*, 2019; ONO *et al.*, 2020).

Através dos mesmos métodos utilizados para reorganização das espécies, considerando as sequências do gene do espaçador transcrito interno 2 (ITS2) e a região do domínio D1/D2 da subunidade maior (*large-subunit* - LSU) ribossomal (rDNA), foram identificadas duas espécies distintas no território brasileiro, *N. tropicalis* e *N. meliosmae-myrianthae* (SANTOS; PRIMIANO; AMORIM, 2020).

A distinção de ambas espécies no país foi observada geograficamente, sendo que *N. tropicalis* foi encontrado na região Centro-Sul, enquanto *N. meliosmae-myriathae* foi encontrado apenas na região Nordeste. Essas espécies são similares às encontradas no Sudeste Asiático e Australásia e no Japão e Taiwan, respectivamente (SANTOS; PRIMIANO; AMORIM, 2020; OKANE; ONO, 2017; POTA *et al.*, 2015).

A introdução da doença no país como foi sugerida por Okane e Ono (2017) se relaciona com ações antrópicas, embora Santos e colaboradores (2020) também defendam a chegada da doença pela dispersão aérea de esporos vindos da Ásia, uma vez que no mesmo ano em que a ferrugem da videira foi reportada, também ocorreu o primeiro caso de ferrugem asiática da soja, ambos no estado do Paraná, sugerindo uma dispersão atmosférica de esporos (TESSMANN *et al.*, 2004; YORINORI *et al.*, 2005).

A partir de sua disseminação, a utilização de fungicidas aumentou para combater a doença rapidamente, no entanto, com o aumento nas frequências de aplicações, veio também o desenvolvimento de isolados de *Neophysopepla* resistentes aos químicos utilizados (PRIMIANO *et al.*, 2017).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os fungicidas recomendados para o combate contra a ferrugem da videira são: tebuconazol e tetraconazol (inibidores de desmetilação de esterol) e uma mistura de piraclostrobina (inibidor de quinona externa) e metiram (ditiocarbamato) (AGROFIT, 2024). Os inibidores de quinona externa (do inglês quinone outside inhibitors, QoI), em específico, fazem com que a produção de energia nos esporos do fungo seja limitada, dificultando sua germinação nas folhas das plantas. Esses compostos são inibidores da cadeia respiratório uma vez que se ligam ao sítio Qo do complexo do citocromo b e

bloqueiem a passagem de elétrons, impossibilitando a síntese de adenosina trifosfato (ATP) (BAYER, 2021; SANTOS et al., 2021).

1. 2. As mitocôndrias em fungos e seu mitogenoma (mtDNA)

As mitocôndrias são responsáveis pela quebra oxidativa de glicose e ácidos graxos, sendo a principal fonte de energia para o metabolismo dos seres vivos.

Em fungos e em outros organismos a quebra da glicose (glicólise) é feita no citosol, sendo originado o piruvato, o qual é transportado para a matriz da mitocôndria e oxidado, transformando-se em acetil-CoA. O acetil-CoA, participa do ciclo do ácido cítrico (ou ciclo de Krebs), em que sofre oxidação e transforma-se em CO_2 , resultando ainda na redução de NAD^+ e FAD para NADH e FADH_2 . Tais moléculas, após passarem por reações de transferências de elétrons na membrana interior da mitocôndria, geram um gradiente de prótons, que possibilita a síntese de adenosina trifosfato (ATP) (Figura 2) (COOPER, 2019).

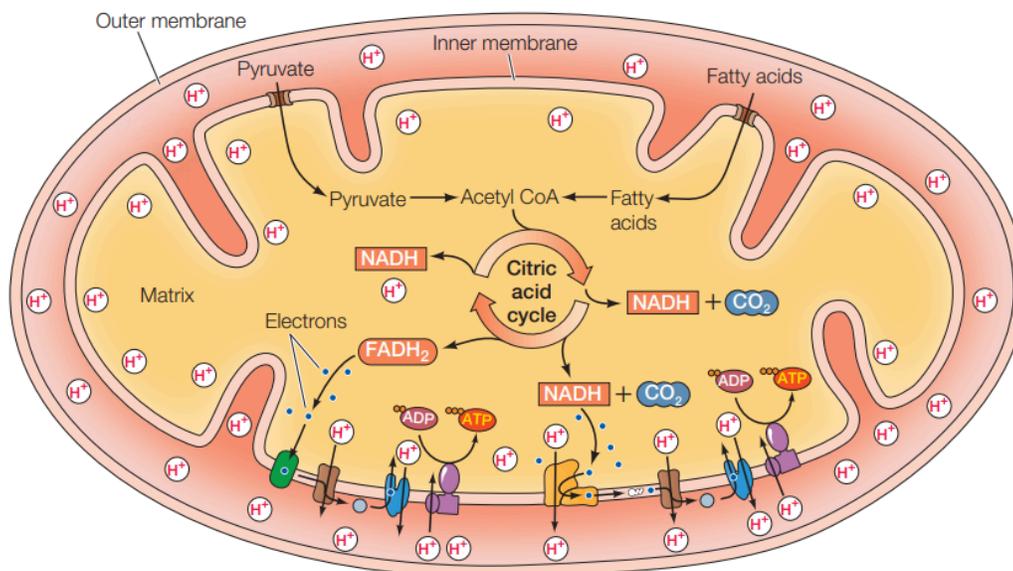


Figura 2: Metabolismo oxidativo em mitocôndrias. Fonte: COOPER, 2019.

Os mitogenomas são tipicamente conservados em fungos, contendo 14 *protein-code* genes, envolvidos na cadeia de transporte de elétrons e na síntese de ATP, sendo eles: subunidades 1, 2 e 3 do citocromo oxidase; subunidades 1, 2, 3, 4, 5,

6 e 4I da NADH desidrogenase; subunidades 6, 8 e 9 da ATP sintase e apocitocromo B. Além destes, estão presentes os genes ribossomais da subunidade maior (*rnL*) e menor (*rnS*), o gene da proteína ribossomal S3 (*rsp3*), o gene que codifica a subunidade de RNA da RNase P mitocondrial (*mnpB*) e os RNAs transportadores, que variam de 20 a 31 genes distintos (KULIK; DIEPENINGEN; HAUSNER, 2021).

No entanto, entre os mitogenomas fúngicos, existe uma ampla gama de eventos de alterações estruturais que fazem com que o tamanho seja dinâmico, podendo aumentar diante de eventos de aquisição de elementos repetitivos, íntrons e/ou outros elementos móveis. Da mesma forma os mitogenomas podem sofrer redução através de perdas de íntrons ou até mesmo de genes que ao longo do processo evolutivo foram transferidos para o genoma nuclear, gerando uma variação de 20 kb (em *Candida glabrata*) até 235 kb (em *Rhizoctonia solani*) (SANDOR et al., 2018).

Como revisado por Sandor e colaboradores (2018), os íntrons são os principais elementos que atuam na variação do tamanho dos genomas mitocondriais, sendo sua presença/ausência e até mesmo a diferença na quantidade de íntrons por gene os principais fatores que possibilitam a grande diferença de tamanho entre as diferentes espécies de fungos.

Os íntrons podem ser divididos em dois grupos, diferenciando-se entre os tipos de RNAs enzimáticos (ribozimas) que eles contêm em suas sequências. O grupo I pode estar presente em genes como rRNAs, tRNAs e os codificantes de proteínas, sendo mais abundantes em mitocôndrias de fungos e plantas, mas inseridos em outros genomas, como o nuclear em alguns protozoários. Quanto ao grupo II, eles ocorrem apenas em genes de genomas de mitocôndrias e de cloroplastos, sendo que em sua maioria estão presentes em genes codificantes de proteínas (SALDANHA et al., 1993).

Tal diferenciação entre os tipos de ribozimas diz respeito às diferentes estruturas secundárias dos íntrons e conseqüentemente, distintos métodos de splicing. Os íntrons do grupo I sofrem o auto splicing a partir de duas reações de transesterificação iniciadas pela característica nucleofílica da estrutura secundária formada de se direcionar à guanosina localizada 5' do sítio de corte, enquanto os íntrons do grupo II passam pelo auto splicing a partir da formação de um laço entre a região 5' e 3' do

mesmo por uma ligação 2'-5 fosfodiéster, que geralmente ocorre em resíduos de adenosina (Figura 3) (SALDANHA et al., 1993).

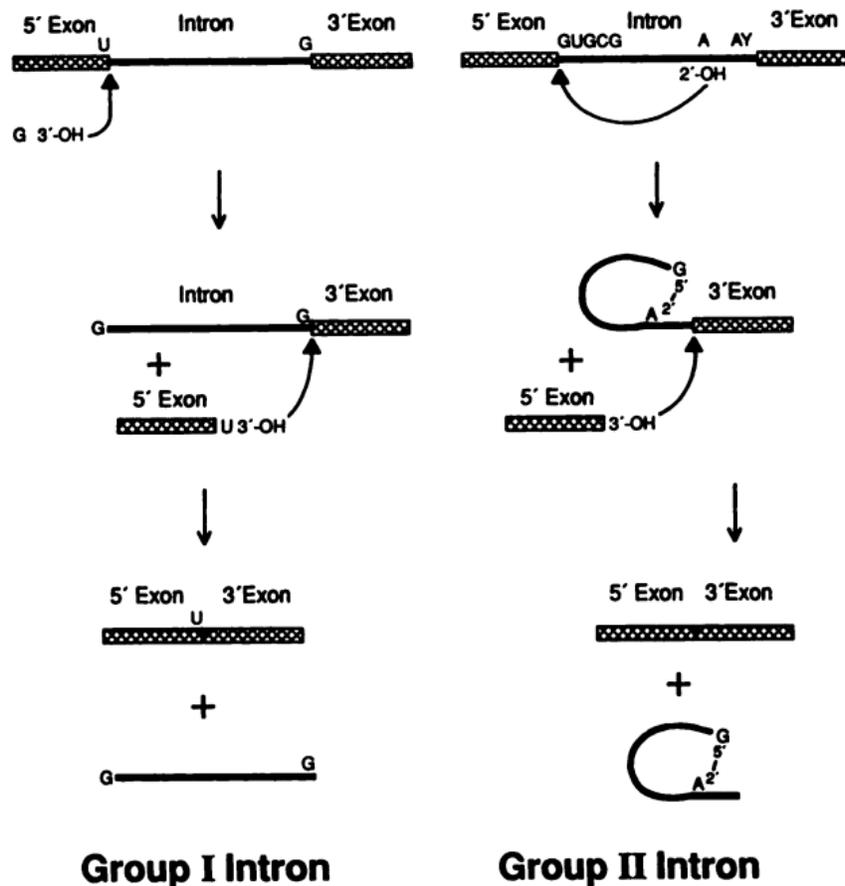


Figura 3: *Auto splicing* em íntrons de grupo I e II. Fonte: SALDANHA et al., 2019.

Além disso, os íntrons também podem estar associados à virulência e a resistência à fungicidas, como elucidado por Grasso e colaboradores (2006). Por exemplo, o gene do citocromo b foi estruturalmente caracterizado, e observou-se que existem algumas regiões, denominadas *hot spots*, que conferiam resistência aos fungicidas do tipo QoI (inibidores de quinona externa), sendo essas regiões presentes entre os aminoácidos 120-160 e 250-300, especificamente visualizados como as seguintes substituições: G143A e F129L.

Em genomas de espécies de *Neophysopeila*, pela primeira vez foi observado a ausência do íntron entre os códons 143 e 144, sendo sugerido que a mutação G143A poderia estar sujeita a acontecer uma vez que não seria letal, pois sem a região

intrônica entre esses códons, não existem problemas relacionados ao splicing alternativo gerar uma proteína disfuncional (SANTOS et al., 2021).

2. Justificativa

Com o aquecimento global, a América do Sul tem apresentado aumento nas taxas de variação de temperatura, variando de +2 °C até +3 °C em algumas localidades, além do aumento da taxa de precipitação (40%-50% a mais do que o normal) em regiões como o Sul e o Sudeste (Figura 4), sendo que no Sudeste esse aumento se relacionou com eventos extremos de chuva contínua durante poucos dias segundo a avaliação da Organização Meteorológica Mundial (World Meteorological Organization - WMO) do ano de 2023 para a América Latina e o Caribe (WMO, 2024).

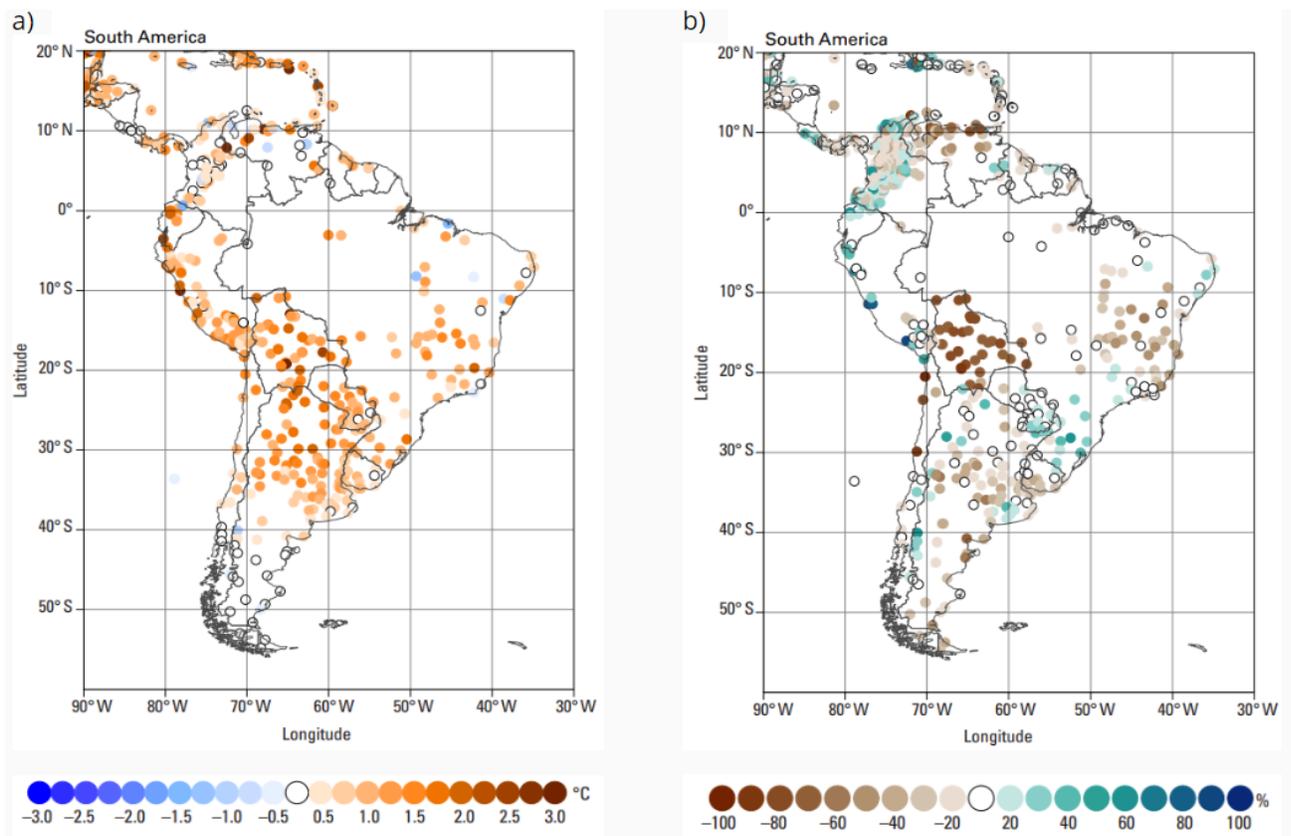


Figura 4: a) Anomalias relacionadas à temperatura do ar em 2023 (dados relativos à 1991 - 2020); b) Anomalias relacionadas à precipitação em 2023 (dados relativos à 1991 - 2020). As escalas de cor estão abaixo das imagens, sendo respectivas à imagem que o acompanha. Adaptado de WMO, 2024.

A realidade das mudanças climáticas podem ter consequências como o impacto na qualidade e quantidade de uva e vinho produzidos e na durabilidade do vinho, além de potencializar o desenvolvimento de doenças fúngicas, que se beneficiam de fatores climáticos como altas temperaturas e umidade (ASHENFELTER; STORCHMANN, 2016), e especificamente em relação a *Neophytophthora tropicalis* e seu processo de infecção em videiras, uma vez que foi determinado que a faixa de temperatura ideal para que o fungo se desenvolva é de 20 a 30 °C (RASERA, 2020).

Somado a isso, existe também o envolvimento da mitocôndria no processo infectivo do fungo, assim como sua patogenicidade e virulência, por apresentar genes expressos durante o crescimento das hifas, do biofilme e do fungo, consequentemente (KULIK, DIEPENINGEN, HAUSNER, 2021; MEDINA *et al.*, 2020). Por exemplo, no complexo de espécies de *Heterobasidium annosum* o agente causal de doenças em raízes de coníferas, a virulência está sob o controle do genoma mitocondrial. Esse trabalho ainda possibilita o estudo de isolados quanto a caracterização de genes conhecidos como envolvidos na resistência a fungicidas. Com a definição da sequência completa do genoma e das proteínas codificadas, genes que promovem resistência a fungicidas do tipo *QoI* podem ser identificados com base em desenho de primers e sequenciamento na busca de mutações.

O ponto de partida deste trabalho é a caracterização genômica de *Neophytophthora tropicalis*, a fim de abordar a identificação de genes mitocondriais, buscando encontrar os *core genes* e os possíveis genes não conservados (ncORFs, *non conserved ORFs*) para construção de árvores filogenéticas, que podem utilizar-se das proteínas codificadas concatenadas, ou apenas de um gene, como o *cox1* (ALMEIDA *et al.*, 2021) para a solidificação da divisão das espécies pertencentes ao gênero *Neophytophthora* e seus relativos, que foram recentemente alterados (JI *et al.*, 2019).

3. Objetivos

3. 1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é elucidar o genoma mitocondrial e nuclear de *Neophytophthora tropicalis*.

3. 2. Objetivos específicos

- I. Extrair DNA de alto peso molecular do fungo *Neophysopella tropicalis*;
- II. Sequenciar, montar e anotar as sequências de DNA obtidas;
- III. Validação da montagem com a amplificação de segmentos do DNA mitocondrial e sequenciamento em casos de regiões repetitivas e sequências intrônicas.
- IV. Construção de árvores filogenéticas para identificação dos isolados dentro do gênero *Neophysopella* e sua proximidade com outras espécies correlatas.

4. Material e métodos

O presente trabalho será desenvolvido no laboratório de microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”, dentro do grupo *Genomics* e localizado no departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), da Universidade de São Paulo, em Piracicaba (SP).

4. 1. Extração de DNA de alto peso molecular

A obtenção do DNA de alto peso molecular foi realizada seguindo o protocolo de Schwessinger & Rathjen (2017) com adaptações.

4. 2. Sequenciamento através da plataforma MinION Oxford Nanopore

Os kits de sequenciamento utilizados serão o *Ligation Sequencing Kit* (SQK-LSK114) e o *Rapid Sequencing Kit* (SQK-RAD114), que variam quanto à quantidade de DNA utilizado para a montagem da biblioteca e o tempo de preparação. Além disso, a *flow cell* utilizada será a R10.4.1, para o sequenciamento de sequências longas de DNA.

4. 3. Amplificação de regiões para a validação do sequenciamento e da anotação dos genes

As regiões selecionadas terão os primers desenhados através do software Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000). A avaliação da formação de pareamentos inesperados, assim como a formação de dímeros e de alças será realizada pela

ferramenta OligoAnalyzer™ (disponível em: <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer?returnurl=%2Fcalc%2Fanalyzer#>).

A amplificação será feita a partir do kit ---, seguindo as orientações do fabricante. A verificação dos amplicons gerados será feita por eletroforese em gel de agarose (1%) e purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). A concentração das amostras será medida pelo espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific).

5. Forma de análise dos resultados

5. 1. Montagem dos *contigs de novo*

Para a montagem dos *contigs de novo* (sem uma sequência de referência), serão utilizados *softwares* disponíveis no laboratório, como o CLC Workbench v 20.0.4 (QIAGEN) e o Flye Assembler v 2.9.1 (KOLMOGOROV *et al.*, 2019).

5. 2. Escolha de um *contig* e anotação dos genes

Através da comparação com genomas de espécies próximas filogeneticamente pela ferramenta de *Whole genome alignment*, disponível no CLC Workbench v 20.0.4, será escolhido um *contig* para a anotação dos genes.

A anotação será realizada através da comparação entre dois *softwares* como o mitos2 na versão beta (DONATH *et al.*, 2019) e o conjunto MFannot/RNA weasel (disponível em <https://megasun.bch.umontreal.ca/apps/mfannot/>) e <https://megasun.bch.umontreal.ca/apps/rnaweasel/>), além da verificação manual dos genes preditos e das proteínas formadas, através da utilização de ferramentas como ExPASy - *Translate tool* (GASTEIGER *et al.*, 2003) em conjunto com o BLAST (ALTSCHUL, 1990).

5. 3. Construção da árvore filogenética

Através do alinhamento dos *core genes* concatenados pela ferramenta MUSCLE presente no *software* Mega X e da utilização do programa Mr. Modeltest v. 2.3 (<https://github.com/nylander/MrModeltest2>), serão construídas árvores filogenéticas que considerem todos os genes, apenas o gene *cox1* e apenas o gene *cob*.

O gene *cox1* será utilizado para a comparação com árvores recém elaboradas, como em Almeida e colaboradores (2021), que construíram uma árvore filogenética para a localização da ferrugem da murta (*Austropuccinia psidii*)

Por sua vez, o gene *cob* será utilizado para a análise da presença de possíveis mutações e íntrons, para posterior discussão sobre o desenvolvimento de resistência à fungicidas nos isolados utilizados.

6. Plano de trabalho e cronograma de execução

Atividades	Mês						
	Em andamento	1º	2º	3º	4º	5º	6º
Revisão da literatura							
Extração de DNA do fungo							
Montagem do genoma mitocondrial							
Anotação e análise da expressão dos genes mitocondriais							
PCR e sequenciamento dos <i>amplicons</i>							
Escrita do trabalho de conclusão de curso							
Defesa do trabalho de conclusão de curso							

7. Referências bibliográficas

AGROFIT, 2024. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em:
http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 17 out. 2024.

ALMEIDA, A. et al. Revealing the high variability on nonconserved core and mobile elements of *Austropuccinia psidii* and other rust mitochondrial genomes. **PLoS ONE**, 2021. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7951889/pdf/pone.0248054.pdf>. Acesso em: 11 out. 2024.

ASHENFELTER, O.; STORCHMANN, K. Climate change and wine: A review of the economic implications. **Journal of Wine Economics**, 2016. Disponível em:

<https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-wine-economics/article/climate-change-and-wine-a-review-of-the-economic-implications/D8D4815CA247669EAA58929FA2F7CDDD>. Acesso em: 2 out. 2024.

BAYER. **Fungicide modes of action**. Bayer Crop Science, 2021. Disponível em: <https://www.cropscience.bayer.us/articles/bayer/fungicide-modes-action>. Acesso em: 12 out. 2024.

CAMARGO, U. A. **Impacto das cultivares brasileiras de uva no mercado interno e potencial no mercado internacional**. In: REUNIÃO ANUAL DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008, Curitiba. Anais. Brasília, DF: Embrapa, 2008. p. 10-12.

COOPER, G. M. **Mitochondria, Chloroplasts, and Peroxisomes**. In: COOPER, G. M. *The cell: a molecular approach*. 8. ed. New York: Oxford University Press, 2019. p. 425-452.

EPPO. **Distribution of *Neophytopella euvitis***. EPPO, 2023. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/PHLLAM/distribution>. Acesso em: 22 set. 2024.

GRASSO, V., PALERMO, S., SIEROTZKI, H., GARIBALDI, A., & GISI, U. (2006). Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. **Pest Management Science**, 62(6), 465–472. doi:10.1002/ps.1236

Ji, J.-X., Li, Z., Li, Y., & Kakishima, M. (2019). Life cycle of *Nothoravenelia japonica* and its phylogenetic position in Pucciniales, with special reference to the genus *Phakopsora*. **Mycological Progress**, 18(6), 855–864. doi:10.1007/s11557-019-01496-0

KULIK, T.; DIEPENINGEN, A. V.; HAUSNER, G. Editorial: The Significance of Mitogenomics in Mycology. **Frontiers in Microbiology**, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.628579/full>

#B26. Acesso em: 10 out. 2024.

MEDINA, V. et al. Fungal Mitogenomes: Relevant Features to Planning Plant Disease Management. **Frontiers in Microbiology**, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.00978/full>. Acesso em: 6 out. 2024.

MORAES, R. **Avaliação de uma região hotspot do gene citocromo b para resistência aos fungicidas inibidores da quinona oxidase (QoI) em patógenos de uva Niágara Rosada**. 2016. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.11.2016.tde-09112016-140553>. Acesso em: 5 out. 2024.

OKANE, I.; ONO, Y. Phylogenetic study of indigenous grapevine leaf rust fungi in North America and biological identity of an invasive grapevine leaf rust fungus in Brazil. **Mycoscience**, 2017. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/mycosci/59/2/59_MYC59099/_pdf/-char/en. Acesso em: 14 set. 2024.

ONO, Y. et al. Taxonomy of Southeast Asian-Australasian grapevine leaf rust fungus and its close relatives. **Mycological Progress**, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11557-020-01607-2>. Acesso em: 27 set. 2024.

POTA, V. et al. Taxonomic identity of a Phakopsora fungus causing the grapevine leaf rust disease in Southeast Asia and Australasia. **Mycoscience**, 2015. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/mycosci/56/2/56_MYC56198/_article/-char/en. Acesso em: 12 set. 2024.

PRIMIANO, I. V. et al. Asian grapevine leaf rust caused by Phakopsora euvitis: an important disease in Brazil. **Plant Pathology**, 2017. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.12662>. Acesso em: 19 set.

2024.

RASERA, J. B. **Efeito da temperatura na interação entre *Neophysopella tropicalis* e as videiras cv. Niágara Rosada e cv. Cabernet Sauvignon**. 2020. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11144/tde-01042021-134547/publico/Julia_Boscariol_Rasera.pdf. Acesso em: 3 out. 2024.

ROZEN, S., SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, editors. **Bioinformatics Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press; 2000. pp. 365–386.

SALDANHA, R., MOHR, G., BELFORT, M., & LAMBOWITZ, A. M. (1993). Group I and group II introns. **The FASEB Journal**, 7(1), 15–24. doi:10.1096/fasebj.7.1.8422962

SANDOR, S., ZHANG, Y., & XU, J. (2018). Fungal mitochondrial genomes and genetic polymorphisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**. doi:10.1007/s00253-018-9350-5

SANTOS, M. S. et al. Lack of an Intron in Cytochrome b and Overexpression of Sterol 14 α -Demethylase Indicate a Potential Risk for QoI and DMI Resistance Development in *Neophysopella* spp. on Grapes. **Phytopathology**, 2021. Disponível em: 10.1094/PHYTO-11-20-0514-R Acesso em: 30 set. 2024.

SANTOS, M. S.; PRIMIANO, I. V.; AMORIM, L. Identification and pathogenicity of *Neophysopella* species associated with Asian grapevine leaf rust in Brazil. **Plant Pathology**, 2020. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.13274>. Acesso em: 25 set. 2024.

SCHWESSINGER, B., RATHJEN, J. P. (2017). Extraction of High Molecular Weight DNA from Fungal Rust Spores for Long Read Sequencing. **Methods in Molecular Biology**, 1659, 29-35. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7249-4_3

TESSMANN, P. A. et al. Ferrugem da videira causada por *Phakopsora euvitidis*, uma nova doença para o Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/jfb/a/HX3mRv6yvccN7jphjFbtNYQ/?lang=en>. Acesso em: 15 set. 2024.

WMO. **State of the Climate in Latin America and the Caribbean**. World Meteorological Organization, 2024. Disponível em: https://library.wmo.int/viewer/68891/download?file=1351_State_of_the_Climate_in_LAC_2023_en.pdf&type=pdf&navigator=1. Acesso em: 9 out. 2024.

WILCOX, W. F.; GUBLER, W. D.; UYEMOTO, J. K. Compendium of grape diseases, disorders, and pests. 2. ed. **American Phytopathological Society**, 2015. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/book/10.1094/9780890544815>. Acesso em: 16 set. 2024.

YORINORI, J. T. et al. Managing soybean rust. **Plant Disease**, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PD-89-0675>. Acesso em: 8 out. 2024.



Maurício Jampani de Souza



Claudia Barros Monteiro-Vitorello



COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA - ESALQ/USP

CERTIFICAÇÃO DE DOCENTE

A Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa (CEAP), Ad Referendum, **CERTIFICOU** a Prof^a. Dr^a. **Claudia Barros Monteiro Vitorello**, Departamento de Genética, pelo período de **22/09/2024 à 21/09/2027**.

Piracicaba, 13 de agosto de 2024.

Prof. Dr. Antonio Sampaio Baptista
Presidente da CEAP/ESALQ/USP