



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Plasmopara viticola* E
MAPEAMENTO DE QTLs DE RESISTÊNCIA AO MÍLDIO EM
VIDEIRA (*Vitis* spp.)**

Liamar Maria dos Anjos

Brasília-DF

2013

Liamar Maria dos Anjos

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Plasmopara viticola* E
MAPEAMENTO DE QTLs DE RESISTÊNCIA AO MÍLDIO EM
VIDEIRA (*Vitis* spp.)**

Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Fitopatologia pelo Programa de Pós Graduação em Fitopatologia.

Orientador
Márcio Elias Ferreira, Ph.D.

BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL – BRASIL
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Anjos, Liamar Maria dos
DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Plasmopara viticola* E MAPEAMENTO DE
QTLs DE RESISTÊNCIA AO MÍLDIO EM VIDEIRA (*Vitis* spp.) / Liamar Maria dos
Anjos.

Brasília, Novembro 2013.

277p. : il.

Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de
Brasília, Brasília.

1. Fitopatologia. 2. *Plasmopara viticola*. 3. Diversidade genética. 4. Resistência ao
míldio. 5. Estrutura de populações. 6. Marcadores microssatélites. 7. *Vitis vinifera*.
8. Mapeamento de QTL.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Título.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Professor Dr. Márcio Elias Ferreira, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Embrapa Uva e Vinho.

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Plasmopara viticola* E MAPEAMENTO DE QTLs
DE RESISTÊNCIA AO MÍLDIO EM VIDEIRA (*Vitis* spp.)

Liamar Maria dos Anjos

TESE APROVADA em 29/11/2013 por:

Prof. Dr. Adalberto Corrêa Café Filho
Universidade de Brasília/Fitopatologia

Prof. Dr. Juvenil Enrique Cares
Universidade de Brasília/Fitopatologia

Dra. Patrícia Silva Ritschel
Examinador Externo (Embrapa Uva e Vinho)

Dr. Paulo Hideo Nakano Rangel
Examinador Externo (Embrapa Arroz e Feijão)

Dr. Márcio Elias Ferreira
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Orientador (Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2013

*Aos meus pais Maria das Dores e Antonio dos Anjos,
minhas filhas Sinara, Cecilia e Cinthia,
meu companheiro Edson Pedrosa.
Por acreditarem em mim e no meu trabalho!
Por todo amor e compreensão!*

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília, aos professores Carlos Uesugi, Dianese, Juvenil, Café, Claudio Costa, Alice Nagata, Renato Resende e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade e cooperação. O meu especial agradecimento à professora Marisa Ferreira pela amizade e orientação no início desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos durante o curso.

Ao pesquisador Dr. Márcio Elias Ferreira por concordar em ser meu orientador e junto comigo investir num campo ainda pouco explorado na genética de *Plasmopara viticola*, pelo seu empenho para que este trabalho fosse desenvolvido com excelência.

À pesquisadora Dra. Patrícia Silva Ritschel por acreditar no meu trabalho, pela amizade e suporte financeiro para análises dos ensaios desenvolvidos em Jales-SP.

À equipe de trabalho da Embrapa Uva e Vinho de Jales-SP que me auxiliaram nas análises de fenotipagem e coleta de míldio. Meu especial agradecimento ao Pesquisador Dimas, ao técnico João da Mata e ao Botelho pela dedicação e apoio. Aos pesquisadores Reginaldo, Rosimeire, Marco Antonio, todos os funcionários de campo, estagiários e amigas Ana Paula, Ester e Angela (esposa do Dimas). Gostaria de registrar aqui a convivência harmoniosa que tive com todos na Estação Experimental de Jales.

Ao Laboratório de Genética Vegetal – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia que me acolheu para realização de todos os experimentos apresentados neste trabalho.

Aos demais pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN, que tive a oportunidade de conviver durante o curso, pela amizade e pelo suporte que de alguma forma muitos concederam, Márcio Moretzsohn, Marco Antonio, Gláucia e Vânia Azevedo. Meus agradecimentos à Zilneide e Lorena pela preciosa amizade e

empenho até a finalização dos trabalhos. Aos meus amigos e amigas do laboratório: Ediene, Rodrigo, Sabrina, Carlos Ragassi, Dione, Dani, Natália, Eric, Alexandre, Bruna, Andrea, Leandro e aos amigos do CENARGEN: Noel Gomes, Peron e Henrique.

Ao meu amigo Justino que me ajudou dentro e fora do laboratório, sempre ao meu lado e pegando no pesado comigo quando necessário.

Ao meu amigo Alexandre Martins, pela amizade e ajuda no desenvolvimento dos marcadores microssatélites.

Aos estagiários e estudantes que passaram pelo Laboratório de Genética Vegetal nesse período, que de uma forma ou outra se tornaram amigos e companheiros de dúvidas e alegrias.

Aos membros da banca examinadora: Dr. Adalberto Corrêa Café Filho, Dr. Juvenil Enrique Cares, Dr. Paulo Hideo Nakano Rangel e Dra. Patrícia Silva Ritschel, pelas sugestões e comentários imprescindíveis para o enriquecimento deste trabalho.

Às minhas filhas Sinara, Cecília e Cinthia e aos meus pais, que acreditaram em mim e sempre incentivaram meus objetivos profissionais e me apoiaram nos momentos para decisão por mudanças radicais na minha vida pessoal e profissional. Ao meu irmão Ademir e irmãs Lucimar, Laura, Tania e minha sobrinha Bianca. Aos meus genros Frederico e Reinaldo e principalmente à minha linda netinha Gabriela.

Ao meu companheiro e melhor amigo do mundo, Edson Pedrosa, que suportou todos os meus choros, incertezas, ansiedades e dificuldades nessa caminhada. Por ele sempre estar ao meu lado com muito carinho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. Recursos genéticos da videira	1
1.2. Produção de uva no Brasil.....	4
1.3. Míldio da videira.....	11
1.4. Etiologia do míldio da videira	13
1.5. Epidemiologia e sintomas de <i>Plasmopara viticola</i>	13
1.6. Raças fisiológicas de <i>Plasmopara viticola</i>	18
1.7. Diversidade genética e estrutura de populações de <i>Plasmopara viticola</i>	20
1.8. Resistência genética da videira a <i>Plasmopara viticola</i>	24
1.9. Sequenciamento de genomas: Next Generation Sequencing – NGS.....	31
1.10. O genoma de <i>Plasmopara viticola</i>	33
1.11. Genoma da videira.....	34
1.12. Marcadores moleculares	37
1.13. Mapeamento genético.....	39
1.14. Estratégia de mapeamento genético utilizando pseudo-cruzamento teste.....	41
1.15. Mapeamento de QTL (<i>Quantitative Trait Loci</i>)	42
1.16. Mapeamento de QTL de resistência ao míldio	44
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

CAPÍTULO 1: Desenvolvimento e validação de marcadores microssatélites para análise da diversidade genética e estrutura de populações de *Plasmopara viticola* no Brasil..... 61

RESUMO..... 61

ABSTRACT..... 63

1.1 INTRODUÇÃO..... 65

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Extração de DNA genômico de *Plasmopara viticola* para sequenciamento NGS (*Next Generation Sequencing*)

1.2.2 Sequenciamento NGS e montagem do genoma de *Plasmopara viticola*

1.2.3 Critérios para seleção dos locos microssatélites de *Plasmopara viticola*.....

1.2.4 Coleta e extração de DNA de isolados de *Plasmopara viticola* de diferentes regiões do Brasil.....

1.2.5 Validação de novos marcadores microssatélites desenvolvidos para análise genética de populações de *Plasmopara viticola*

1.2.6 Análises estatísticas dos dados dos marcadores microssatélites desenvolvidos

1.2.7 Avaliação da Diversidade Genética e da Estrutura de População de *P. viticola*.....

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
1.3.1 Montagem <i>de novo</i> do genoma de <i>Plasmopara viticola</i> para desenvolvimento de novos marcadores microssatélites para a espécie.....	86
1.3.2 Detecção de sequências microssatélites no genoma de <i>Plasmopara viticola</i>	89
1.3.3 Validação dos novos marcadores microssatélites desenvolvidos para análise genética de populações de <i>Plasmopara viticola</i>	98
1.3.4 Caracterização genotípica de isolados de <i>Plasmopara viticola</i> coletados em regiões produtoras de uva do Brasil	102
1.3.5 Estrutura genética de populações de <i>Plasmopara viticola</i>	106
1.3.6 Testes de independência a classificação de <i>Plasmopara viticola</i> em subpopulações e a origem das amostras coletadas	114
1.4 CONCLUSÕES	122
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
CAPÍTULO 2: Mapeamento de QTLs de Resistência ao Agente Causal do Míldio (<i>Plasmopara viticola</i>) em Progênie de Híbridos de Videira (<i>Vitis</i> spp.).....	128
RESUMO	128
ABSTRACT	130
2.1 INTRODUÇÃO.....	132
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	135
2.2.1 População de mapeamento genético	136
2.2.2 Extração e quantificação de DNA	137
2.2.3 Seleção de locos microssatélites para genotipagem	138
2.2.4 Genotipagem da progênie F1 e dos genitores com marcadores microssatélites	139
2.2.5 Fenotipagem: bioensaio em ambiente controlado	142
2.2.6 Fenotipagem da progênie F1 do cruzamento CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 para resistência a <i>Plasmopara viticola</i>	145
2.2.7 Fenotipagem: avaliação de resistência ao míldio em condições de campo	146
2.2.8 Análise de segregação e construção de mapa de ligação	150
2.2.9 Detecção de QTLs	152
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	154
2.3.1 Triagem e seleção de microssatélites.....	154
2.3.2 Genotipagem da população F1 do cruzamento CNPUV733-34 x CNPUV1103-88 ..	155
2.3.3 Construção de mapa genético pela estratégia de pseudo-cruzamento teste	156
2.3.4 Construção de mapas genético dos parentais	161
2.3.5 Fenotipagem da população segregante do cruzamento entre CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 em campo e em bioensaios de laboratório	167
2.3.6 Mapeamento de QTLs de resistência ao míldio	173

2.3.7 Localização dos QTLs de resistência ao míldio em videira.....	180
2.4 CONCLUSÕES.....	187
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	189
ANEXO 1 – Capítulo 1.....	196
ANEXO 2 – Capítulo 2.....	200

LISTA DE TABELAS

Introdução Geral

Tabela 1. Produção de uvas no Brasil, em toneladas. Fonte: Embrapa Uva e Vinho, disponível em <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/>..... 6

Tabela 2. Produção de vinhos, sucos e derivados produzidos no do Rio Grande do Sul, em litros. Fonte: Embrapa Uva e Vinho, disponível em <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/>..... 9

Tabela 3. Balanço das exportações e importações de uvas, sucos de uvas, vinhos e derivados: valores em 2010/2012. Fonte: Embrapa Uva e Vinho, disponível em <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/>..... 9

Capítulo 1

Tabela 1.1. Identificação e origem de 92 isolados de *Plasmopara viticola* coletados em diferentes acessos de *Vitis* spp., em regiões produtoras de uva de diferentes Unidades da Federação..... 76

Tabela 1.2. Marcadores microssatélites de *Plasmopara viticola* utilizados como controle na avaliação dos novos marcadores desenvolvidos no presente estudo..... 80

Tabela 1.3. Resultados do sequenciamento NGS do genoma de *Plasmopara viticola* através de DNA obtido de lesão causada pelo fungo em folhas da cultivar Cabernet Sauvignon de *Vitis vinifera*. As sequências de *Vitis vinifera* foram identificadas e eliminadas do banco de dados de sequências de *P. viticola*..... 88

Tabela 1.4. Resultados da montagem *de novo* de segmentos do genoma de *Plasmopara viticola* através de sequenciamento NGS de DNA extraído de lesão causada pelo fungo em folhas da cultivar Cabernet Sauvignon de *Vitis vinifera*..... 88

Tabela 1.5. Dados de avaliação da montagem <i>de novo</i> de segmentos do genoma de <i>Plasmopara viticola</i> através de sequenciamento NGS.....	89
Tabela 1.6. Distribuição de sequências de microssatélites no genoma de <i>Plasmopara viticola</i> . Apenas as sequências perfeitas de di, tri e tetranucleotídeos com mínimo de 9 repetições do motivo foram consideradas no desenvolvimento de marcadores microssatélites.....	90
Tabela 1.7. Sequência de DNA contendo região microssatélite (em vermelho) utilizada para desenvolvimento de novos marcadores SSR para análise genética de <i>P. viticola</i>	91
Tabela 1.8. Dados de amplificação de produtos de PCR dos 34 locos microssatélites de <i>Plasmopara viticola</i> , mostrando o número de repetições do SSR, número do <i>contig</i> , cobertura média no <i>contig</i> , comprimento do <i>contig</i> , iniciadores de PCR - <i>primers</i> (direta e reversa), motivo de repetição, temperatura de anelamento, tamanho esperado dos fragmentos e variação alélica.....	96
Tabela 1.9. Parâmetros genéticos de 44 marcadores microssatélites (34 desenvolvidos neste estudo e 10 selecionados da literatura) utilizados na genotipagem de 92 isolados de <i>P. viticola</i> coletados em regiões produtoras de uva do Brasil.....	99
Tabela 1.10. Estimativas de parâmetros genéticos de 15 locos microssatélites desenvolvidos para <i>Plasmopara viticola</i> , usados na genotipagem de 92 isolados de <i>P. viticola</i> , apresentando o valor de frequência do alelo mais comum no loco, número de alelos amplificados em cada loco (Na), a variação alélica observada, diversidade gênica (DG), Heterozigosidade observada (Ho), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) e valor de significância (<i>p-value</i>) para equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).....	104
Tabela 1.11. Marcadores microssatélites e principais observações de alguns estudos sobre diversidade genética e estrutura da populações de <i>Plasmopara viticola</i>	112
Tabela 1.12. Distribuição de 92 isolados de <i>Plasmopara viticola</i> oriundos de diferentes regiões geográficas do Brasil, representadas em 23 municípios produtores de uva, classificados de acordo com as subpopulações do patógeno (PvG1, PvG2 e PvG3).....	118

Capítulo 2

Tabela 2.1. Acessos de videira selecionados no Banco de Germoplasma da Embrapa Uva e Vinho utilizados para a seleção de marcadores SSR utilizados no presente estudo.....	141
Tabela 2.2. Descrição de sintomas da escala de notas de resistência do bioensaio utilizado para avaliação do fenótipo da interação entre <i>P. viticola</i> e videira. As análises foram realizadas 7 dias após a inoculação. Foram classificados como resistentes (R) os indivíduos que apresentaram notas de 1 a 3, e como suscetíveis (S) aqueles que apresentaram notas variando de 5 a 9.....	144

Tabela 2.3. Escala de notas utilizadas para classificação de resistência/suscetibilidade de videira ao patógeno <i>Plasmopara viticola</i> , com descrição das características avaliadas em condições de campo (IPGRI/UPOV, OIV, 1997).....	150
Tabela 2.4. Resumo de informações geradas pela construção dos mapas integrados (<i>framework</i> e <i>full</i>) dos híbridos de <i>Vitis vinifera</i> CNPUV 733-34 e CNPUV 1103-88.....	158
Tabela 2.5. Resumo de informações geradas pela construção do mapa integrado dos genitores de <i>Vitis vinifera</i> CNPUV 733-34 e CNPUV 1103-88, utilizando o software JoinMap.....	162
Tabela 2.6. Estatísticas descritivas das avaliações da progênie F1 do cruzamento de <i>Vitis vinifera</i> CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 para resistência ao míldio, em condições de campo e bioensaio de laboratório.....	171
Tabela 2.7. Resultados apresentados pela Análise de Marca Simples utilizando o programa QTL Cartographer. Marcadores associados à característica fenotípica de resistência ao míldio, avaliados na população segregante de <i>Vitis vinifera</i> , em condições de campo e bioensaio, para o genitor feminino CNPUV 733-34 e masculino CNPUV 1103-88.....	174
Tabela 2.8. Informações sobre os QTLs identificados pelo modelo de Mapeamento por Intervalo Simples para características de resistência à <i>Plasmopara viticola</i> na população segregante F1 do cruzamento de <i>Vitis vinifera</i> CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 (genitor feminino), sob condições de campo e bioensaio.....	175
Tabela 2.9. Informações sobre os QTLs identificados pelo modelo de Mapeamento por Intervalo Composto para características de resistência à <i>Plasmopara viticola</i> na população segregante F1 do cruzamento de <i>Vitis vinifera</i> CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 (genitor feminino), sob condições de campo e bioensaio.....	178
Tabela 2.10. Marcadores associados a resistência ao míldio da videira, detectados pela Análise de Intervalo Composto nos cromossomos 5 e 18, mostrando o tipo de segregação e os alelos do genitor feminino (GF) e do genitor masculino (GM).....	179
Tabela 2.11. Sumário de QTLs detectados no genoma do genitor feminino (CNPUV 733-34) pelas metodologias de mapeamento por Marcas Simples, Intervalo Simples e Intervalo Composto pela estratégia de pseudo-cruzamento teste. Estão descritos os grupos de ligação onde os QTLs foram detectados, seus valores de LOD, porcentagem de variação explicada e os marcadores que os flanqueiam, de acordo com estimativas de Mapeamento por Intervalo Composto.....	181
Tabela 2.12. QTLs (<i>Quantitative Trait Loci</i>) identificados para resistência a <i>Plasmopara viticola</i> em diferentes espécies de videira (www.vivc.de/index.php).....	183

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

Figura 1. Produção mundial de uva por continente. Fonte: Embrapa Uva e Vinho, disponível em <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/>..... 5

Figura 2. Ciclo de doença do míldio em videira causado por *Plasmopara viticola*, adaptado de Agrios (2005)..... 15

Figura 3. Sintomas causados por *Plasmopara viticola* em folhas e bagas de videira: (A) mancha de óleo na face superior da folha; (B) esporulação recente na face inferior da folha; (C) esporulação de *P. viticola* em frutos novos e (D) sintoma do ataque do patógeno no cacho, causando escurecimento e secamento dos frutos novos..... 17

Figura 4. Esquema mostrando Estratégia de Pseudo-cruzamento teste..... 42

Capítulo 1

Figura 1.1. Fluxograma de atividades desenvolvidas com objetivo de estudar a diversidade genética e a estrutura populacional de isolados de *Plasmopara viticola* que infectam vinhedos em diferentes regiões do Brasil..... 70

Figura 1.2. Eletroferogramas ilustrando o padrão de amplificação dos 15 locos microssatélites empregados na genotipagem de 92 isolados de *Plasmopara viticola* coletados nas principais regiões produtoras de uva do Brasil..... 103

Figura 1.3. Distribuição de frequência alélica em cada um dos 15 locos microssatélites selecionados para genotipagem de 92 isolados de *Plasmopara viticola*..... 105

Figura 1.4. Valores de ΔK (eixo Y), com seu valor modal (eixo X) detectando um K de 3 grupos ($K = 3$), indicando que os isolados de *Plasmopara viticola* estão divididos em três subpopulações..... 106

Figura 1.5. Distribuição dos 92 isolados de *Plasmopara viticola* em três subpopulações do patógeno, de acordo com genótipos multiloco obtidos com uma bateria de 15 marcadores microssatélites. (a) Distribuição geral dos isolados nas subpopulações PvG1 (vermelho), PvG2 (verde) e PvG3 (azul) com base nos valores estimados de vetores de ancestralidade ou coeficiente de inclusão (Q); (b) Codificação dos isolados em cada população. As barras coloridas representam a probabilidade de inclusão (Q) de cada isolado nas diferentes subpopulações..... 108

- Figura 1.6.** Distribuição de frequência de alelos em cada um dos 15 locos microssatélites, estimada de acordo com a alocação dos isolados nas três subpopulações de *Plasmopara viticola* (PvG1= vermelho, PvG2= verde e PvG3= azul)..... 109
- Figura 1.7.** Análise de coordenadas principais para detecção de diferenças genotípicas individuais e de agrupamentos de isolados de *Plasmopara viticola* coletados no Brasil. Os isolados podem ser discriminados em três subpopulações do patógeno (PvG1, PvG2 e PvG3). Os isolados coletados de *Vitis labrusca* receberam a letra “L” após o número da amostra.. 111
- Figura 1.8.** Distribuição dos 92 isolados de *Plasmopara viticola* em subpopulações do patógeno de acordo com três grupos de marcadores moleculares selecionados com base no valor relativo de PIC (baixo, médio e alto). Os valores de ΔK e a probabilidade de inclusão (Q) de cada isolado nas diferentes subpopulações (barras coloridas) são apresentados para (a) Grupo 1 (PIC baixo), (b) Grupo 2 (PIC médio) e (c) Grupo 3 (PIC alto)..... 116
- Figura 1.9.** Mapa geográfico do Brasil com a localização das coletas de 92 populações de *P. viticola*, durante os anos de 2011, 2012 e 2013. A legenda mostra os municípios e os estados produtores de uva: A-B (Distrito Federal), C (Espírito Santo), D (Goiás), E-G (Minas Gerais), H (Mato Grosso), I-J (Paraná), K (Rio de Janeiro), L-Q (Rio Grande do Sul), R (Santa Catarina) e S-W (São Paulo)..... 119
- Figura 1.10.** Distribuição de frequência de isolados de *Plasmopara viticola* de 3 subpopulações (PvG1, PvG2 e PvG3) coletados em variedades de uva das espécies *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera*..... 119

Capítulo 2

- Figura 2.1.** Fluxograma de atividades desenvolvidas neste estudo com objetivo de construir mapas de ligação e mapear QTLs de resistência ao míldio da videira..... 135
- Figura 2.2.** Detalhe do bioensaio de avaliação de resistência/suscetibilidade de videira a isolado de *Plasmopara viticola* em ambiente controlado. Oito gotas com suspensão de esporos do patógeno foram despositadas na superfície abaxial de folhas destacadas da progênie CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 para avaliação do fenótipo da interação patógeno-hospedeiro..... 143
- Figura 2.3.** Escala de notas do bioensaio utilizada para avaliação do fenótipo da interação entre *Plasmopara viticola* e videira através de inoculação pontual de esporângios em folhas destacadas. 144
- Figura 2.4.** Clones da progênie F1 do cruzamento CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 plantados na Estação Experimental da Embrapa Uva e Vinho em Jales-SP. Esta população foi utilizada para análise de resistência ao míldio em condições de campo. As avaliações fenotípicas de resistência ao míldio foram realizadas nos anos de 2010 e 2011..... 148

Figura 2.5. Escala de notas para avaliação da severidade do míldio (<i>Plasmopara viticola</i>) em folhas de videira, em condições de campo (superior: superfície adaxial; inferior: superfície abaxial).....	150
Figura 2.6. Representação gráfica em porcentagem do aproveitamento final dos 406 locos microssatélites usados na genotipagem da progênie F1 do cruzamento de <i>Vitis vinifera</i> (CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88).....	154
Figura 2.7. Representação gráfica em porcentagem do aproveitamento de 280 marcadores microssatélites efetivamente utilizados para a construção de mapas genéticos da progênie F1 do cruzamento de <i>Vitis vinifera</i> CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88.	157
Figura 2.8. Gráfico representando a porcentagem dos 209 locos microssatélites informativos para o cruzamento de <i>Vitis vinifera</i> (CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88).	157
Figura 2.9. Mapa integrado “ <i>Framework</i> ” construído com base em uma família de 257 irmãos-completos do cruzamento dos híbridos de <i>Vitis vinifera</i> CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88. O mapa genético foi construído com 187 marcadores microssatélites, empregando o software JoinMap v3.0, com $LOD \geq 4$ para análise de ligação, pela estratégia de pseudo-cruzamento teste. A distância cumulativa entre os marcadores em cM, calculada com a função Kosambi, está indicada do lado esquerdo dos grupos de ligação. Os locos microssatélites destacados em verde segregaram para ambos os genitores.....	159
Figura 2.10. Mapa integrado “ <i>Full</i> ” construído com base em uma família de 257 irmãos-completos, do cruzamento dos híbridos de <i>Vitis vinifera</i> CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88. O mapa genético foi construído com 209 marcadores microssatélites, empregando o software JoinMap v3.0, com $LOD \geq 4$ para análise de ligação, pela estratégia de pseudo-cruzamento teste. A distância cumulativa entre os marcadores em cM, calculada com a função Kosambi, está indicada do lado esquerdo dos grupos de ligação. Os locos microssatélites destacados em verde segregaram para ambos os genitores. Marcadores com segregação Mendeliana distorcida estão sublinhados.	160
Figura 2.11. Mapa genético dos genitores feminino (GF) CNPUV 733-34 e masculino (GM) CNPUV 1103-88, construídos com base em uma família de 257 irmãos-completos, pela estratégia de pseudo-cruzamento teste. As linhas ligam os marcadores microssatélites completamente informativos mapeados em ambos os parentais, destacados em verde.....	163
Figura 2.12. Fenótipo da interação patógeno-hospedeiro entre o isolado de <i>Plasmopara viticola</i> (DF-PL1), coletado em Planaltina-DF, inoculado nos genitores da progênie F1 do cruzamento de <i>Vitis vinifera</i> CNPVU 733-34 (esquerda, resistente) e CNPVU 1103-88 (direita, suscetível). O isolado DF-PL1 foi utilizado no bioensaio de resistência/suscetibilidade da progênie F1.....	170
Figura 2.13. Distribuição de frequência (%) para o grau de infecção de <i>Plasmopara viticola</i> em uma população derivada do cruzamento de CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 (N = 257), em condições de campo em 2010 e 2011 (A) e bioensaio em três repetições (B). A avaliação dos sintomas foi classificada de acordo com os descritores das Tabelas 2.2 e 2.3. Foram classificados como resistentes os indivíduos que apresentaram notas 1 a 3 e suscetíveis quando apresentaram notas de 5 a 9.....	170

Figura 2.14. Sintomas de *Plasmopara viticola*, mostrando resistência e suscetibilidade da população F1, durante as avaliações do bioensaio em folhas destacadas (A1-A3; B1-B3; C1-C3) e condições de campo (A4-A5; B4-B5; C4-C5). A1-A5: genótipos altamente suscetíveis; B1-B5: genótipos mediamente suscetíveis e C1-C5: genótipos resistentes..... 172

Figura 2.15. Variação de valores de LOD no Grupo de Ligação 18, identificando QTLs para resistência ao míldio detectado com base em cinco avaliações de resistência realizadas em campo (2010, 2011) e em bioensaio de laboratório (R1, R2, R3). A análise foi realizada por mapeamento por Intervalo Simples e estratégia de pseudo-cruzamento teste, no genoma do genitor feminino (CNPUV 733-34). Valor mínimo de LOD de 3,5, representado pela linha horizontal vermelha..... 176

Figura 2.16. Variação de valores de LOD no Grupo de Ligação 5, identificando QTL para resistência ao míldio da videira, em condições de campo no ano de 2011, mapeado por Intervalo Composto no genoma do parental materno (CNPUV 733-34). Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. O valor crítico de LOD definido pelo teste de 1000 permutações com 5% de significância foi de 2,9..... 177

Figura 2.17. Variação de valores de LOD no Grupo de Ligação 18, identificando o QTL para resistência ao míldio da videira, detectado com base em cinco avaliações de resistência realizadas em campo (2010 e 2011) e em bioensaio (R1, R2, R3). Os QTLs foram mapeados por Intervalo Composto e estratégia de pseudo-cruzamento teste, no genoma do genitor feminino (CNPUV 733-34). Valor mínimo de LOD score de 2,9, representada pela linha horizontal verde..... 178

Figura 2.18. Localização dos QTLs de resistência ao míldio da videira, detectados nos grupos de ligação 5 e 18 do parental feminino (CNPUV 733-34), mapeados por método de Intervalo Composto. Onde: CP = avaliação de resistência a *Plasmopara viticola* no campo; Bio = Bioensaio de avaliação de resistência a *Plasmopara viticola* em condições controladas..... 180

ANEXO 1 – Capítulo 1

Tabela 1. Genotipagem de 92 isolados de *Plasmopara viticola* utilizando 15 marcadores SSR que apresentaram maior Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC > 0,3)..... 196

ANEXO 2 – Capítulo 2

Tabela 1. 209 marcadores microssatélites utilizados para a construção de mapas genéticos de ambos os genitores pela estratégia de pseudo-cruzamento teste..... 200

Tabela 2. Genotipagem de 257 progênie F1 do cruzamento entre os híbridos CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88..... 209

Tabela 3. Fenotipagem de resistência ao míldio da videira na progênie F1 do cruzamento de *Vitis vinifera* (CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88)..... 275

RESUMO GERAL

ANJOS, Liamar Maria dos. **Diversidade Genética de *Plasmopara viticola* e Mapeamento de QTLs de Resistência ao Míldio em Videira (*Vitis* spp.)**. 2013. 277p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A videira (*Vitis vinifera* L.) destaca-se entre as mais importantes espécies frutíferas cultivadas mundialmente. O míldio, causado pelo oomyceto *Plasmopara viticola* (Berk & Curtis.) Berl. & de Toni é uma das principais doenças da videira no mundo, causando sérios prejuízos à vitivinicultura. Este trabalho envolveu um conjunto de experimentos visando gerar informações para estudos genéticos do gênero *Plasmopara*, infectando videiras no Brasil. O Capítulo 1 teve como objetivo estudar a diversidade genética e a estrutura populacional de isolados de *Plasmopara viticola* que infectam vinhedos em diferentes regiões brasileiras. Para isto, 34 novos marcadores microssatélites de *P. viticola* foram desenvolvidos através de sequenciamento NGS (*Next Generation Sequencing*) seguido de montagem parcial *de novo* do genoma do fungo. Testes dos novos marcadores juntamente com dez controles possibilitaram a seleção de uma bateria mista de 15 marcadores que foram usados para genotipar 92 isolados de *P. viticola* coletados em regiões produtoras de uva no Brasil. A amostra de 92 isolados apresentou estruturação, tendo sido dividida em três subpopulações, denominadas PvG1 ($F_{st}=0,56$), PvG2 ($F_{st}=0,25$) e PvG3 ($F_{st}=0,24$). Foi observado um grande efeito no uso de pequenas baterias de marcadores moleculares na análise genética de populações do patógeno, afetando a interpretação dos resultados de subestruturação populacional. A classificação geográfica dos isolados apresenta associação com a classificação subpopulacional do patógeno. Os isolados oriundos dos Estados de São Paulo e Minas Gerais apresentam maior diversidade de subpopulações do que isolados de outras regiões tradicionais

no cultivo de uva no Brasil, como o Rio Grande do Sul. O emprego de ferramentas moleculares como sequenciamento NGS e marcadores moleculares contribui para uma melhor compreensão das variáveis que afetam as populações de *P. viticola*. O Capítulo 2 teve por objetivo construir mapas genéticos para os genitores da progênie F1 do cruzamento CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 e mapear regiões do genoma de videira que conferem resistência ao patógeno. O mapa do genitor feminino CNPUV 733-34 cobriu 1.104 cM do genoma de videira, com distância média entre marcadores de 6,69 cM. O mapa do genitor masculino CNPUV 1103-88 cobriu 958 cM do genoma de videira, com distância média entre marcadores de 7,48 cM. O fenótipo da interação patógeno-hospedeiro foi mensurado em bioensaios em ambiente controlado e infecção natural no campo. Três QTLs foram detectados por mapeamento de Intervalo Simples e Intervalo Composto no mapa genético do genitor feminino CNPUV 733-34. Um dos QTLs está localizado no GL 5, no intervalo entre os marcadores UDV041-UDV042 (LOD= 3,9) e explica 6% da variação fenotípica para resistência a *P. viticola*. Dois outros QTLs (C18-1 e C18-2), apresentam efeito moderado de resistência a *P. viticola*, foram detectados no GL 18, e explicam até 22,3% da variação fenotípica. O intervalo do QTL C18-1 (LOD= 7,6) é flanqueado pelos marcadores VMC7F2 e VVIN16, que estão separados por 5 cM. O intervalo do QTL C18-2 (LOD= 6,3) é flanqueado pelos marcadores VVIU04 e VVIN83, separados por 22 cM. O mapeamento genético de QTLs de resistência ao míldio utilizando diferentes fontes de resistência nos programas de melhoramento genético de videira é um passo importante para o aumento da eficiência de desenvolvimento de variedades resistentes ao patógeno.

Palavras-chave: Diversidade, Estrutura genética de populações, Mapeamento genético, Marcadores microssatélites, Míldio, *Plasmopara viticola*, Sequenciamento, Uva.

GENERAL ABSTRACT

ANJOS, Liamar Maria dos. **Genetic Diversity of *Plasmopara viticola* and Genetic Mapping of Downy Mildew Resistance QTLs in Grapevine (*Vitis Spp.*)**. 2013. 277p. Thesis (Doctorate in Plant Pathology) – Universidade de Brasilia, Brasilia, DF, Brazil.

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is among the most important fruit species cultivated worldwide. Downy mildew, caused by the oomycete *Plasmopara viticola* (Berk & Curtis.) Berl. & de Toni, is one of the main diseases of grapevine in different grape producing regions of the world, causing serious damage to grape production. This work is based on a group of experiments aimed at generating information useful to genetic studies of the genus *Plasmopara*, which infect grapevine in Brazil. The objective of Chapter 1 was to study the genetic diversity and population structure of *Plasmopara viticola* which infect grapevine fields in different regions of Brazil. 34 new *P. viticola* microsatellite markers were developed by NGS (Next Generation Sequencing) followed by partial *de novo* assembly of the fungus genome. A mixed battery of new and ten control microsatellites was used to genotype 92 *P. viticola* isolates, collected in grape producing regions of Brasil. A sample of 92 isolates showed a significant population structure, with isolates clustering into three subpopulations, called PvG1 ($F_{st}=0,56$), PvG2 ($F_{st}=0,25$) e PvG3 ($F_{st}=0,24$). The effect of small batteries of molecular markers used to evaluate the genetic structure of the pathogen populations was tested and found to affect the interpretation of the results. The geographic classification of the isolates is associated with the genetic groups detected in the pathogen sample. Isolates collected in São Paulo and Minas Gerais show greater diversity of genetic groups (subpopulations) than isolates from other traditional grape growing regions of Brazil, such as Rio Grande do Sul. The use of molecular tools, such as NGS and molecular markers,

contribute for a better understanding of variables affecting the populations of *P. viticola*. The objective of Chapter 2 was to develop genetic maps for the parental varieties of an F1 progeny derived from the cross CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 and map grapevine genomic regions associated with resistance to the pathogen. The map of the female genitor CNPUV 733-34 covered 1,104 cM, with an average recombination distance between markers of 6.69 cM. The map of the male genitor CNPUV 1103-88 covered 958 cM, with an average recombination distance between markers of 7.48 cM. Host-pathogen interaction phenotype was measured by controlled bioassays using artificial inoculation, and by natural infection in the field. Genetic mapping determined the location of *P. viticola* resistance QTLs in grapevine. Three QTLs mapped on the female genitor genome were detected by Interval Mapping and Composite Interval Mapping procedures. One of these QTLs was located in LG 5, in the UDV041-UDV042 marker interval (LOD= 3.9), explaining 6% of the phenotypic variation for *P. viticola* resistance. Two additional QTLs (C18-1 e C18-2), showing a moderate effect on *P. viticola* resistance, were detected in LG 18, explaining up to 22.3% of the phenotypic variation. The C18-1 QTL interval (LOD= 7.6) is flanked by markers VMC7F2 and VVIN16, which are 5 cM apart. The C18-2 QTL interval (LOD= 6.3) is flanked by markers VVIU04 and VVIN83, which are 22 cM apart. Mapping downy mildew resistance QTLs using germplasm accessions derived from different sources of resistance in breeding programs is an important step towards higher efficiency in the improvement of grapevine resistance to the pathogen.

Keywords: Diversity, Downy mildew, Genetic mapping, Grapevine, Microsatellite markers, *Plasmopara viticola*, Population genetic structure, Sequencing.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Recursos genéticos da videira

A videira (*Vitis vinifera* L.) pertence à ordem Rhamnales, família Vitaceae, que compreende 19 gêneros e 1.126 espécies (Galet, 1998) distribuídas extensivamente nas regiões subtropicais e temperadas, com variantes que se estendem até regiões de clima tropical. O gênero *Vitis*, o único da família *Vitaceae* com importância econômica e alimentar, é composto por dois subgêneros: *Muscadinia*, com espécies diplóides ($2n = 40$) e *Vitis*, com espécies diplóides ($2n = 38$).

A videira é uma planta alógama e nos vinhedos ocorre a fecundação cruzada, favorecida pela ação dos ventos, insetos e chuvas. Seus genótipos são altamente heterozigotos e a maioria das cultivares apresenta plantas com flores hermafroditas, autofertéis e que facilmente inter cruzam entre si. A propagação sexuada da videira é utilizada apenas em programas de melhoramento e tem sido um instrumento importante na busca por maior produtividade, qualidade e resistência a doenças e pragas.

A maioria dos recursos genéticos de *Vitis vinifera* são mantidos em coleções de germoplasma (Galet, 2000). Essas coleções são de fundamental importância, pois representam a fonte de variabilidade genética disponível para o melhoramento genético. Manter bancos de germoplasma permite conservar, caracterizar e ampliar a variabilidade genética de *Vitis* para uso em pesquisas vitivinícolas. Segundo Camargo *et al.* (2009) o germoplasma de *Vitis* está distribuído em três centros de origem: Centro Euroasiático, caracterizado por clima temperado; Centro Asiático, que abrange regiões com clima diverso, rico em espécies e em variabilidade genética, devido à dimensão territorial e amplitude climática e Centro

Americano, no qual ocorrem 34 espécies descritas e classificadas. O Centro Americano é particularmente importante, principalmente pela utilização de suas espécies no melhoramento genético e na produção comercial de uvas.

No Brasil, a conservação do germoplasma da videira está sob a responsabilidade da Embrapa Uva e Vinho, com sede em Bento Gonçalves-RS e possui uma grande coleção de videiras, mantidas em Banco Ativo de Germoplasma (BAG), com 1.249 acessos introduzidos de diferentes partes do mundo (EMBRAPA, 2013a). Cada acesso é composto por quatro plantas, que são mantidas em condições adensadas em estufins. A coleção inclui mais de 40 espécies de *Vitis*, com grande número de variedades das espécies cultivadas (*V. vinifera*, *V. labrusca* L., *Vitis bourquina* Munson, *Muscadinia rotundifolia* Michaux.), variedades híbridas interespecíficas e espécies silvestres dos três centros de dispersão da videira: Americano, Euroasiático e Asiático. A maioria dos acessos destinam-se ao consumo *in natura* e elaboração de vinhos, mas existem ainda variedades para a elaboração de sucos, com potencial para produção de uva passa e porta-enxertos. Atividades de coleta, intercâmbio, conservação, documentação, caracterização e avaliação de germoplasma vem sendo realizadas, fornecendo informações valiosas para subsidiar o melhoramento genético e o desenvolvimento de novas variedades de videira.

Outro Banco Ativo de Germoplasma de Videira é mantido na Embrapa Semiárido (BAG Uva Semi-árido), localizado no Campo Experimental de Mandacarú, Juazeiro-BA. Este BAG possui 257 acessos, plantados em estufins, que inclui um grande número de variedades das espécies cultivadas (*V. vinifera* e *V. labrusca*), variedades híbridas interespecíficas e espécies silvestres americanas (EMBRAPA, 2013b). Outras coleções, com menor número de acessos, são mantidas em outros institutos de pesquisa e universidades: Embrapa Uva e Vinho Estação Experimental de Viticultura Tropical em Jales-SP, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Instituto Agrônomo de Campinas (IAC),

Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) e Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

A origem da maioria das cultivares de *V. vinifera* é descrita como antiga, muito antiga ou desconhecida (Reisch & Pratt, 1996). À medida em que a espécie foi sendo introduzida em regiões distantes de seu habitat natural, *V. vinifera* começou a ser cruzada com outras espécies nativas de *Vitis*, resultando em híbridos melhor adaptados às condições ambientais locais, possibilitando o cultivo da videira em regiões onde *V. vinifera* não seria capaz de sobreviver devido a sua suscetibilidade a doenças e a invernos severos.

A variabilidade genética resulta de eventos de cruzamentos espontâneos que ocorreram ao longo dos séculos de domesticação e cultivo (Vignani *et al.*, 2002) e foi perpetuada e disseminada para as mais diversas regiões do mundo, por meio da propagação vegetativa. Os cruzamentos sexuais e as mutações naturais desempenharam um papel fundamental na evolução da videira cultivada. A propagação vegetativa permitiu o acúmulo de mutações ao longo do tempo, e os bancos de germoplasma conservam mutantes naturais com variações nas folhas, flores ou bagas de videira. Tais acessos têm sido selecionados como clones ou novas cultivares, contribuindo para o grande número de cultivares de videira conhecidas (This *et al.*, 2006). Entre as espécies de maior interesse econômico, pertencentes ao gênero *Vitis*, incluem-se as videiras americanas (*V. labrusca* e outras espécies), européias (*V. vinifera*), híbridos e seus mutantes.

A domesticação da videira está relacionada ao desenvolvimento da produção do vinho e grande parte das cultivares de *V. vinifera* existentes são consequência da grande diversidade morfogênica, a fácil propagação assexuada e a domesticação da espécie que ocorreu há cerca de 6.000 anos (This *et al.*, 2006) e conduziu a um número expressivo de cultivares, estimado em milhares, com diferentes finalidades: consumo *in natura*, produção de vinhos,

sucos, passas, doces, etc. Este número é ampliado a cada ano, como resultado de diversos programas de melhoramento em vários países.

Apesar da variabilidade genética disponível, o número de cultivares utilizado em escala comercial em cada região produtora é relativamente pequeno. As principais cultivares de uva de mesa utilizadas mundialmente em escala comercial são: apirênicas (Thompson Seedless, Crimson Seedless e Centennial), com semente (grupo Itália). As principais cultivares utilizadas para produção de vinho são: Uvas *vinifera* (*Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Chardonnay* e *Sauvignon Blanc*); americanas e híbridas com duplo propósito (vinho e suco): *Concord* (Embrapa Uva e Vinho, disponível em <http://www.cnpuv.embrapa.br/>).

1.2. Produção de uva no Brasil

O Brasil pertence ao chamado novo mundo vitivinícola, juntamente com Chile, Argentina, Estados Unidos, África do Sul, Austrália e outros, cuja base de produção são variedades importadas dos tradicionais países produtores de vinhos (Guerra *et al.*, 2009). De acordo com Mello (2013b), o Brasil ocupou a 11^a posição na produção mundial de uvas, em 2011. A China é o maior produtor mundial, seguida pela Itália, Estados Unidos, Espanha e França (Mello, 2012b).

A área mundial com videiras apresentou uma leve redução nos últimos anos. Entretanto, a produção mundial de uvas passou de 59,74 milhões de toneladas, em 1990, para 68,31 milhões em 2010. Portanto, houve um aumento da produtividade média mundial (Mello, 2012b). Conforme dados da mesma fonte, a posição de cada continente, em relação à produção de uvas, apresentou alteração nesse mesmo período. O continente Europeu continua o principal produtor mundial de uvas, mas vem perdendo posição, enquanto a produção na

Ásia ultrapassou a produção do continente americano entre 2008/2010, passando para o segundo maior continente em produção de uvas (Figura 1).

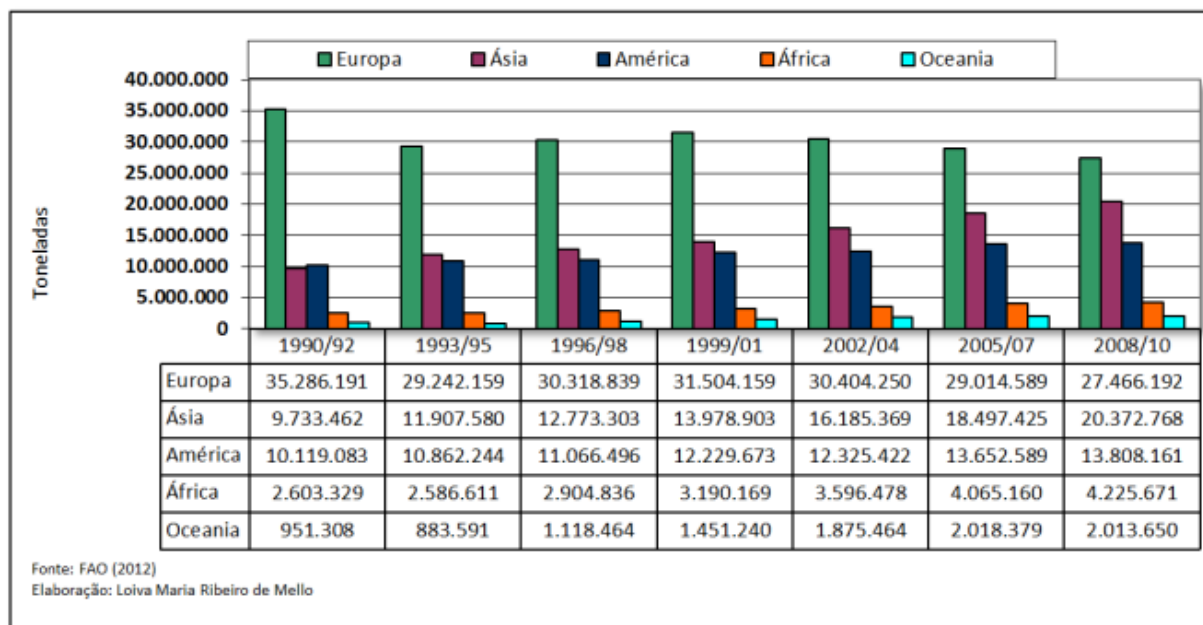


Figura 1. Produção mundial de uva por continente. Fonte: Embrapa Uva e Vinho, disponível em <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/>.

A vitivinicultura brasileira tem apresentado crescimento significativo nos últimos anos, decorrente da expansão na área cultivada e na tecnologia de produção de uvas e de elaboração de vinhos. A cadeia produtiva da uva constitui-se em atividade consolidada, com importância socioeconômica na Região Sul, Sudeste e Nordeste. Nos últimos anos, tem se tornado importante, também, na geração de emprego em grandes empreendimentos, que produzem uvas de mesa e uvas para processamento, além de ser importante para a sustentabilidade da pequena propriedade no Brasil. De acordo com Mello (2013a) na principal região produtora de uvas no Brasil, a Serra Gaúcha, a vitivinicultura está fortemente ligada ao turismo.

No Brasil as principais regiões produtoras de uva destacam-se pela diversidade edafoclimática, incluindo regiões de clima temperado, subtropical e tropical e pela

diversidade de segmentação da produção, abrangendo a produção de uvas para processamento, principalmente para elaboração de vinhos e sucos, concentrada no sul do país, e de uvas para o consumo *in natura*, distribuída por todas as regiões vitícolas do país. De acordo com Mello (2013a) os principais Estados produtores são o Rio Grande do Sul, responsável por cerca 57% da produção, seguido por Pernambuco, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Bahia e Minas Gerais (Tabela 1). Embora ainda não esteja disponível nas estatísticas do IBGE, a viticultura está sendo implantada em vários estados, como Mato Grosso do Sul, Goiás, Espírito Santo, Ceará e Piauí (Mello, 2013a). Em 2011 os maiores aumentos de produção ocorreram nos Estados de Pernambuco (24,03%) e Rio Grande do Sul com 19,76% (Mello, 2012a).

As videiras de origem americana, principalmente as cultivares de *V. labrusca*, formaram a base para o desenvolvimento da vitivinicultura brasileira. Suas principais representantes no Brasil são as cultivares Isabel, cujas produções estão concentradas nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (Leão *et al.*, 2009). São utilizadas com dupla finalidade: produção de sucos e vinhos comuns e consumo como *in natura*.

Tabela 1. Produção de uvas no Brasil, em toneladas. Fonte: Embrapa Uva e Vinho, disponível em <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/>.

Estado/Ano	2008	2009	2010	2011	2012
Rio Grande do Sul	776.027	737.363	692.692	829.589	840.251
Pernambuco	162.977	158.515	168.225	208.660	224.758
Bahia	101.787	90.508	78.283	65.435	62.292
São Paulo	184.930	177.934	177.538	177.227	176.902
Paraná	101.500	102.080	101.900	105.000	70.500
Santa Catarina	58.330	67.546	66.214	67.767	70.909
Minas Gerais	13.711	11.773	10.590	9.804	10.107
Brasil	1.399.262	1.345.719	1.295.442	1.463.481	1.455.809

Uva para produção de vinho e suco

Os principais produtores de vinhos em 2010, em ordem decrescente, foram: Itália, França, Espanha, Estados Unidos e China (Mello, 2012b). O Brasil foi o 13º produtor mundial de vinhos em 2011 e a produção brasileira de uvas destinadas ao processamento (vinho, suco e derivados) nesse ano foi de 830,92 milhões de quilos, o que representou 57% da produção nacional. O mercado brasileiro de vinhos finos é dominado pelos vinhos importados, que, em 2012, representaram 77,4% do volume total comercializado (Mello, 2013b).

A vitivinicultura brasileira nasceu e cresceu com base em uvas americanas, as chamadas uvas comuns, variedades das espécies *V. labrusca* e *V. bourquina*, usadas para a elaboração de vinhos de mesa (Guerra *et al.*, 2009). Segundo o mesmo autor, vinhos finos passaram a ser produzidos na Serra Gaúcha a partir da década de 1990, com uvas de variedades de *V. vinifera*, também conhecidas como uvas finas. As principais variedades deste grupo cultivadas no Brasil são: variedades tintas (*Cabernet Franc*, *Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Pinotage*, *Pinot Noir*, *Syrah*, e *Tannat*) e variedades brancas (*Chardonnay*, Malvasia Bianca, Moscato Branco, Moscato Canelli, Prosecco e Riesling Itálico). As principais cultivares de *V. labrusca* utilizadas para a elaboração de vinhos de mesa no Brasil são: Isabel, Bordô, Niágara Branca e Niágara Rosada.

Atualmente, a vitivinicultura brasileira de vinhos finos é desenvolvida como atividade economicamente importante nas regiões Sul e Nordeste. Na região sul colhe-se uma safra por ano, como na clássica viticultura mundial. Já no Nordeste brasileiro, as colheitas se sucedem ao longo do ano. As diferentes regiões, com distintas características de clima, solo, variedades, sistemas de vinificação e envelhecimento possibilitam a produção de vinhos com

ampla diversidade de sabor e aroma, o que constitui uma das qualidades da vitivinicultura brasileira atual.

Quatro Estados brasileiros produtores de vinhos finos e suas respectivas regiões são: Estado do Rio Grande do Sul, com três regiões vitivinícolas: Serra Gaúcha, Campanha e Serra do Sudeste; Estado de Santa Catarina, na região de São Joaquim e nos Estados de Pernambuco e da Bahia, o Vale do Submédio São Francisco, situado em zona de clima tropical semi-árido. O clima vitícola da região do Vale do São Francisco apresenta variabilidade intra-anual, o que possibilita a produção de uvas e de vinhos ao longo de todos os meses do ano. Esta região é uma das regiões emergentes que teve início na década de 1980 e que hoje experimenta um período de expansão da produção de vinhos finos (Guerra *et al.*, 2009). O estabelecimento de tradicionais vinícolas nacionais e estrangeiras na região do Vale do São Francisco alavancou a produção do vinho nesta região.

Considerando-se que o Rio Grande do Sul é responsável por cerca de 90% da produção nacional de vinhos, ao analisar o desempenho desse Estado, temos uma boa aproximação do desempenho da agroindústria vinícola do país (Tabela 2). A produção de vinhos, sucos e derivados do Rio Grande do Sul, em 2012, foi de 579,31 milhões de litros (Melo, 2013a). A quantidade de vinhos exportada em 2012 foi de 5,77 milhões de litros, o que representa um aumento de 375,7%, em relação ao ano anterior (Tabela 3). Esse aumento é devido ao incentivo do Governo Federal, por meio do Programa de Escoamento da Produção (PEP). Os espumantes, em menor volume, apresentaram um aumento de 53,6% na quantidade e de 43,1% no valor exportado. Houve um aumento de 7,9% nas importações de vinhos espumantes, em 2012 (Mello, 2013b). Nos últimos anos, a crise econômica mundial, associada ao ingresso de outros países no mercado, está dificultando a exportação de uvas de mesa do Vale do São Francisco. Além disso, o excesso da oferta de vinhos no mercado internacional, associado ao aumento do poder aquisitivo dos brasileiros, tem facilitado o

ingresso de vinhos importados no país, influenciando o desempenho da vitivinicultura brasileira.

Tabela 2. Produção de vinhos, sucos e derivados produzidos no Rio Grande do Sul, em litros. Fonte: Embrapa Uva e Vinho, disponível em <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/>.

PRODUÇÃO	2008	2009	2010	2011	2012
VINHO DE MESA	287.506.811	205.399.206	195.267.979	257.840.749	212.777.037
Tinto	241.057.928	164.124.454	157.290.088	210.113.358	175.875.432
Branco	42.942.053	39.211.278	35.408.083	46.007.504	34.938.249
Rosado	3.506.830	2.063.474	2.569.809	1.719.887	1.963.356
VINHO FINO	47.334.502	39.900.568	24.805.713	47.598.471	49.787.016
Tinto	27.583.032	18.209.043	11.401.406	24.104.740	24.030.589
Branco	18.812.571	21.366.975	13.013.027	22.739.426	25.230.524
Rosado	938.898	324.550	391.280	754.305	525.903
Suco de uva integral	11.817.941	16.034.003	26.887.259	39.487.800	31.908.829
Suco concentrado	115.073.230	115.032.285	116.193.425	147.821.620	188.129.275
Mosto Simples	53.683.415	53.418.555	45.912.040	77.285.998	93.341.575
Outros derivados	5.929.360	4.043.975	5.298.716	8.774.925	3.365.288
TOTAL	521.375.259	433.828.592	414.365.132	578.809.563	579.309.020

Tabela 3. Balanço das exportações e importações de uvas, sucos de uvas, vinhos e derivados: valores em 2010/2012. Fonte: Embrapa Uva e Vinho, disponível em <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/>.

Descrição	2010		2011		2012	
	Quantidade	Valor (US\$)	Quantidade	Valor (US\$)	Quantidade	Valor (US\$)
EXPORTAÇÕES						
Uvas frescas (t)	60.805	136.649	59.391	135.782	52.016	121.891
Suco de uva (t)	3.098	8.048	4.452	15.737	2.473	7.719
Vinhos (1.000 L)	1.280	2.295	1.214	3.615	5.775	5.520
Espumantes (1.000 L)	320	1.335	112	568	172	813
TOTAL		148.327		155.702		135.943
IMPORTAÇÕES						
Uvas frescas (t)	24.794	36.075	34.083	51.371	33.294	54.381
Uvas passas (t)	25.919	50.664	24.294	61.647	24.613	56.696
Vinhos (1.000 L)	70.737	223.080	72.705	262.059	74.209	262.745
Espumantes (1.000 L)	4.314	27.961	4.923	32.605	5.316	37.665
Suco de uva (t)	1.189	3.213	192	194	640	670
TOTAL		340.993		407.876		412.157
BALANÇO		-192.666		-252.174		-276.214

Uva de mesa

De acordo com dados estatísticos disponíveis no portal da Embrapa Uva e Vinho (Mello, 2013a), em 2012 a produção de uvas destinadas ao consumo *in natura* representou 42,9% da produção brasileira. De acordo com Araújo *et al.* (2009) os principais pólos de produção de uvas de mesa no Brasil são: Vale do São Francisco (Bahia e Pernambuco), Norte de Minas Gerais; Região de São Miguel Arcanjo (SP); Região de Jales (SP); Regiões do Estado do Paraná e Região de Jundiaí (SP). A produção de uvas finas (*V. vinifera*) está concentrada em regiões subtropicais e tropicais, no Norte do Paraná, São Paulo, Vale do São Francisco (Petrolina e Juazeiro) e Pirapora-MG.

As principais cultivares de uva de mesa com sementes são Itália e suas mutações (Rubi, Benitaka e Brasil). Entre as uvas apirênicas, destacam-se as cultivares Sugaone, Thompson Seedless e Crimson Seedless. Em 1997, a Embrapa Uva e Vinho iniciou o programa de melhoramento genético visando à criação de cultivares de uva de mesa sem semente, lançou três cultivares em 2003: BRS Clara, BRS Linda e BRS Morena. O consumo de uvas de mesa no Brasil está concentrado na Região Sudeste, a qual absorve cerca de 46% da oferta brasileira. Nessa região, São Paulo descata-se como o principal mercado consumidor (Choudhury *et al.*, 2007).

A diversidade edafoclimática brasileira estabelece oportunidades para que o país se firme no mercado internacional com a produção de uvas de mesa, que podem ser produzidas durante todo o ano, explorando as janelas de exportação para o mercado europeu (uma de abril a junho e outra de outubro a dezembro). As exportações brasileiras de uvas de mesa destinam-se, majoritariamente, para a União Européia, seguida pela América do Norte, principalmente para os Estados Unidos, e no âmbito do MERCOSUL, a grande compradora é a Argentina (Araújo *et al.*, 2009).

A viticultura tropical teve início no Brasil a partir da década de 1980, no Semiárido do Nordeste, no Vale do São Francisco (Pereira *et al.*, 2009), onde as variedades sem sementes respondem por quase 97% das exportações brasileiras (Choudhury *et al.*, 2007). Esta região detém cerca de 15% do mercado nacional e emprega diretamente 30 mil pessoas e é a única região do mundo que produz duas safras e meia por ano (Lopes *et al.*, 2009). A tecnologia, fruto da pesquisa e desenvolvimento foi missão da Embrapa Uva e Vinho, que representou um componente fundamental para a obtenção de produtos de qualidade e vem disponibilizando várias tecnologias de elevado impacto técnico, econômico, social e ambiental para o setor produtivo.

1.3. Míldio da videira

O míldio da videira é causado pelo oomiceto *Plasmopara viticola* (Berk & Curtis.) Berl. & de Toni, que ataca todos os tecidos verdes da videira, incluindo folhas, bagas, gavinhas e brotos. O míldio é uma doença complexa, classificada como policíclica, na qual várias gerações do patógeno ocorrem em um mesmo ciclo de cultivo e, conseqüentemente, a quantidade de inóculo produzida ao final de cada ciclo do patógeno é aumentada em muitas vezes, resultando em altos índices de infecção, na ausência de medidas de controle curativo (Bedendo, 2011).

Plasmopara viticola é nativo da América do Norte e foi acidentalmente introduzido na Europa, durante o Século XIX, junto com espécies silvestres de *Vitis* (Galet, 1977). Esta introdução ocorreu na França na década de 1870, juntamente com porta-enxertos de *Vitis* Norte-americanas resistente ao devastador inseto filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*), considerada a principal praga da viticultura. A filoxera foi responsável pela morte de grande

número de vinhedos na França em 1860, obrigando os produtores a replantar os parreirais de *V. vinifera*, utilizando mudas enxertadas sobre porta enxertos resistentes (Lafon & Clerjeau, 1994; Alexopoulos *et al.*, 1996). Hoje este patógeno apresenta distribuição mundial, colonizando principalmente cultivares suscetíveis de *V. vinifera*. A importância do míldio é histórica, por ter despertado o interesse para pesquisas em doenças de plantas, além de ter sido responsável pela criação da calda bordalesa, quando, então, se deu início às pesquisas com defensivos agrícolas (Massola Jr. & Krugner 2011). *Plasmopara viticola* foi descrito pela primeira vez no Brasil em 1891, no Instituto Agrônomo de Campinas (Inglez de Sousa, 1996), com a introdução de videiras americanas no estado de São Paulo.

O míldio é uma doença destrutiva e amplamente disseminada. Ocorre na maioria das regiões produtoras, principalmente quando condições de temperaturas amenas e de alta umidade relativa do ar predominam ao longo do ciclo vegetativo da videira, tornando-se mais acentuada no período chuvoso. É uma doença de difícil controle, principalmente quando a infecção ocorre nos estádios de desenvolvimento vegetativo e de floração da planta. A aplicação de produtos químicos não promove um controle efetivo do míldio nos parreirais, devido à agressividade do patógeno, que rapidamente alcança níveis significativos de infecção. Quando as condições são favoráveis e na ausência de proteção contra a doença, o míldio pode destruir de 50 a 75% da área foliar da cultura durante o ciclo vegetativo (Agrios, 2005).

O míldio é considerado uma das principais doenças da videira no mundo (Cséfalvay *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2011; Schwander *et al.*, 2011; Rouxel *et al.*, 2013). A estratégia atual para o controle da doença baseia-se na utilização massiva de agrotóxicos para garantir uma colheita com boa qualidade. O tratamento químico intenso não só acrescenta altos custos para a produção da uva, mas também causa problemas ambientais que são incompatíveis com as exigências modernas para a agricultura sustentável.

1.4. Etiologia do míldio da videira

O míldio da videira é causado pelo parasita obrigatório, *P. viticola* (Berk & Curtis.) Berl. & de Toni. Pertence ao Reino Chromista, Filo Oomycota, Classe Oomycetes, Ordem Peronosporales, Família Peronosporaceae.

Os esporangióforos do fungo medem de 140 a 250 μm . Na sua extremidade formam-se esporângios hialinos, elipsóides que medem 14 x 11 μm . Cada esporângio contém de um a dez zoósporos biflagelados com dimensões de 6 a 8 x 4 a 5 μm . Os zoósporos são providos de dois flagelos que possibilitam a sua movimentação em meio líquido. Após aproximadamente 30 minutos de constante movimentação, os zoósporos entram em repouso (encistam) e aproximadamente 15 minutos depois emitem um tubo germinativo que penetra na planta através dos estômatos e produz um micélio cenocítico intercelular, provido de haustórios que se encarregam da absorção de substâncias nutritivas da planta. Uma vez estabelecida a infecção, há nas lesões abundante frutificação constituída de esporângios, correspondente à fase assexuada do fungo, repetindo-se várias vezes o ciclo secundário (Agrios, 2005).

1.5. Epidemiologia e sintomas de *Plasmopara viticola*

Plasmopara viticola é um oomiceto heterotático, ou seja, possui micélio auto-estéril e requer a participação de outro talo compatível para que ocorra a reprodução sexuada (Wong *et al.*, 2001). O pseudo fungo possui dois tipos de reprodução: sexuada e assexuada. Nas regiões de clima temperado, o ciclo sexual ocorre no outono (quando a temperatura diminui para menos de 12° C). A reprodução sexuada ocorre pelo cruzamento entre indivíduos diploides, no interior das folhas infectadas, formando estruturas de resistência pela fusão de um

anterídio e um oogônio, denominados oósporos, que representam o meio de sobrevivência do patógeno no inverno em regiões de clima temperado (Kennelly *et al.*, 2007). A fase assexuada é responsável pelos múltiplos ciclos da doença e ocorre ao longo do período de crescimento vegetativo da videira, enquanto que a fase sexuada é responsável pela produção de oósporos, que representam o inoculo primário para a estação seguinte.

O agente do míldio pode infectar todas as partes verdes e em desenvolvimento da videira, causa maiores danos quando afeta flores e frutos pequenos. Os zoósporos possuem motilidade para penetrar através dos estômatos e colonizar o espaço intercelular do mesófilo foliar (Kortekamp *et al.*, 1998; Kiefer *et al.*, 2002). A colonização envolve o crescimento micelial intercelular com a formação do haustório (Boso & Kassemeyer, 2008). A esporulação ocorre em condições de alta umidade. A dinâmica de germinação dos oósporos dependem de fatores climáticos e fatores endógenos (Vercesi *et al.*, 2010), podendo levar de 5 a 10 dias para germinar ou podem sobreviver e permanecer viáveis no solo por longos períodos (Kennelly *et al.*, 2007). O ciclo da doença pode levar de 5 a 18 dias (Figura 2), dependendo da temperatura, umidade relativa do ar, e da suscetibilidade da cultivar (Agrios, 2005). Em condições ótimas, podem ocorrer vários ciclos secundários em um mesmo ciclo de cultivo. Condições de temperatura em torno de 18°C a 25 °C e umidade relativa do ar superior a 70%, além da ocorrência de chuvas contínuas, são condições que favorecem a infecção. De acordo com Kennelly *et al.* (2007), o período de latência varia de acordo com a temperatura e a umidade relativa do ar, variando de 1 a 3 semanas. Segundo o mesmo autor, a duração do período de latência não afeta a quantidade ou a qualidade de esporângios produzidos em lesões foliares.

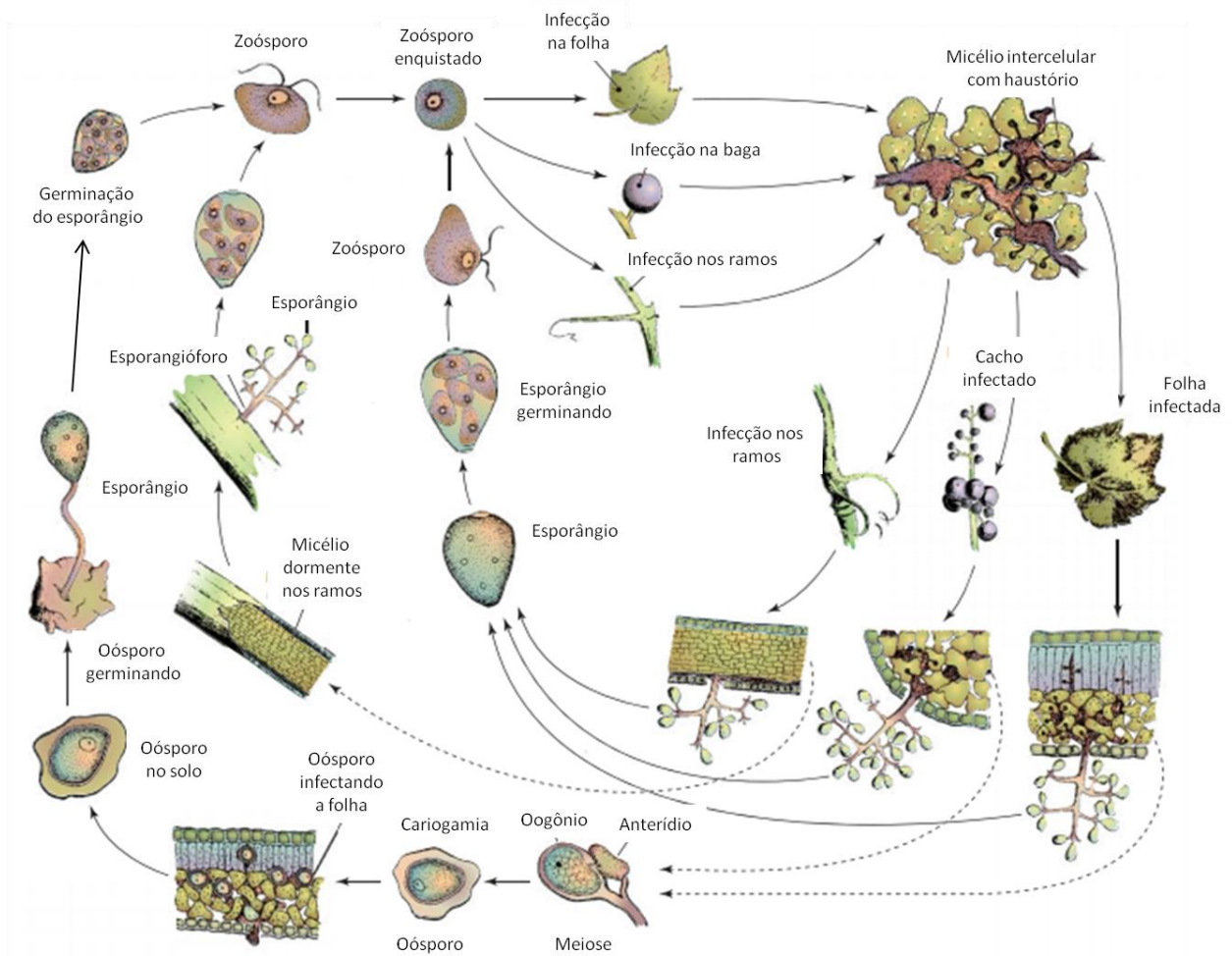


Figura 2. Ciclo de doença do míldio em videira causado por *Plasmopara viticola*, adaptado de Agrios (2005).

Os agentes de disseminação mais comuns são o vento, que propicia a dispersão de esporângios a distâncias relativamente grandes e a água, principalmente através de respingos, que espalha esporângios e zoósporos para plantas vizinhas e para a própria planta doente. A disseminação a longa distância ocorre pelo transporte de material vegetal infectado. Quando um esporângio alcança uma folha suscetível, tem início a etapa de infecção.

O primeiro sintoma da doença nas folhas é caracterizado pelo aparecimento da mancha-de-óleo na face superior, de coloração clara (Figura 3A). Na face inferior

correspondente, aparecem estruturas esbranquiçadas que são os órgãos de frutificação do fungo (esporangióforos com esporângios), que saem através dos estômatos (Figura 3B). As áreas da folha infectada sofrem dessecação e tornam-se marrons devido à morte celular. Quando o ataque do fungo é muito intenso, as folhas doentes caem prematuramente, privando a planta de seu órgão de nutrição. Durante a floração, o patógeno provoca o escurecimento e a destruição das flores afetadas. Nos estádios da pré-floração e em bagas pequenas, o fungo penetra pelos estômatos, paralisando a passagem de seiva e água, causando escurecimento e secamento dos órgãos. As bagas infectadas nessa fase apresentam coloração pardo-escura e são facilmente destacadas do cacho (Figura 3C e 3D). Frutos no início de formação (Figura 3C) são altamente suscetíveis ao míldio e as bagas infectadas permanecem firmes comparadas às bagas sadias (Figura 3D), que amolecem à medida em que amadurecem (Lima *et al.*, 2009). O período crítico da planta ao ataque do fungo ocorre no início da floração e formação das bagas. Além de perdas de rendimento, a ocorrência da doença causa perdas indiretas reduzindo a atividade fotossintética das folhas afetadas e provocando a desfolha precoce (Agrios, 2005).

Os sinais da doença surgem com a formação das frutificações assexuadas do patógeno, quando o micélio volta a atravessar os estômatos para o exterior, formando os esporangióforos e esporângios, constituindo uma massa esbranquiçada com aspecto aveludado (o míldio). A liberação dos esporângios, onde os zoósporos são formados, marca o início de um novo ciclo.

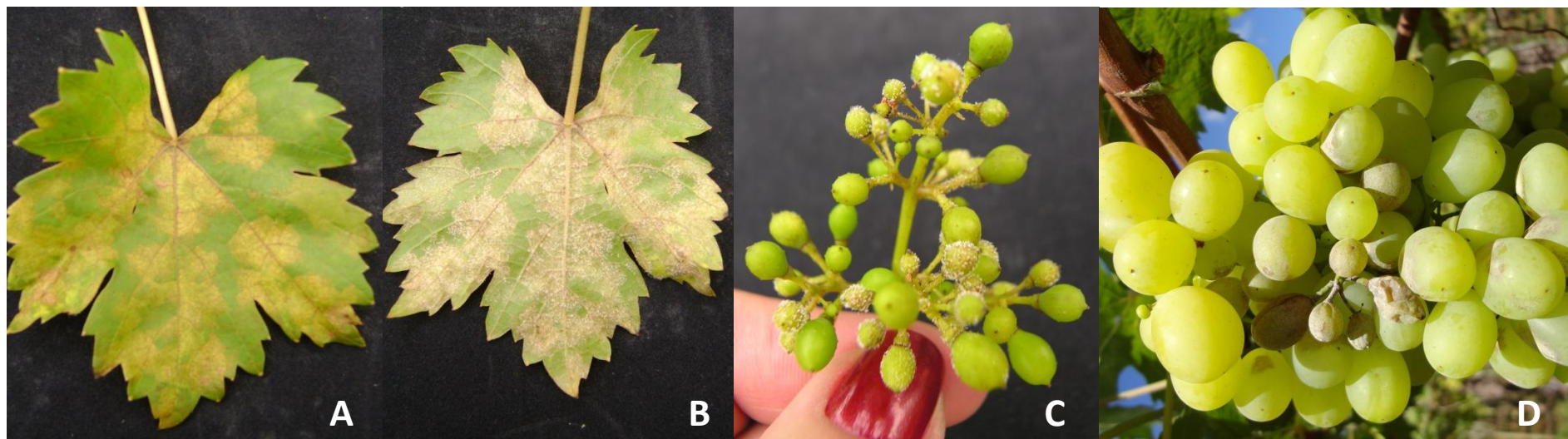


Figura 3. Sintomas causados por *Plasmopara viticola* em folhas e bagas de videira: (A) mancha de óleo na face superior da folha; (B) esporulação recente na face inferior da folha; (C) esporulação de *P. viticola* em frutos novos e (D) sintoma do ataque do patógeno no cacho, causando escurecimento e secamento dos frutos novos.

1.6. Raças fisiológicas de *Plasmopara viticola*

O termo raça fisiológica é usado para designar variantes de uma espécie fitopatogênica (bactérias, fungos ou nematóides) que causam doença em uma variedade de uma espécie de hospedeiro, mas não em outra (Camargo, 2011). O conceito de raça surgiu com a teoria do “gene-para-gene” (Flor, 1947), em uma série de experimentos iniciados em 1942, com o patossistema linho-*Melampsora lini*. Nesse trabalho, Flor realizou cruzamentos entre raças do patógeno e entre variedades de linho e analisou a segregação dos tipos de reações. Dessas observações resultou o enunciado original de sua Teoria, segundo a qual, *cada gene de resistência no hospedeiro encontra um gene complementar no patógeno que lhe confere capacidade em causar doença*. Esse conceito é de grande importância para a fitopatologia, pois serviu de base para modelos teóricos que se propõem a interpretar em nível molecular as interações entre patógenos e seus hospedeiros.

A formação de raças fisiológicas e a quantificação de diferenças na agressividade dos isolados de *P. viticola* foi estudada em populações de *P. viticola* da Europa Central distribuídas em 60 cultivares de videira (Grünzel, 1960). Foi observada uma ampla distribuição de reações de susceptibilidade/resistência dos acessos analisados, em relação às diferentes populações do patógeno. O pesquisador não detectou diferenças em patogenicidade, na morfologia e na fisiologia, nem diferenças na agressividade entre os isolados de *P. viticola*, que justificassem a classificação de raças fisiológicas do patógeno. No entanto, o estudo alertou para a possibilidade de que raças resistentes à fungicidas poderiam aparecer. A questão de raças fisiológicas foi novamente levantada com a descrição de isolados resistentes a fungicidas (Gay-Bellile *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 2007). Outro estudo de isolados resistentes ao fungicida inibidor de quinona (QoI), utilizando plantas de Cabernet Sauvignon, mostrou que os isolados resistentes apresentaram maior eficiência de infecção que isolados

sensíveis, enquanto que não houve diferença significativa na capacidade de esporulação e período de latência entre os isolados sensíveis e resistentes (Corio-Costet *et al.*, 2011).

Kast (2001), descreve *P. viticola* crescendo em híbridos resistentes, Regent e Trollinger. Nesse trabalho o autor relata que a quebra de resistência pode ocorrer pela adaptabilidade do patógeno ao hospedeiro.

A interação gene-a-gene foi proposta para o processo de reconhecimento do míldio, observado na cultivar “Bianca”, uma vez que o loco de resistência *Rpv3* foi mapeado para um conjunto de genes de receptores de NBS-LRR (Bellin *et al.*, 2009) e a resistência baseada na resposta de hipersensibilidade (HR) desta cultivar foi superada por um isolado de *P. viticola*, que provavelmente carregava mutações em seus genes de avirulência (*Avr*) (Peressotti *et al.*, 2010). O fenótipo de resistência em *Rpv3* foi estabelecido pela combinação de locos que contém os genes CC-NBS-LRR e TIR-NBS-LRR no genoma de *Vitis* (Velasco *et al.*, 2007).

Recentemente, uma raça quebrou a resistência da cultivar Bianca (Peressotti *et al.*, 2010), relatada como resistente nos estudos de Bellin *et al.* (2009). Nesse trabalho os autores relatam o surgimento de um isolado de *P. viticola* (isolado SL, proveniente da República Checa), que supera especificamente o gene *Rpv3* (Resistência à *Plasmopara viticola*), o principal gene de resistência da cultivar Bianca. O gene de resistência *Rpv3* foi encontrado no cromossomo 18, correspondendo à resistência derivada de espécies silvestres Norte-americanas, introduzidas de *Seyve Villard* (Welter *et al.*, 2007; Bellin *et al.*, 2009). A quebra de resistência encontrada por Peressotti *et al.* (2010), mostra que a interação R-Avr é altamente específica e suficiente para evitar a ativação da defesa da planta. Os autores relataram que o isolado SL evita a detecção do gene R, provavelmente devido a uma mutação no gene *Avr* correspondente ao loco *Rpv3*.

O número limitado de informações sobre a quebra de resistência por isolados de *P. viticola* deve-se, principalmente, ao uso restrito de variedades resistentes plantadas nas

principais regiões produtoras mundial, onde a maioria das superfícies vitícolas são ocupadas por variedades suscetíveis de *V. vinifera*.

1.7. Diversidade genética e estrutura de populações de *Plasmopara viticola*

A estrutura genética de uma população refere-se à quantidade e distribuição da variação genética entre e dentro de populações (McDonald & Linde, 2002), depende da sua história evolucionária e varia com o tempo e/o espaço, ou adapta-se em respostas às alterações nas condições ambientais. Forças evolutivas, como recombinação genética, seleção natural, deriva genética, mutação, padrões de acasalamento ou migração, têm importante impacto na composição genética de uma população (Ferreira & Grattapaglia, 2006). A interação entre estes parâmetros evolucionários determina a estrutura genética da população do patógeno. Fatores como tamanho de população e o modo de reprodução (sexual ou assexual), influenciam na distribuição da variação genética entre e dentro de populações.

Invasões biológicas podem ter consequências ecológicas, econômicas e sociais importantes, principalmente quando envolvem a introdução e disseminação de patógenos invasores de plantas. Com a globalização do comércio de produtos de origem vegetal, espécies patogênicas estão sendo cada vez mais introduzidas para fora dos seus locais de origem. De acordo com Giraud *et al.* (2010), doenças de plantas podem ameaçar ecossistemas naturais e comprometer a produção de alimentos. Essas introduções representam um grande impacto sobre a diversidade e estrutura da população do patógeno. É importante estudar as consequências genéticas complexas da introdução do patógeno, para entender a dinâmica das populações invasoras, que geralmente levam a uma perda da diversidade genética, devido aos

efeitos de deriva genética. A dinâmica espacial das populações geralmente envolvem interações complexas entre migração e tamanho efetivo da população (Excoffier *et al.*, 2009).

O conhecimento da quantidade e distribuição da variação genética dentro e entre populações é um componente importante na compreensão da biologia populacional de uma espécie. Uma alta diversidade genética distribuída em uma pequena escala espacial sugere a possibilidade de rápida adaptação do patógeno a mudanças ambientais, dificultando a exploração de genes de resistência no hospedeiro ou do controle baseado no uso de fungicidas.

Apesar da importância econômica de *P. viticola*, nada se conhece sobre a diversidade genética e estrutura dentro e entre as populações brasileiras. Na última década, vários estudos genéticos de população foram realizados com um conjunto de apenas quatro marcadores microssatélites, para avaliar a diversidade genética de *P. viticola* (Gobbin *et al.*, 2003a, 2003b, 2005, 2006, 2007; Rumbou & Gessler, 2004, 2006; Scherer & Gisi, 2006; Koopman *et al.*, 2007; Matasci *et al.*, 2010). Estes estudos foram realizados em pequena escala espacial (ou seja, dentro de vinhedos) e mostraram que populações de *P. viticola* originaram de reprodução sexuada em regiões temperadas, principalmente com cruzamentos aleatórios a nível do vinhedo.

A capacidade de detectar e mensurar a diversidade genética de populações é indispensável para o manejo e o uso eficiente dos recursos genéticos. Técnicas moleculares baseadas na análise do DNA têm sido aplicadas com êxito em diversas áreas da Micologia, possibilitando o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos no diagnóstico de fitopatógenos, bem como de detecção e mensuração de diversidade genética.

Jürges *et al.* (2009) mostraram que os isolados de *P. viticola* coletados na Europa não infectam facilmente espécies de *Vitis* da América do Norte e do Leste da Ásia. No primeiro caso, foram observadas reações fortes de defesa, no segundo, foi produzido apenas micélio

superficial. Ambos os resultados sugerem um alto grau de especialização do fungo. Recentemente, espécies até então desconhecidas foram identificadas sendo infectadas por populações norte-americanas de *P. viticola* (Rouxel *et al.*, 2013). Esse trabalho ilustra como patógenos biotróficos de plantas podem diversificar-se pela especialização da planta hospedeira e surgir em um agrossistema de hospedeiras cultivadas através de mutação.

O conhecimento mais aprofundado das características das populações de *P. viticola* nos principais polos produtores de uva do Brasil é condição fundamental na orientação dos programas de melhoramento de *Vitis*. Muitos estudos biológicos e epidemiológicos (Hill, 1998; Kennelly *et al.*, 2007) têm contribuído para a compreensão da biologia do patógeno. Contudo, ainda são limitadas as informações sobre a diversidade genética e a constituição da estrutura das populações de *P. viticola*.

Em grande parte dos vinhedos da França, Itália, Suíça e Alemanha a diversidade genética de *P. viticola*, detectada através da análise de polimorfismo de DNA foi considerada alta (Stark-Urnau *et al.*, 2000; Gobbin *et al.*, 2003a, 2003b, 2005, 2006; Rumbou & Gessler 2004, 2006; Scherer & Gisi, 2006; Matasci *et al.*, 2010). Em estudos realizados na África do Sul e Grécia, os pesquisadores também detectaram alta diversidade genética do patógeno (Koopman *et al.*, 2007; Rumbou & Gessler, 2007). Em contraste, detectou-se baixa diversidade genética em isolados coletados nas Ilhas Gregas (Rumbou & Gessler, 2006), América e Europa (Delmotte *et al.*, 2006; Rouxel *et al.*, 2012; Fontaine *et al.*, 2013).

Um estudo de *P. viticola* em larga escala, realizado na Europa (Gobbin *et al.*, 2006), utilizando 8.991 isolados coletados em 5 países (França, Suíça, Itália, Alemanha e Grécia) concluiu que as amostras apresentavam alta diversidade genética e genotípica, estruturada em cinco grupos, com base na origem geográfica. Nas comparações F_{ST} par-a-par, as análises de distância genética revelaram dois grupos com distribuições geográficas distintas, um na Europa Central e outro na Grécia. Os autores concluíram que nas populações da Europa

central, ocorreu o isolamento pela distância e sugeriram um modelo de migração passo-a-passo. Nenhum isolamento pela distância foi encontrado dentro das populações gregas, provavelmente devido a barreiras geográficas naturais, como o mar e as montanhas.

De todos esses estudos, apenas o desenvolvido por Delmotte *et al.* (2006) utilizou sete outros marcadores microssatélites, diferentes dos anteriores, e constatou baixa diversidade genética em populações de *P. viticola*. A alta diversidade genética encontrada nos trabalhos anteriores é baseada apenas em quatro marcadores microssatélites (ISA, BER, CES e GOB). Destes, apenas os marcadores GOB e CES possuem alta heterozigosidade (H_e) e alto Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC). Em todos os casos, um ou poucos genótipos apareceram com maior frequência, predominando nas populações estudadas.

Schröder *et al.* (2011), com base em um marcador nuclear e dois mitocondriais, relataram que os isolados de vinhedos nos Estados Unidos pertencem a apenas três linhagens filogenéticas altamente distintas. Uma delas contém estirpes europeias e afeta cultivares de *Vitis vinifera*, enquanto as outras duas linhagens afetam também outras espécies de *Vitis*. Os autores relatam ainda que a divergência entre essas linhagens é alta e, a julgar pela variação genética existente em outras linhagens de *Plasmopara*, pode refletir em espécies distintas.

Constata-se, pois, uma forte discrepância de resultados observados nestes diferentes estudos. A diversidade genética de populações de *P. viticola* nunca foi estudada no Brasil, apesar da importância econômica que esse patógeno representa no país. Destaque deve ser dado a esta área de estudo por sua importância face à expansão da viticultura para as regiões tropicais brasileiras.

1.8. Resistência genética da videira a *Plasmopara viticola*

Os genes de resistência genética ao mildio caracterizados até o presente momento em plantas possuem regiões filogeneticamente conservadas que têm sido usadas para classificá-los em diferentes grupos. Estas regiões incluem proteínas ricas em leucina (LRR), sítios de ligação a nucleotídeos (NBS), estruturas complexas de NBS-LRR e proteínas quinases (Staskawicz *et al.*, 1995; Hammond-Kosack & Jones, 1997). A conservação estrutural dos genes de resistência apresenta interesse do ponto de vista genético, uma vez que claramente sugere que essas regiões conservadas poderiam representar sítios de relevância biológica na expressão fenotípica dos genes de resistência (Bent, 1996). Em videiras resistentes, os mecanismos de resistência pós-infecção incluem deposição de calose (Gindro *et al.*, 2003), acúmulo de estilbenos (Pezet *et al.*, 2004; Gindro *et al.*, 2006), processos de defesa associados à parede celular (Díez-Navajas *et al.*, 2008; Jürges *et al.*, 2009), o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e aumento de atividade da peroxidase (Kortekamp & Zyprian, 2003) e ativação de resposta de hipersensibilidade (Kortekamp & Zyprian, 2003; Kortekamp, 2006; Díez-Navajas *et al.*, 2008; Bellin *et al.*, 2009) em reação à inoculação com *P. viticola*. Contudo, pouco se sabe sobre a localização, estrutura e função dos genes de resistência a *P. viticola* em videira.

Resultados de análises de expressão de genes confirmaram a idéia de que a resistência ao mildio em *V. riparia* Michaux (Polesani *et al.*, 2010) e *V. amurensis* Ruprecht (Wu *et al.*, 2010) é baseada em mecanismos de pós-infecção. Videiras resistentes reagem à inoculação de *P. viticola* pela rápida ativação de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (Kortekamp, 2006) e genes envolvidos na transdução de sinais relacionados com a resposta de defesa e processos metabólicos, incluindo a rota dos fenilpropanóides (Kortekamp, 2006; Polesani *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010). A produção de fitoalexina (estilbenos simples e

condensados) é uma das mais importantes respostas à infecção fúngica em videira (Schmidlin *et al.*, 2008; Alonso-Villaverde *et al.*, 2011). O acúmulo de vários compostos antimicrobianos, tais como resveratrol e viniferinas, foram observados após a inoculação de videiras resistentes a este patógeno (Dai *et al.*, 1995; Pezet *et al.*, 2004; Jean-Denis *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2011). Em videiras suscetíveis, análises de expressão de genes revelaram que as plantas reagem à inoculação de *P. viticola* através da ativação da expressão de genes relacionados com a defesa (Kortekamp, 2006; Chong *et al.*, 2008; Trouvelot *et al.*, 2008), mas esta reacção não é suficiente para impedir ou limitar a infecção.

O uso de variedades de videira que mostram resistência durável ao míldio é considerado uma estratégia promissora para controlar a doença (Bisson *et al.*, 2002). Os estudos de interação patógeno-hospedeiro indicam que os cultivares de *V. vinifera* até agora testados são suscetíveis à *P. viticola* (Jürges *et al.*, 2009). Resistência genética ao fungo, por outro lado, tem sido observada com frequência em espécies silvestres de *Vitis*. Isto significa que os genes de resistência ao patógeno devem ser introduzidos em *V. vinifera* a partir destas espécies pelos programas de melhoramento, ao mesmo tempo em que são mantidas as características agronômicas superiores dos clones cultivados de *V. vinifera*.

Fontes de resistência ao míldio foram identificadas em espécies silvestres americanas (Alleweldt & Possingham 1988; Eibach *et al.*, 2010) e asiáticas (Wan *et al.*, 2007; Jürges *et al.*, 2009). Espécies americanas de *Vitis* exibem resistência a *P. viticola* e têm sido utilizadas pelos programas de melhoramento para criação de híbridos resistentes ao míldio. A resposta da planta à infecção por *P. viticola* tem sido caracterizada predominantemente por meio de estudos de incompatibilidade em espécies como *Vitis riparia*, *V. rupestris*, *V. rotundifolia* e *V. amurensis* (Merdinoglu *et al.*, 2003; Díez-Navajas *et al.*, 2008; Marguerit *et al.* 2009; Moreira *et al.*, 2011; Peressotti *et al.*, 2010; Blasi *et al.*, 2011; Schwander *et al.*, 2011).

Tentativas para criar cultivares de videira com os genes para resistência ao mildio provenientes de espécies americanas e várias espécies asiáticas, têm mostrado que a característica de resistência é quantitativamente herdada (Eibach *et al.*, 1989; Moreira *et al.*, 2011). Um estudo comparativo (Jürges *et al.*, 2009) revelou que espécies silvestres norte-americanas são dotadas de um alto grau de resistência, enquanto que videiras cultivadas (*V. vinifera*) são extensivamente colonizadas por *P. viticola*. Embora cultivares européias de *Vitis vinifera* sejam altamente suscetíveis à *P. viticola*, espécies de *Muscadinia* e várias espécies americanas e asiáticas de *Vitis* exibem diferentes níveis de resistência ao patógeno. Acessos resistentes das espécies silvestres *Vitis riparia* Michaux, *Vitis cinerea* Arnold, *Vitis labrusca* L, *Vitis rupestris* Scheele, *Vitis berlandieri* Planch, *Vitis lincecumii* Buckley e *Muscadinia rotundifolia* Michaux exibem níveis variáveis de resistência (Dai *et al.*, 1995; Kortekamp & Zyprian, 2003; Unger *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2007; Cadle-Davidson, 2008; Diez-Navajas *et al.*, 2008).

Espécies silvestres são fontes confiáveis de resistência a muitas doenças e estresses ambientais que afetam as videiras cultivadas (Moreira *et al.*, 2011). *Vitis vinifera* pode ser cruzada com quase todas as espécies silvestres de *Vitis* da América do Norte e Central e Ásia ocidental (Alleweldt & Possingham, 1988; Moreira *et al.*, 2011) e geralmente gera descendentes férteis.

A resistência pode ser qualitativa ou quantitativa. A qualitativa, controlada por genes R, que de alguma forma estão envolvidas no reconhecimento do patógeno, e a quantitativa, controlada por genes que atuam em etapas subsequentes ao reconhecimento. A resistência qualitativa é monogênica, efetiva somente para determinadas raças do patógeno e pouco durável se comparada com a resistência quantitativa que, ao contrário, é poligênica e efetiva contra um amplo espectro de raças (Camargo, 2011). Em termos epidemiológicos, resistência

qualitativa é sinônimo de resistência vertical, ao passo que resistência quantitativa é sinônimo de resistência horizontal (Vanderplank, 1968).

A natureza qualitativa da resistência se deve ao fato de os genes atuantes estarem envolvidos de alguma forma no processo de reconhecimento do patógeno. Estes genes possuem efeito marcante no fenótipo, pois se houver o reconhecimento não haverá doença e, caso contrário, a doença se manifestará. O reconhecimento depende da ação de vários genes que atuam em conjunto, onde um gene controla a expressão de outros, que por sua vez controlam outros, gerando uma rede de expressão gênica na qual existem genes centrais e secundários. O gene central é comumente denominado de gene R e corresponde aos receptores de sinais de MAMPs (*Microbe Associated Molecular Pattern*), ao passo que os genes de efeitos secundários controlam as diversas respostas bioquímicas do hospedeiro que se seguem após uma infecção bem sucedida. A planta reconhece uma molécula do patógeno através de receptores moleculares específicos para a toxina, ou ainda a planta reconhece a alteração em uma de suas moléculas que ocorre em função do ataque do patógeno e o sistema de defesa da planta é acionado (Camargo, 2011). Os componentes individuais da resposta de defesa ativa incluem a resposta de hipersensibilidade (RH), a geração de espécies reativas de oxigênio, o reforço de paredes celulares, a síntese de proteínas relacionadas à patogênese, a inclusão de resistência adquirida e o acúmulo de fitoalexinas.

A resistência qualitativa é mais usada nos programas de melhoramento genético, por ser mais fácil de trabalhar. A distinção entre plantas resistentes e suscetíveis é mais fácil que no caso de resistência quantitativa; se manifesta precocemente e apresenta herança mendeliana simples, o que requer métodos mais simples de seleção. Não obstante, apresenta as sérias limitações de durabilidade e raça-especificidade.

No caso da resistência quantitativa, o melhoramento é obtido através de métodos que permitam o acúmulo gradual dos alelos favoráveis nos vários genes que controlam a

característica. É um processo lento e requer várias gerações. A dificuldade em relação à resistência qualitativa é a avaliação do fenótipo das plantas, ou seja, é bem mais difícil distinguir plantas resistentes de suscetíveis quando as variações entre elas são sutis. É preciso quantificar os sintomas que cada uma apresenta e isto, na prática, é mais complicado do que no caso da resistência qualitativa (Camargo, 2011). Outro problema é o efeito do ambiente na manifestação dos sintomas, que pode mascarar pequenas diferenças entre genótipos. O ciclo da cultura também deve ser levado em consideração.

Em culturas perenes como a videira, a pressão pela quebra da resistência é maior do que em culturas anuais, devido ao tempo mais dilatado de convívio entre o patógeno e o hospedeiro e a desvantagem da difícil e onerosa troca de cultivar no caso da quebra da resistência. O plantio de uma variedade contendo um gene R em larga escala exerce uma pressão de seleção na população do patógeno, de modo a selecionar genótipos (seleção direcional) com genes de virulência correspondentes ao gene R. Desse modo, quando a doença passa a causar perdas significativas em produtividade, decreta-se a “quebra” da resistência.

A incorporação de mais de um gene R na variedade poderia ser uma estratégia para aumentar a vida útil da mesma. Esta estratégia é denominada piramidação de genes e é usada na prática em várias espécies, com o objetivo de gerar uma variabilidade com múltiplos genes de resistência. Um dos problemas da piramidação de genes está na dificuldade de transferir vários genes para um único genótipo, sem que este perca sua identidade genética. Para isso, são necessários vários ciclos de retrocruzamentos. De acordo com Vanderplank (1968) outro problema é o efeito vertifolia, ou seja, perda de genes de resistência quantitativa durante um programa de melhoramento voltado para a seleção de resistência qualitativa, devido a um estreitamento da base genética. Assim, ao longo do melhoramento, alelos favoráveis de resistência genética quantitativa podem ser perdidos, resultando no baixo nível dessa

resistência. Diz-se que a seleção para genes R reduz a pressão de seleção para genes de resistência quantitativa e estes podem ser perdidos pelo fenômeno da deriva genética.

Embora a resistência qualitativa seja mais fácil de ser identificada, ela apresenta um sério inconveniente, ela é mais fácil de ser vencida pelo patógeno. Já a resistência quantitativa é mais durável, pois conceitualmente está além da capacidade microevolutiva do patógeno em ser vencida. Segundo a hipótese gene-a-gene de Flor, para um gene R ser quebrado, é necessária apenas uma mutação no gene complementar de avirulência; já numa resistência quantitativa poligênica, são necessárias várias mutações, o que apresenta menor probabilidade de acontecer.

Para obtenção de variedades resistentes ao míldio, programas de melhoramento genético de vários países vêm desenvolvendo híbridos, através de cruzamentos interespecíficos seguido por retrocruzamentos, utilizando como fontes de resistência espécies silvestres Norte-americanas e Asiáticas de *Vitis*. Na cultura da videira, um dos principais objetivos dos programas de melhoramento é introduzir genes de resistência à patógenos para a base genética de *Vitis vinífera* (suscetível). Dessa forma, híbridos resistentes têm sido desenvolvidos combinando resistência à doença com a produção de frutos de alta qualidade (Ritschel *et al.*, 2010), de forma sustentável e ecologicamente equilibrada.

Os principais programas de melhoramentos de videiras são desenvolvidos por Instituições Governamentais de Pesquisa em vários países e muitas vezes atuam em colaboração com Universidades Federais. As principais instituições são:

- Na Itália (Istituto Agrario di San Michele all'Adige - IASMA; Istituto di Genomica Applicata, Parco Scientifico e Tecnologico Luigi Danieli; University of Verona; University of Udine; Università Cattolica del Sacro Cuore; University, Padova);
- Na França (Institut National de la Recherche Agronomique -INRA; Institut des Sciences de la Vigne et du Vin - ISVV; Université de Strasbourg; Université de Bordeaux);

- Na Alemanha (Federal Centre for Breeding Research on Cultivated Plants; Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof; Hochschule RheinMain, Geisenheim Research Center; State Institute for Viticulture and Oenology, Freiburg; University of Karlsruhe) e
- Nos Estados Unidos da América (United States Department of Agriculture - USDA; University of Arizona, Tucson).

As fontes de resistência mais estudadas são: *V. riparia*, *V. cinerea*, *V. labrusca*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. lincecumii* e *Muscadinia rotundifolia*. Genes de resistência ao míldio de espécies asiáticas *V. amurensis* foram inicialmente introgrididos por melhoristas soviéticos para a base genética de *V. vinifera*, enquanto que os melhoristas europeus trabalharam com outros genes de resistência de videiras norte-americanas.

Avanços para a elucidação do patossistema *Vitis/Plasmopara* têm sido possíveis usando várias abordagens como: o desenvolvimento de tecnologias para análise genômica de *Vitis* (Dereeper *et al.*, 2011) e do fungo (Kortekamp, 2005; Allègre *et al.*, 2007; Díez-Navajas *et al.*, 2008), análise molecular da interação patógeno/hospedeiro (Jürges *et al.*, 2009), genética de populações do patógeno (Rumbou & Gessler, 2007), análise da severidade de doença (Matasci *et al.*, 2010), estudo de resistência em espécies de *Vitis* americanas (Cadle-Davidson, 2008) e asiáticas (Wan *et al.*, 2007), análise de transcrição gênica (Kortekamp *et al.*, 2008; Polesani *et al.*, 2008; Figueiredo *et al.*, 2008, 2012; Polesani *et al.*, 2010; Malacarne *et al.*, 2011) e identificação de locos controladores de características quantitativas (QTL) através de análise de populações segregantes (Dalbo *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2004; Wiedemann-Merdinoglu *et al.*, 2006; Welter *et al.*, 2007; Bellin *et al.*, 2009; Peressotti *et al.*, 2010; Blasi *et al.*, 2011; Schwander *et al.*, 2011).

Marcadores moleculares associados com genes de resistência ao míldio foram identificados para facilitar a introgressão de resistência ao patógeno (Eibach *et al.*, 2007; Di

Gaspero *et al.*, 2007; Mahanil *et al.*, 2007; Welter *et al.*, 2007). Só após o início do desenvolvimento dos mapas genéticos de ligação para videira é que foi iniciada a análise genética detalhada desta característica complexa (Lodhi *et al.*, 1995). Os mecanismos envolvidos na resistência ainda não são bem conhecidos, e esforços têm sido feitos na localização e compreensão das regiões do genoma da videira que controlam resistência à *P. viticola*.

1.9. Sequenciamento de genomas: Next Generation Sequencing – NGS

Metodologias de NGS (Next Generation Sequencing) têm sido utilizadas de forma crescente para auxiliar projetos de sequenciamento de genomas completos e principalmente em projetos de re-sequenciamento de genomas de organismos, para os quais existem genomas de referência (Metzker, 2010; Capra *et al.*, 2010).

A tecnologia baseia-se na redução de complexidade genômica da amostra de DNA total, utilizando combinações específicas de enzimas de restrição (ER), otimizadas para cada espécie. Os fragmentos selecionados resultantes são submetidos ao sequenciamento para a geração de dezenas de milhões de sequências curtas (em geral 76 bases) em plataformas de sequenciamento Illumina de NGS (*Next Generation Sequencing*), nas quais os polimorfismos são detectados. Após a redução de complexidade via enzimas de restrição e antes do sequenciamento, cada amostra de DNA a ser genotipada recebe adaptadores com sequências indexadoras (barcodes) que permitem mais tarde rastrear as sequências geradas para cada amostra. Desta forma, 96 amostras podem ser sequenciadas conjuntamente, em cada canaleta de sequenciamento, otimizando significativamente os custos. Assim, são detectados

polimorfismos de presença ou ausência entre amostras derivadas da variabilidade, na distribuição dos sítios de restrição e de SNPs (Single Nucleotide Polimorphisms) entre sequências em comum entre todas as amostras. Em cada corrida de sequenciamento em plataforma Illumina, podem ser genotipadas 768 amostras e gerados milhares ou dezenas de milhares de marcadores, dependendo da diversidade nucleotídica da espécie.

Diferentes tecnologias NGS foram desenvolvidas recentemente, tais como 454 Life Sciences (adquirida pela Roche), Solexa (adquirida pela Illumina), ABI SOLID (adquirida pela Agencourt Biosciences), todas elas capazes de gerar centenas de milhares ou dezenas de milhões de sequências de tamanho variável, que hoje variam de 35 a quase 5000 pares de base a custos relativamente baixos (Mardis, 2008; Rounsley *et al.*, 2009).

O sequenciamento Illumina foi primeiro aplicado em transcriptoma e montagem do genoma, seguido pela detecção de marcadores microssatélites (Garg *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012; O'Bryhim *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013) e descoberta de grande número de SNPs para diversas espécies (Barbazuk *et al.*, 2007; Brockman *et al.*, 2008; Grattapaglia, *et al.*, 2011). Recentemente foram publicados outros trabalhos mostrando o sucesso da técnica em milho, cevada e trigo (Elshire *et al.*, 2011; Poland *et al.*, 2012), braquiária (Silva *et al.*, 2013) e arroz (Rounsley *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de sequenciamento em plataformas de NGS oferece uma oportunidade para sequenciar e realizar análises comparativas em um grande número de genomas, incluindo fitopatógenos (Soanes *et al.*, 2007). Em *Plasmopara viticola* esta tecnologia foi usada como ferramenta para comparação de expressão de genes (Wu *et al.*, 2010) e identificação ESTs (*Expressed Sequence Tags*) que foram utilizados em estudos de genes candidatos de avirulência na interação *Vitis*/míldio (Mestre *et al.*, 2012). A possibilidade de sequenciar um genoma de forma representativa, associando baixo custo e redução de tempo, potencializa os NGSs a se tornarem tecnologias genômicas dominantes.

1.10. O genoma de *Plasmopara viticola*

Espécies da Classe dos Oomicetos sequenciadas até agora incluem agentes causais de importantes doenças em nível mundial, tais como espécies de *Phytophthora* e *Pythium*. No entanto, *Plasmopara viticola*, apesar da importância que representa para a cultura da uva, ainda não teve seu genoma totalmente sequenciado.

Plasmopara viticola possui um genoma pequeno, de aproximadamente 40 Mpb, semelhante a outros patógenos oomicetos já sequenciados, como *Phytophthora* (Tyler *et al.*, 2006) e *Pythium* (Levesque *et al.*, 2010). Até o momento, análises comparativas de patógenos oomicetos mostraram variação no tamanho e conteúdo do genoma (Tyler *et al.*, 2006; Baxter *et al.*, 2010; Levesque *et al.*, 2010; Martens & Van de Peer, 2010; Seidl *et al.*, 2011, 2012). De acordo com Judelson (2012), o genoma dos oomicetos possui um tamanho mínimo de 37 Mpb até um máximo de 280 Mpb. O conteúdo de genes pode variar de 13.000 a 26.000, com grande variação no conteúdo de DNA repetitivo, sendo 7% em *Pythium ultimum* (Levesque *et al.*, 2010) e 74% em *Phytophthora infestans* (Tyler *et al.*, 2006; Adhikari *et al.*, 2013).

Estudos recentes produziram 677 entradas de *P. viticola* no banco de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Essas entradas correspondem a sequências de origem mitocondrial ou ribossomal, relacionadas com os seguintes temas: mecanismos bioquímicos de defesa vegetal (compostos fenólicos, proteínas relacionadas à patogênese, fitoalexinas e elicitores), fatores de virulência (enzimas e sistema *Avr*), regulação da expressão gênica e desenvolvimento de marcadores microsatélites.

Alguns trabalhos sobre sequenciamento do genoma de *P. viticola* foram publicados a partir de bibliotecas de DNA, cDNA e RNA e utilizados para diferentes finalidades: desenvolvimento de marcadores microsatélites (Gobbin *et al.*, 2003a; Delmotte *et al.*, 2006;

Matasci *et al.*, 2010; Rouxel *et al.*, 2012) e identificação de genes envolvidos na patogenicidade (Mestre *et al.*, 2012);

Apesar dos avanços na caracterização dos genes de resistência a partir de espécies de *Vitis*, o conhecimento sobre a genética de *P. viticola* é escasso. Pouco se sabe sobre a genética e a natureza dos genes de avirulência desse patógeno obrigatório. Mestre *et al.* (2012) identificaram 81 genes efetores de patogenicidade, através de análise de expressão de genes de zoósporos germinados de *P. viticola*, dos quais 26 genes codificam para proteínas com funções envolvidas na patogênese. A identificação de genes de avirulência é um passo necessário para a compreensão da biologia da interação *Plasmopara/Vitis*, além de fornecer informações valiosas para escolha de uma combinação mais eficiente de genes de resistência (Michelmore, 2003; Birch *et al.*, 2008), com objetivo de alcançar uma resistência duradoura.

Após o completo sequenciamento do genoma de *P. viticola*, será possível não só um melhor entendimento da interação patógeno/hospedeiro, mas também a identificação de genes de avirulência correspondentes aos diferentes genes de resistência da videira. A identificação e caracterização dos efetores de avirulência de *P. viticola* potencializa a identificação de perfis funcionais de fontes de resistência, bem como a escolha das melhores combinações de genes numa estratégia de pirâmidação, melhorando assim a eficiência dos programas de melhoramento para a resistência ao míldio da videira.

1.11. Genoma da videira

Um consórcio franco-italiano publicou em 2007 uma versão da sequência do genoma de *Vitis vinifera*, sendo este, à época, o quarto genoma de plantas e o primeiro de uma espécie frutífera a ser sequenciado, com tamanho aproximado de 475 a 500 Mb (Jaillon *et al.*, 2007).

Quarenta e um por cento do genoma da videira é constituído de elementos repetitivos e transponíveis. Estimou-se que cerca de 30.000 genes estão distribuídos no genoma da videira. O genoma é bastante polimórfico entre os acessos de videira. Cerca de 2 milhões de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) foram identificados, com aproximadamente 1 SNP a cada 100 pb e uma indel (inserção/deleção) a cada 0,45 Kb (Velasco *et al.*, 2007). Estudos no genoma de *V. vinifera* revelaram que os genes de resistência e outros genes envolvidos nos processos de defesa, tendem a ser localizados em maior densidade nos cromossomos 5, 7, 9, 12, 13, 18 e 19, próximos a regiões genômicas associadas com a resistência a *P. viticola* em videiras silvestres (Di Gaspero & Cipriani, 2003; Di Gaspero *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2007; Moroldo *et al.*, 2008).

O sequenciamento e montagem do genoma de *Vitis* possibilita um maior aprofundamento no controle genético de características de interesse econômico, como qualidade do vinho, metabólitos secundários, resistência a patógenos, produtividade, entre outros. Após o sequenciamento e mapeamento físico do genoma da videira (Jaillon *et al.*, 2007), o padrão de distribuição de genes candidatos para resistência a doenças vem sendo descrito. Velasco *et al.* (2007) disponibilizam o mapeamento de genes de resistência, distribuídos nos 19 cromossomos da videira e descrevem o domínio desses genes, responsáveis pela iniciação dos sinais de transdução que ativam os mecanismos de defesa. Esta montagem do genoma indicou genes candidatos envolvidos em características relevantes para a cultura da uva, tais como aqueles que influenciam a qualidade do vinho, através de metabólitos secundários, e aqueles relacionados com a suscetibilidade a agentes patogênicos. Neste estudo os pesquisadores encontraram 341 genes NBS (Sítio de ligação no nucleotídeo), sendo que 233 desses genes NBS, contêm o domínio de LRR (Repetição rica em leucina), podendo ser agrupados em: TIR-NBS-LRR, CC-NBS-LRR e NBS-LRR. Na extremidade N-terminal de proteínas de NBS-LRR realiza tanto o domínio espiral enrolada (CC, coiled coil),

ou um domínio homólogo ao receptor Interleukin-1 (TIR) (Toll/Interleukin-1 Receptor), o que permite a classificação dos genes NBS em dois grupos, o CC-NBS-LRR e TIR-NBS-LRR. O grupo CC-NBS-LRR incluiu 84 genes em *Vitis*, enquanto o grupo TIR-NBS-LRR incluiu 37 genes. A NBS é parte de um domínio conservado e atua como um interruptor molecular para a transdução de sinal. A LRR possui especificidade de reconhecimento de efetores de patógenos. Além disso, a família de genes NBS inclui cinco genes truncados TIR-NBS, 112 genes truncados NBS-LRR e 103 genes caracterizados apenas pelo domínio NBS. Além dos genes NBS, o genoma da videira contém vários componentes de sinalização de resposta a doenças, codificadas pelos genes EDS1, PAD4, COI1, MPK4, JAR1, ETR1 e NDR1, conhecidos como produtos de genes de resistência.

Outros estudos também representam extrema importância para uma melhor compreensão do genoma: 1) Detecção de loco de resistência a *P. viticola* (*Rpv*) e identificação de marcadores associados à resistência (Merdinoglu *et al.*, 2003; Wiedemann-Merdinoglu *et al.*, 2006; Di Gaspero *et al.*, 2007; Welter *et al.*, 2007; Bellin *et al.*, 2009; Marguerit *et al.*, 2009; Blasi *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2011; Schwander *et al.*, 2011; Venuti *et al.*, 2013); 2) Estudos sobre apirenia (Cabezas *et al.*, 2006; Mejía *et al.*, 2011; Karaagac *et al.*, 2012; Akkurt *et al.*, 2012); 3) Estudos sobre a família gênica FT/TFL1 que codifica proteínas que funcionam como promotores e repressores de floração (Carmona *et al.*, 2007); 4) Mapeamento de famílias gênicas complexas, mostrando a co-localização dos principais grupos NBS-LRR e locos (Moroldo *et al.*, 2008) e 5) Estudos de diversidade genética e estrutura de populações em coleções de germoplasma.

Na China, um grupo de pesquisadores desenvolveu trabalhos sobre a organização genômica e identificação de famílias gênicas em *V. vinifera*. Zhang *et al.* (2012a), identificaram a família gênica *TIFY* (designação do motivo conservado (TIF[F/Y]XG), responsável por diversas respostas a estresses bióticos e abióticos e outros padrões de

expressão gênica, como desenvolvimento da planta, crescimento da raiz, germinação da semente, floração e senescência. Zhang *et al.* (2012b) identificaram e analisaram uma super família gênica (aldeído desidrogenase - *ALDH*), com 23 genes *ALDH*, agrupados em dez famílias. Também relataram que uma série desses genes apresentaram alteração de expressão significativa, em resposta à infecção por diferentes patógenos e desenvolvimento da baga, sugerindo novos papéis dos genes *ALDH*, em interações planta-patógeno e desenvolvimento na baga. Hou *et al.* (2013) desenvolveram uma pesquisa sobre a organização genômica, comparação filogenética e expressão diferencial e identificaram 18 famílias gênicas SBP-box em *V. vinifera*, potencialmente envolvidas em respostas de defesa contra estresses bióticos e abióticos.

1.12. Marcadores moleculares

Um marcador molecular é definido como todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um seguimento específico de DNA, correspondendo a regiões expressas ou não do genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O desenvolvimento de marcadores moleculares veio dar um impulso maior à pesquisa genética, propiciando a detecção de polimorfismo de DNA com comportamento Mendeliano, passível de ser utilizado em diferentes áreas da genética e do melhoramento de plantas. As técnicas de marcadores moleculares revelam polimorfismo de sequência de DNA, que pode ser detectado em sequências gênicas (exons) ou em regiões não-codantes (introns). O emprego de marcadores moleculares abrange uma vasta área de estudos de genética, melhoramento e evolução dos seres vivos.

Os marcadores moleculares do tipo microssatélite, também conhecidos como *SSR* (*Simple Sequence Repeats*), são marcadores moleculares baseados na amplificação de seqüências repetidas de DNA, com 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem*. Caracterizam-se por serem co-dominantes, baseados em PCR, abundantes, aparentemente distribuídos em todo o genoma, multialélicos e dependentes de pequena quantidade de DNA dos indivíduos analisados. O conteúdo genético informativo de um loco *SSR* é bastante alto, por se tratarem de seqüências de alta taxa evolutiva. O polimorfismo no tamanho dos fragmentos pode ser devido ao número diferente de repetições das seqüências simples, mudança no elemento repetitivo, como também podem ser causada por substituições, inserções/deleções de uma única base ou de fragmentos longos de DNA nas regiões que flanqueiam os microssatélites. Os polimorfismos que caracterizam os diferentes alelos podem ser detectados via PCR através de eletroforese em gel de poliacrilamida, em agarose especial de alta resolução ou em sistemas de detecção automatizados via capilares de sequenciador de DNA. A identificação dos alelos nos locos microssatélites pode ser feita diretamente com auxílio de brometo de etídeo em géis de agarose, nitrato de prata em géis de poliacrilamida ou através da detecção de picos de fluorescência em sequenciador de DNA. Os primers marcados com fluorescência possibilitam sistemas múltiplos de detecção (*multiplex*), e conseqüentemente, permitem a genotipagem simultânea de vários locos de cada amostra analisada (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Na última década, uma verdadeira revolução vem ocorrendo para facilitar a identificação e o desenvolvimento de marcadores microssatélites. Grupos de pesquisas estão utilizando tecnologias NGS de sequenciamento para gerar seqüências de dados, com objetivo de identificar regiões de microssatélites no genoma (Abdelkrim *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013). O impacto desta tecnologia sobre o desenvolvimento de marcadores microssatélites é evidente pois o sequenciamento utilizando plataformas Illumina permite a

descoberta de milhares de regiões microssatélites, potencialmente amplificáveis que podem ser selecionadas para o desenho de primers (Castoe *et al.*, 2012).

Os marcadores microssatélites tem sido a ferramenta molecular mais utilizada em *Vitis* spp. para a identificação e caracterização de variedades, avaliação da variabilidade genética, estudos de pedigree e mapeamento genético (Grando *et al.*, 2003; Riaz *et al.*, 2004; Boccacci *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2006). Os marcadores podem ser selecionados e/ou desenvolvidos para construção de mapas genéticos e associação com características de interesse do melhoramento de uva, como resistência ao mídio da videira. O uso de marcadores moleculares para piramidação de múltiplos genes de resistência vem sendo realizado com sucesso no melhoramento da videira (Eibach *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de marcadores moleculares de última geração (SSRs e SNPs), a identificação de sequências gênicas relacionadas a características de interesse e a bioinformática são temas cada vez mais comuns e atuais no melhoramento genético da videira, especialmente a partir do sequenciamento do genoma da espécie (Jaillon *et al.*, 2007). O objetivo maior é permitir a identificação precoce de genótipos de interesse do programa de melhoramento, reduzindo o tempo e os recursos financeiros e humanos dispendidos no desenvolvimento de novas cultivares desta espécie perene.

1.13. Mapeamento genético

Um mapa genético constitui-se no ordenamento e estabelecimento da distância entre marcadores genéticos ao longo dos cromossomos de uma espécie. A construção de mapas merece destaque especial durante o mapeamento e análise de genes associados a uma determinada característica de importância econômica. Embora não proporcionem informação

em nível molecular dos genes, os mapas destacam-se por auxiliar na fundamentação de estudos comparativos e de evolução, no entendimento dos processos biológicos e da organização dos cromossomos, e no apoio aos programas de melhoramento genético.

A construção de um mapa genético compreende quatro etapas: identificação de marcadores genéticos; desenvolvimento de uma população segregante; análise da herança dos marcadores genéticos na população segregante e estabelecimento da ordem dos marcadores genéticos e da distância entre eles. Mapas genéticos construídos a partir de marcadores moleculares permitem identificar, medir e mapear a magnitude do efeito dos principais genes envolvidos no controle de características monogênicas ou quantitativas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Mapas genéticos detalhados com base em marcadores moleculares vêm sendo desenvolvidos em um grande número de espécies vegetais e estão sendo utilizados em estudos de organização e evolução do genoma, bem como na identificação de genes associados ao controle de características de interesse econômico.

Diversos mapas genéticos baseados em diferentes marcadores moleculares (isoenzimas, RAPDs, AFLPs e SSRs) foram construídos para a videira (Lodhi *et al.*, 1995; Dalbó *et al.*, 2000; Doligez *et al.*, 2002; Grando *et al.*, 2003; Adam-Blondon *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2004; Riaz *et al.*, 2004; Fanizza *et al.*, 2005; Doligez *et al.*, 2006; Troglio *et al.*, 2007; Costantini *et al.*, 2007; Marguerit *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2011). O primeiro mapa genético de referência baseado apenas em marcadores moleculares co-dominantes microssatélites foi desenvolvido por Riaz *et al.*, (2004). As principais características mapeadas foram: resistência ao agente do míldio (*P. viticola*), resistência ao oídio (*Uncinula necator*) e apirenia. Também foram mapeados QTLs para fenologia, tamanho de baga e maturação.

1.14. Estratégia de mapeamento genético utilizando pseudo-cruzamento teste

O mapeamento genético da videira possui peculiaridades quando comparado às culturas agrícolas anuais. A videira possui um longo ciclo de vida e alta depressão por endogamia, o que dificulta a obtenção de linhagens homozigotas, e, portanto o emprego de delineamentos clássicos de mapeamento, tais como populações F₂, retrocruzamentos e linhagens puras recombinantes (RILs). Na maioria das espécies vegetais, os mapas de ligação são obtidos a partir de populações segregantes derivados de cruzamentos entre linhas puras homozigotas. No caso de culturas altamente heterozigotas como videira, uma população F₁ pode ser utilizada e o mapa genético é construído através da estratégia de pseudo-cruzamento teste.

A estratégia de pseudo-cruzamento teste é utilizada para espécies preferencialmente alógamas, quando podem ser utilizados cruzamentos entre plantas altamente heterozigotas, como substituto a um cruzamento teste. A progênie resultante, irmãos inteiros, é equivalente à progênie de um cruzamento teste para cada um dos locos que forem heterozigotos em um pai e homozigoto em outro (AaBb x aabb). Nesse caso, a progênie vai segregar na proporção 1:1 para tais locos. O termo pseudo-cruzamento teste deriva do fato de que a confirmação é inferida *a posteriori*, tanto no genótipo parental quanto na progênie segregante, enquanto, no cruzamento teste, a configuração do testador é conhecida *a priori* (Grattapaglia & Sederoff, 1994). Na realidade, um dos genitores funciona como testador, por pura chance de apresentar homozigose no loco sob análise. É possível estabelecer duas análises de segregação, uma para cada genitor, o que leva à geração de dois mapas, os quais posteriormente podem ser integrados (Figura 4). Para esta estratégia, os marcadores microssatélites co-dominantes possuem uma grande vantagem, são altamente informativos, ou seja, ocorre a expressão de

ambos os alelos em um indivíduo heterozigoto. Essa estratégia pode ser empregada tanto em plantas perenes como em plantas anuais, com grandes vantagens.

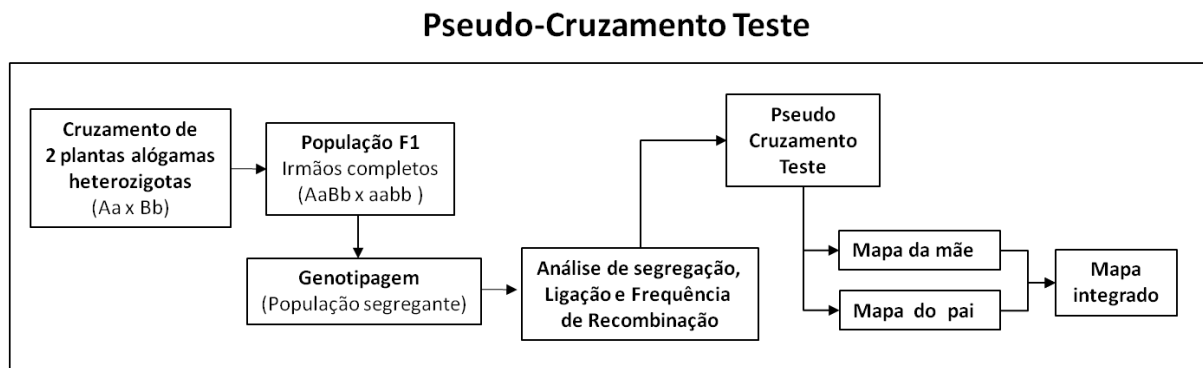


Figura 4. Esquema mostrando Estratégia de Pseudo-cruzamento teste.

1.15. Mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*)

A variabilidade alélica é a base do melhoramento genético de plantas. A combinação adequada de alelos nos locos que controlam características de interesse econômico é o principal objetivo da seleção artificial promovida pelos programas de melhoramento. A localização de genes e regiões genômicas que controlam características de interesse econômico, sejam elas qualitativas ou quantitativas, tem sido feita eficientemente através do emprego de marcadores moleculares organizados em mapas de ligação (Ferreira & Grattapaglia, 2006).

As características de interesse econômico em plantas, geralmente são determinadas por vários genes distribuídos por todo o genoma, possuem forte interação com o ambiente e são chamadas de características quantitativas. Os locos gênicos associados com o seu controle são conhecidos como QTL (*Quantitative Trait Loci*) ou locos de característica quantitativa

(Tanksley *et al.*, 1989). Geralmente são identificados por estratégias de mapeamento genético utilizando marcadores moleculares que detectam diferença significativa entre fenótipos.

Uma estratégia eficiente para compreender a genética de resistência a doenças é o mapeamento das regiões do genoma responsáveis pelo seu controle, utilizando marcadores moleculares para seleção indireta de fenótipos (Ferreira, 2003). Os mapas genéticos permitem a localização de genes e regiões genômicas envolvidas no controle das características quantitativas (QTL), ou seja, o QTL é uma relação estatística entre regiões genômicas e os dados fenotípicos de indivíduos de um cruzamento.

Muitos QTLs têm sido identificados e podem ser enquadrados em dois grupos de genes, os de maior efeito no fenótipo, que explicam um alto percentual da variação fenotípica, e os que controlam características de menor efeito no fenótipo, e que representam a maioria dos QTLs identificados. Informações de mapa têm sido usadas para desenvolver sistemas de seleção indireta para fenótipos de grande dificuldade de análise (Ferreira, 2003), possibilitando a seleção assistida por marcadores fortemente ligados à característica de interesse. A eficiência da identificação e isolamento de genes de características quantitativas via mapeamento genético depende, entre outros fatores, da herdabilidade da característica, da disponibilidade de marcadores moleculares distribuídos ao longo do genoma, da análise de um grande número de indivíduos segregantes e de ensaios experimentais que possibilitem a correta mensuração do fenótipo (Risch, 2000).

Uma das principais aplicações dos mapas de ligação em videira é o mapeamento de QTLs que controlam a expressão de características quantitativas, visando o desenvolvimento de novas cultivares que incorporem os alelos de QTLs de importância agrônômica. O foco principal dos estudos de identificação de QTLs em videira são resistência a doenças como míldio causado por *P. viticola* e oídio por *Uncinula necator* (Fischer *et al.*, 2004; Akkurt *et al.*, 2007; Welter *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2008; Riaz *et al.*, 2011), além de aspectos de

qualidade da uva como apirenia (Cabezas *et al.*, 2006; Mejía *et al.*, 2007; Costantini *et al.*, 2008; Mejía *et al.*, 2011).

1.16. Mapeamento de QTL de resistência ao míldio

O mapeamento genético permite localizar regiões genômicas específicas que flanqueiam os locos de características quantitativas, possibilitando o uso de marcadores associados à característica para seleção assistida ou isolamento e estudo detalhado dos genes envolvidos no controle da característica.

Mapeamento genético de QTLs de grande efeito para resistência ao míldio foi desenvolvido para diferentes fontes de resistências: *Muscadinia rotundifolia*, nos grupos de ligação (GL) 12 e 18 (Merdinoglu *et al.*, 2003; Wiedemann-Merdinoglu *et al.*, 2006); espécies silvestres norte-americanas, no GL 18 (Welter *et al.*, 2007; Bellin *et al.*, 2009); *Vitis riparia*, GL 7, 9 e 12 (Marguerit *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2011) e *Vitis amurensis*, GL 9 e 14 (Blasi *et al.*, 2011; Schwander *et al.*, 2011; Venuti *et al.*, 2013). Marcadores associados com alguma resistência ao míldio tem sido identificados para facilitar a introgressão adicional de genes de resistência pelos programas de melhoramento.

Os objetivos deste estudo foram:

- a) Sequenciar o genoma de isolado de *Plasmopara viticola* através de metodologia NGS (*Next Generation Sequencing*);
- b) Desenvolver e validar novos marcadores microsatélites específicos para a análise genética de *Plasmopara viticola*;

- c) Coletar e estudar a diversidade genética e estrutura de populações de *Plasmopara viticola* nas principais regiões produtoras de uva do Brasil;
- d) Construir mapas genéticos de videira baseados em marcadores microssatélites na população F1 do cruzamento CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88;
- e) Mapear QTLs (Locos de Características Quantitativas) de resistência ao míldio (*Plasmopara viticola*) na população F1 CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88;

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELKRIM, J.; ROBERTSON, B.; STANTON, J.A. & GEMMELL, N. 2009. Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *Biotechniques* 46(3):185-192.
- ADAM-BLONDON, A.F.; ROUX, C.; CLAUX, D.; BUTTERLIN, G.; MERDINOGLU, D. & THIS, P. 2004. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. *Theoretical Applied Genetics* 109:1017-1027.
- ADHIKARI, B.N.; HAMILTON, J.P.; ZERILLO, M.M; TISSERAT, N.; LÉVESQUE, C.A. & BUELL, C.R. 2013. Comparative genomics reveals insight into virulence strategies of plant pathogenic oomycetes. *Plos one* 8:1-15.
- AGRIOS, G.N. 2005. *Plant Pathology*. 5th ed. Elsevier Academic Press. San Diego.
- AKKURT, M.; WELTER, L.; MAUL, E.; TÖPFER, R. & EVA ZYPRIAN. 2007. Development of SCAR markers linked to powdery mildew (*Uncinula necator*) resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L. and *Vitis* sp.). *Mol Breeding*. 19:103-111.
- AKKURT, M.; ÇAKIR, A.; SHIDFAR, M.; ÇELIKKOL, B.P. & G. SÖYLEMEZOĞLU, G. 2012. Using SCC8, SCF27 and VMC7f2 markers in grapevine breeding for seedlessness via marker assisted selection. *Genetics and Molecular Research* 11 (3): 2288-2294.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- ALLÈGRE, M.; DAIRE, X.; HELOIR, M.C.; TROUVELOT, S.; MERCIER, L.; ADRIAN, M. & PUGIN, A. 2007. Stomatal deregulation in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *New Phytol* 173:832-840.
- ALLEWELDT, G. & POSSINGHAM, J.V. 1988. Progress in grapevine breeding. *Theor Appl Genet* 75:669-673.
- ALONSO-VILLAVARDE, V.; VOINESCO, F.; VIRET, O.; SPRING, J.L. & GINDRO, K. 2011. The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 265-274.
- ARAÚJO, J.L.P.; RAMALHO, P.J.P.; CORREIA, R.C. 2009. Mercados de Uvas de Mesa e de Vinho. *In*: SOARES, J.M. & LEÃO, P.C.S. (Eds.) *A Vitivinicultura no Semiárido Brasileiro*. Brasília DF. Embrapa Informação Tecnológica. p. 739-756.
- BARBAZUK, W.B.; EMRICH, S.J.; CHEN, H.D.; LI, L. & SCHNABLE, P.S. 2007. SNP discovery via 454 transcriptome sequencing. *The Plant Journal* 51:910-918.

- BAXTER, L.; TRIPATHY, S.; ISHAQUE, N.; BOOT, N.; CABRAL, A., et al. 2010. Signatures of adaptation to obligate biotrophy in the *Hyaloperonospora arabidopsidis* genome. *Science* 330:1549-1551.
- BEDENDO, I.P. 2011. Míldios. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. & BERGAMIN FILHO (Eds.). *Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos*. 4ª Ed. Agronômica Ceres. Piracicaba. p.467-471.
- BELLIN, D.; PERESSOTTI, E.; MERDINOGLU, D.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; ADAM-BLONDON, A.F.; CIPRIANI, G.; MORGANTE, M.; TESTOLIN, R. & DI GASPERO, G. 2009. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localized necrosis at the infection site. *Theoretical Applied Genetics* 120:163-176.
- BENT, A.F. 1996. Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell* 8:1757-1771.
- BIRCH, P.; BOEVINK, P.; GILROY, E.; HEIN, I.; PRITCHARD, L. & WHISSON, S. 2008. Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 373-379.
- BISSON, L.; WATERHOUSE, A.; EBELER, S.; WALKER, M. & LAPSLEY, J. 2002. The present and future of the international wine industry. *Nature* 418:696-699.
- BLASI, P.; BLANC, S.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; PRADO, E.; RÜHL, E.H.; MESTRE, P. & MERDINOGLU, D. 2011. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of Rpv8, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *Theoretical Applied Genetics* DOI 10.1007/s00122-011-1565-0.
- BOCCACCI, P.; MARINONI, D.T.; GAMBINO, G.; BOTTA, R. & SCHNEIDER, A. 2005. Genetic characterization of endangered grape cultivars of reggio Emilia province. *American Journal of Enology and Viticulture* 56:411-416.
- BOSO, S. & KASSEMAYER, H.H. 2008. Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew. *Vitis* 47:39-49.
- BROCKMAN, W.; ALVAREZ, P.; YOUNG, S.; GARBER, M.; GIANNOUKOS, G.; LEE, W.L.; RUSS, C.; LANDER, E.S.; NUSBAUM, C. & DAVID B. JAFFE, D.B. 2008. Quality scores and SNP detection in sequencing-by-synthesis systems. *Genome Research* 18:763-770.
- CABEZAS, J.A.; CERVERA, M.T.; RUIZ-GARCIA, L.; CARRENO, J. & MARTINEZ-ZAPATER, J.M. 2006. A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine. *Genome*, 49:1572-1585.
- CADLE-DAVIDSON, L. 2008. Variation within and between *Vitis* spp. for foliar resistance to the downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. *Plant Disease* 92:1577-1584.

- CAMARGO, U.A.; BERND, R.B. & REVERS, L.F. 2009. Melhoramento Genético *In*: SOARES, J.M. & LEÃO, P.C.S. (Eds.) A Vitivinicultura no Semiárido Brasileiro. Brasília DF. Embrapa Informação Tecnológica. p. 111-147.
- CAMARGO, L.E.A. 2011. Genética da interação patógeno-hospedeiro. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. & BERGAMIN FILHO (Eds.). Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. 4ª Ed. Agronômica Ceres. Piracicaba. p.119-132.
- CAPRA, J.A.; CARBONE, L.; RIESENFELD, S.J. & WALL, J.D. 2010. Genomics through the lens of next-generation sequencing. *Genome Biol* 11: 306.
- CARMONA, M.J.; CALONJE, M. & MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. 2007. The FT/TFL1 gene family in grapevine. *Plant Mol Biol* 63:637-650.
- CASTOE, T.A.; POOLE, A.W.; KONING, A.P.J.; JONES, K.L.; TOMBACK, D.F.; OYLER-MCCANCE, S.J.; FIKE, J.A.; LANCE, S.L.; STREICHER, J.W.; SMITH, E.N. & POLLOCK, D.D. 2012. Rapid microsatellite identification from illumina paired-end genomic sequencing in two birds and a snake. *Plos one* 7(2):e30953.
- CHANG, X.; HEENE, E.; QIAO, F. & NICK, P. 2011. The phytoalexin resveratrol regulates the initiation of hypersensitive cell death in *Vitis* cell. *Plos one*, 6(10):e26405.
- CHEN, W.J.; DELMOTTE, F.; RICHARD-CERVERA, S.; DOUENCE, L.; GREIF, C. & CORIO-COSTET, M.F. 2007. At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Applied and Environmental Microbiology* 73:5162-5172.
- CHONG, J.; LE HENANFF, G.; BERTSCH, C. & WALTER, B. 2008. Identification, expression analysis and characterization of defense and signaling genes in *Vitis vinifera*. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:469-481.
- CHOUDHURY, M.M.; ARAÚJO, J.L.P.; MELO, M.V.D. & COSTA, T.S. 2007. Agronegócio de Uvas de Mesa. *In*: LIMA, M.A.C. (Ed.) Uva de Mesa Pós-colheita. Brasília DF. Embrapa Informação Tecnológica. 2ª ed. pp. 9-20.
- CORIO-COSTET, M.F.; DUFOUR, M.C.; CIGNA, J.; ABADIE, P. & CHEN, W.J. 2011. Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. *Eur J Plant Pathol* 129:315-329.
- COSTANTINI, L.; GRANDO, M.S.; FEINGOLD, S.; ULANOVSKY, S.; MEJÍA, N.; HINRICHSEN, P.; DOLIGEZ, A.; THIS, P.; CABEZAS, J.A. & MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. 2007. Generation of a common set of mapping markers to assist table grape breeding. *American Journal of Enology and Viticulture* 58:102-111.
- COSTANTINI, L.; BATTILANA, J.; LAMAJ, F.; FANIZZA, G. & GRANDO, M.S. 2008. Berry and phenology-related traits in grapevine (*Vitis vinifera* L.): From quantitative trait loci to underlying genes. *BMC Plant Biology* 8:1-17.
- CSÉFALVAY, L.; DI GASPERO, G.; MATOUŠ, K.; BELLIN, D.; RUPERTI, B. & OLEJNÍČKOVÁ, J. 2009. Pre-symptomatic detection of *Plasmopara viticola* infection

- in grapevine leaves using chlorophyll fluorescence imaging. *Eur J Plant Pathol* 125:291-302.
- DAI, G.H.; ANDARY, C.; MONDOLOT-COSSON, L. & BOUBALS, D. 1995. Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46:177-188.
- DALBÓ, M.A.; YE, G.N.; WEEDEN, N.F.; STEINKELLNER, H.; SEFC, K. & REISCH, B.I. 2000. A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. *Genome* 43: 333-340.
- DELMOTTE, F.; CHEN, W.J.; RICHARD-CERVERA, S.; GREIF, C.; PAPURA, D.; GIRESE, X.; MONDOR-GENSON, G. & CORIO-COSTET, M.F. 2006. Microsatellite DNA markers for *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew of grapes. *Molecular Ecology Notes* 6:379-381.
- DEREEPER, A.; NICOLAS, S.; CUNFF, L.L.; BACILIERI, R.; DOLIGEZ, A.; PEROS, J.P.; RUIZ, M. & THIS, P. 2011. SNiPlay: a web-based tool for detection, management and analysis of SNPs. Application to grapevine diversity projects. *BMC Bioinformatics* 12:134.
- DI GASPERO, G. & CIPRIANI, G. 2003. Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, Pto-like and receptor-like kinases related to disease resistance in grapevine. *Mol Gen Genomics* 269: 612-623.
- DI GASPERO, G.; CIPRIANI, G.; ADAM-BLONDON, A.F. & TESTOLIN, R. 2007. Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for R-gene candidates. *Theoretical and Applied Genetics* 114:1249-1263.
- DÍEZ-NAVAJAS, A.M.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; GREIF, C. & MERDINOGLU, D. 2008. Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the tissue level. *Phytopathology* 98:776-780.
- DOLIGEZ, A.; BOUQUET, A.; DANGLLOT, Y.; LAHOGUE, F.; RIAZ, S.; MEREDITH, C.P.; EDWARDS, K.J. & THIS, P. 2002. Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theoretical Applied Genetics* 105:780-795.
- DOLIGEZ, A.; ADAM-BLONDON, A.F.; CIPRIANI, G.; DI GASPERO, G.; LAUCOU, V.; MERDINOGLU, D.; MEREDITH, C.P.; RIAZ, S.; ROUX, C. & THIS, P. 2006. An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. *Theoretical Applied Genetics* 113:369-382.
- EIBACH, R.; DIEHL, H. & ALLEWELDT, G. 1989. Untersuchungen zur verebung von rezistenzigenschaften bei reben gegen *oidium tuckeri*, *Plasmopara viticola*, und *Botrytis cinerea*. *Vitis* 28:209-228.

- EIBACH, R.; ZYPRIAN, E.; WELTER, L. & TÖPFER, R. 2007. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis* 46:120-124.
- EIBACH, R.; TÖPFER, R. & HAUSMANN, L. 2010. Use of genetic diversity for grapevine resistance breeding. *Mitteilungen Klosterneuburg* 60:332-337.
- ELSHIRE, R.J.; GLAUBITZ, J.C.; SUN, Q.; POLAND J.A.; KAWAMOTO, K.; BUCKLER, E.S.; MITCHELL, S.E. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *Plos one*:6(5):e19379.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/produtos/germoplasma/>. Consultado em 08/10/2013a.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br/germoplasma/>. Consultado em 08/10/2013b.
- EXCOFFIER, L.; FOLL, M. & PETIT, R.J. 2009. Genetic consequences of range expansions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40:481-501.
- FANIZZA, G.; LAMAJ, F.; COSTANTINI, L.; CHAABANE, R. & GRANDO, M.S. 2005. QTL analysis for fruit yield components in table grapes (*Vitis vinifera*). *Theoretical Applied Genetics* 111:658-664.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília DF. Embrapa-SPI.
- FERREIRA, M.E. 2003. Melhoramento genético de arroz: impactos da genômica. *In*: Borém A, Giudice M, Sedyama T (Eds.) Melhoramento Genômico. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. p. 73-129.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 2006. Genética de associação em plantas. *In*: BORÉM, A. & CAIXETA, E.T. (Eds.). Marcadores moleculares. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. p. 273-306.
- FIGUEIREDO, A.; FORTES, A.; FERREIRA, S.; SEBASTIANA, M.; CHOI, Y.; SOUSA, L.; ACIOLI-SANTOS, B.; PESSOA, F.; VERPOORTE, R. & PAIS, M. 2008. Transcriptional and metabolic profiling of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves unravel possible innate resistance against pathogenic fungi. *J Exp Bot* 59:3371-3381.
- FIGUEIREDO, A.; MONTEIRO, F.; FORTES, A.M.; BONOW-REX, M.; ZYPRIAN, E.; SOUSA, L.; PAIS, M.S. 2012. Cultivar-specific kinetics of gene induction during downy mildew early infection in grapevine. *Funct Integr Genomics* 12:379-386.
- FISCHER, B.M.; SALAKHUTDINOV, I.; AKKURT, M.; EIBACH, R.; EDWARDS, K.J.; TÖPFER, R. & ZYPRIAN, E.M. 2004. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Trends in Biotechnology* 108:501-515.

- FLOR, H.H. 1947. Inheritance of reaction to rust in flax. *Journal of Agricultural Research* 74:241-262.
- FONTAINE, M.C.; AUSTERLITZ, F.; GIRAUD, T.; LABBÉ, F.; PAPURA, D.; RICHARD-CERVERA, S. & DELMOTTE, F. 2013. Genetic signature of a range expansion and leap-frog event after the recent invasion of Europe by the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. *Molecular Ecology* 22:2771-2786.
- GALET, P. 1977. Les maladies et les parasites de la vigne, vol I. Imp. Paysan du Midi, Montpellier.
- GALET, P. 1998. Grape varieties and rootstocks varieties. Paris: Oenoplurimédia. 315 p.
- GALET, P. 2000. Dictionnaire encyclopédique des cépages. Paris: Hachette.
- GAY-BELLILE, F.; LACOUTURE, J.; SARRAZIN, J.F.; COURLIT, Y. & MENARD, E. 1983. Le point sur le mildiou de la vigne. les fongicides systémiques. les souches résistantes. *Progres Agricole et Viticole* 100:83-89.
- GARG, R.; PATEL, R.K.; TYAGI, A.K. & JAIN, M. 2011. De novo assembly of chickpea transcriptome using short reads for gene discovery and marker identification. *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 18(1):53-63.
- GINDRO, K.; PEZET, R. & VIRET, O. 2003. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiology and Biochemistry* 41:846-853.
- GINDRO, K.; SPRING, J.L. & PEZET, R. 2006. Histological and biochemical criteria for objective and early selection of grape-vine cultivars resistant to *Plasmopara viticola*. *Vitis* 45:191-196.
- GIRAUD, T.; GLADIEUX, P. & GAVRILETS, S. 2010. Linking the emergence of fungal plant diseases with ecological speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 25:387-395.
- GOBBIN, D.; PERTOT, I. & GESSLER, C. 2003a. Identification of microsatellite markers for *Plasmopara viticola* and establishment of high throughput method for SSR analysis. *European Journal of Plant Pathology* 109:153-164.
- GOBBIN D.; PERTOT I. & GESSLER C. 2003b. Genetic structure of a *Plasmopara viticola* population in an isolated Italian mountain vineyard. *Journal of Phytopathology*, 151:636-646.
- GOBBIN, D.; JERMINI, M.; LOSKILL, B.; PERTOT, I.; RAYNAL, M. & GESSLER, C. 2005. Importance of secondary inoculum of *Plasmopara viticola* to epidemics of grapevine downy mildew. *Plant Pathology* 54:522-534.

- GOBBIN, D.; RUMBOU, A.; LINDE, C.C. & GESSLER, C. 2006. Population genetic structure of *Plasmopara viticola* after 125 years of colonization in European vineyards. *Molecular Plant Pathology* 7:519-531.
- GOBBIN, D.; BLEYER, G.; KEIL, S.; KASSEMAYER, H.H. & GESSLER, C. 2007. Evidence for sporangial dispersal leading to a single infection event and a sudden high incidence of grapevine downy mildew. *Plant Pathology*, 56, 843-847.
- GRANDO, M.S.; BELLIN, D.; EDWARDS, K.J.; POZZI, C.; STEFANINI, M. & VELASCO, R. 2003. Molecular linkage maps of *Vitis vinifera* L. and *V. riparia* Mchx. *Theoretical Applied Genetics* 106:1213-1224.
- GRATTAPAGLIA, D. & SEDEROFF, R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: Mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137:1121-1137.
- GRATTAPAGLIA, D.; SILVA-JUNIOR, O.B.; KIRST, M.; LIMA, B.M.; FARIA, D.A. & PAPPAS JR, G.J. 2011. High-throughput SNP genotyping in the highly heterozygous genome of *Eucalyptus*: assay success, polymorphism and transferability across species. *BMC plant biology* 11:65.
- GRÜNZEL, H. 1960. Studien zur biologischen Differenzierung des Falschen Mehltaus der Weinreben (*Peronospora viticola* de Bary). *Phytopathologische Zeitschrift* 39:149-194.
- GUERRA, C.C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M.C. & CAMARGO, U.A. 2009. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos. Bento Gonçalves RS. Embrapa Uva e Vinho. Documentos nº 48.
- HAMMOND-KOSACK, K.E. & JONES, J.D.G. 1997. Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:575-607.
- HILL G.K., 1998. Studies on the germination of *Plasmopara viticola* oospores with a floating disc test. *Bulletin OILB/SROP* 21(2):1-2.
- HOU, H.; LI, J.; GAO, M.; SINGER, S.D.; WANG, H.; MAO, L.; FEI, Z. & WANG, X. 2013. Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family genes in grape. *Plos one* 8:1-15.
- INGLEZ DE SOUZA, J. S. Uvas para o Brasil. Piracicaba: FEALQ, 1996. 791p.
- JAILLON, O.; AURY, J.M.; NOEL, B.; POLICRITI, A.; CLEPET, C.; CASAGRANDE, A.; CHOISNE, N.; AUBOURG, S.; VITULO, N.; JUBIN, C.; VEZZI, A.; LEGEAI, F.; HUGUENEY, P.; DASILVA, C.; HORNER, D.; MICA, E.; JUBLOT, D.; POULAIN, J.; BRUYÈRE, C.; BILLAULT, A.; SEGURENS, B.; GOUYVENOUX, M.; UGARTE, E.; CATTONARO, F.; ANTHOUARD, V.; VICO, V.; FABBRO, C.D.; ALAUX, M.; DI GASPERO, G.; DUMAS, V.; FELICE, N.; PAILLARD, S.; JUMAN, I.; MOROLDO, M.; SCALABRIN, S.; CANAGUIER, A.; CLAINCHE, I.L.; MALACRIDA, G.; DURAND, E.; PESOLE, G.; LAUCOU, V.; CHATELET, P.;

- MERDINOGLU, D.; DELLEDONNE, M.; PEZZOTTI, M.; LECHARNY, A.; SCARPELLI, C.; ARTIGUENAVE, F.; PÈ, M.E.; VALLE, G.; MORGANTE, M.; CABOCHE, M.; ADAM-BLONDON, A.F.; WEISSENBACH, J.; QUÉTIER, F. & WINCKER, P. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449:463-468.
- JEAN-DENIS, J.B.; PEZET, R. & TABACCHI, R. 2006. Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew-infected grapevine leaves by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 1112:263-268.
- JUDELSON, H.S. 2012. Dynamics and innovations within oomycete genomes: insights into biology, pathology, and evolution. *Eukaryotic Cell* 11:1304-1312.
- JÜRGES, G.; KASSEMAYER, H.H.; DURRENBERGER, M.; DUGGELIN, M. & NICK, P. 2009. The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. *Plant Biology* 11:886-898.
- KARAAGAC, E.; VARGAS, A.M.; ANDRÉS, M.T.; CARREÑO, I.; IBÁÑEZ, J.; CARREÑO, J.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. & CABEZAS, J.A. 2012. Marker assisted selection for seedlessness in table grape breeding. *Tree Genetics & Genomes* 8:1003-1015.
- KAST, W.K. 2001. Inter-isolate variation of virulence of *Plasmopara viticola* on resistant vine varieties. *Integrated Control in Viticulture IOBC WPRS Bulletin* 24(7):45-49.
- KIEFER, B.; RIEMANN, M. & BUCHE, C. 2002. The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Planta* 215:387-393.
- KENNELLY, M.M.; GADOURY, D.M.; WILCOX, W.F.; MAGAREY, P.A. & SEEM, R.C. 2007. Primary infection, lesion productivity, and survival of sporangia in the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. *Phytopathology* 97:512-522.
- KOOPMAN, T.; LINDE, C.C.; FOURIE, P.H. & MCLEOD, A. 2007. Population genetic structure of *Plasmopara viticola* in the Western Cape Province of South Africa. *Molecular Plant Pathology* 8:723-736.
- KORTEKAMP, A. & ZYPRIAN, E. 2003. Characterization of *Plasmopara*-resistance in grapevine using in vitro plants. *Journal of Plant Physiology* 160:1393-1400.
- KORTEKAMP, A.; WIND, R.; ZYPRIAN, E. 1998. Investigation of the interaction of *Plasmopara viticola* with susceptible and resistant grapevine cultivars. *J Plant Dis Protec* 105:475-488.
- KORTEKAMP, A. 2005. Growth, occurrence and development of septa in *Plasmopara viticola* and other members of the Peronosporaceae using light- and epifluorescence-microscopy. *Mycol. Res.* 109(5):640-648.

- KORTEKAMP, A. 2006. Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 5867.
- KORTEKAMP, A.; WELTER, L.; VOGT, S.; KNOLL, A.; SCHWANDER, F.; TÖPFER, R. & ZYPRIAN, E. 2008. Identification, isolation and characterization of a CC-NBS-LRR candidate disease resistance gene family in grapevine. *Mol Breeding* 22:421-432.
- LAFON, R. & CLERJEAU, M. 1994. Downy mildew. In: *Compendium of Grape Diseases* (Pearson, R.C. and Goheen, A.C., eds), pp. 11–13. St. Paul, MN: APS Press.
- LEÃO, P.C.S.; SOARES, J.M. & RODRIGUES, B.L. 2009. Principais cultivares. In: SOARES, J.M. & LEÃO, P.C.S. (Eds.). *A vitivinicultura no semiárido brasileiro*. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília DF. p. 541-596.
- LEVESQUE, C.A.; BROUWER, H.; CANO, L.; HAMILTON, J.P.; HOLT, C.; et al., 2010. Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome Biology* 11:R73 doi:10.1186/gb-2010-11-7-r73.
- LIMA, M.F.; LOPES, D.B.; TAVARES, S.C.C.H.; TESSMANN, D.J. & MELO, N.F. 2009. Doenças e alternativas de controle. In: SOARES, J.M. & LEÃO, P.C.S. (Eds.). *A vitivinicultura no semiárido brasileiro*. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília DF. p. 541-596.
- LODHI, M.A.; YE, G.N.; WEEDEN, N.F. & REISCH, B.I. 1995. A molecular marker-based linkage map of *Vitis*. *Genome* 38:786-794.
- LOPES, P.R.C.; OLIVEIRA, J.E.M.; ASSIS, J.S.; OLIVEIRA, I.V.M. & SILVA, R.R.S. 2009. Produção integrada de uva para vinho. In: *Produção integrada no Brasil: agropecuária sustentável alimentos seguros*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS, p. 935-954.
- MAHANIL, S.; REISCH, B.I.; OWENS, C.L.; THIPYAPONG, P. & LAOSUWAN, P. 2007. Resistance gene analogs from *Vitis cinerea*, *Vitis rupestris*, and *Vitis* hybrid Horizon. *Am. J. Enol. Viticult.* 58:484-493.
- MALACARNE, G.; VRHOVSEK, U.; ZULINI, L.; CESTARO, A.; STEFANINI, M.; MATTIVI, F.; DELLEDONNE, M.; VELASCO, R. & MOSER, C. 2011. Resistance to *Plasmopara viticola* in a grapevine segregating population is associated with stilbenoid accumulation and with specific host transcriptional responses. *BMC Plant Biology* 11:114.
- MARDIS, E.R. 2008. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9:387-402.
- MARGUERIT, E.; BOURY, C.; MANICKI, A.; DONNART, M.; BUTTERLIN, G.; NÉMORIN, A.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; MERDINOGLU, D.; OLLAT, N.

- & DECROOQ, S. 2009. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* 118:1261-1278.
- MARTENS, C. & VAN DE PEER, Y. 2010. The hidden duplication past of the plant pathogen *Phytophthora* and its consequences for infection. *BMC Genomics* 11:353.
- MARTIN, J.P.; SANTIAGO, J.L.; PINTO-CARNIDE, O.; LEAL, F.; MARTINEZ, M.; DEL, C. & ORTIZ, J.M. 2006. Determination of relationships among autochthonous grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) in the Northwest of the Iberian Peninsula by using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:1255-1261.
- MASSOLA JR., N.S. & KRUGNER, T.L. 2011. Fungos Fitopatogênicos. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. & BERGAMIN FILHO (Eds.). Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos. 4ª Ed. Agronômica Ceres. Piracicaba. p.149-206.
- MATASCI, C.L.; JERMINI, M.; GOBBIN, D. & GESSLER, C. 2010. Microsatellite based population structure of *Plasmopara viticola* at single vine scale. *European Journal of Plant Pathology* 127:501-508.
- MCDONALD, B.A. & LINDE, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:349-379.
- MEJÍA, N.; GEBAUER, M.; MUÑOZ, L.; HEWSTONE, N.; MUÑOZ, C. & HINRICHSEN, P. 2007. Identification of QTLs for seedlessness, berry size, and ripening date in a seedless × seedless progeny. *Am J Enol Vitic* 58:499-507.
- MEJÍA, N.; SOTO, B.; GUERRERO, M.; CASANUEVA, X.; HOUEL, C.; MICCONO, M.L.A.; RAMOS, R.; CUNFF, L.L.; BOURSQUOT, J.M.; HINRICHSEN, P. & ANNE-FRANÇOISE ADAM-BLONDON, A.F. 2011. Molecular, genetic and transcriptional evidence for a role of VvAGL11 in stenospermocarpic seedlessness in grapevine. *BMC Plant Biology* 11:57.
- MELLO, L.M.R. 2012a. Vitivinicultura brasileira: Panorama 2011. Bento Gonçalves RS. Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico 115.
- MELLO, L.M.R. 2012b. Vitivinicultura mundial: principais países e posição do Brasil. Bento Gonçalves RS. Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico 121.
- MELLO, L.M.R. 2013a. Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2012. Bento Gonçalves RS. Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico 137.
- MELLO, L.M.R. 2013b. Atuação do Brasil no mercado vitivinícola mundial: Panorama 2012. Bento Gonçalves RS. Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico 138.
- MERDINOGLU, D.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; COSTE, P.; DUMAS, V.; HAETTY, A; BUTTERLIN, G. & GREIF, C. 2003. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. *Acta Horticulturae* 603:451-456.

- MESTRE, P.; PIRON, M.C. & MERDINOGLU, D. 2012. Identification of effector genes from the phytopathogenic oomycete *Plasmopara viticola* through the analysis of gene expression in germinated zoospores. *Fungal Biology* 116:825-835.
- METZKER, M.L. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11:31-46.
- MICHELMORE, R.W. 2003. The impact zone: genomics and breeding for durable disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 6:397-404.
- MOREIRA, F.M.; MADINI, A.; MARINO, R.; ZULINI, L.; STEFANINI, M.; VELASCO, R.; KOZMA, P. & GRANDO, M.S. 2011. Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (*Vitis* spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. *Tree Genetics & Genomes* 7:153-167.
- MOROLDO, M.; PAILLARD, S.; MARCONI, R.; FABRICE, L.; CANAGUIER, A.; CRUAUD, C.; DE BERARDINIS, V.; GUICHARD, C.; BRUNAUD, V.; LE CLAINCHE, I.; SCALABRIN, S.; TESTOLIN, R.; DI GASPERO, G.; MORGANTE, M. & ADAM-BLONDON, A.F. 2008. A physical map of the heterozygous grapevine 'Cabernet sauvignon' allows mapping candidate genes for disease resistance. *BMC Plant Biology* 8:66.
- O'BRYHIM, J.; CHONG, J.P.; LANCE, S.L.; JONES, K.L.; ROE, K.J. 2012. Development and characterization of sixteen microsatellite markers for the federally endangered species: *Leptodea leptodon* (Bivalvia: Unionidae) using paired-end Illumina shotgun sequencing. *Conservation Genetics Resources* 4(3):787-789.
- PEREIRA, G.E.; GUERRA, C.C. & MANFROI, L. 2009. Vitivinicultura e Enologia. *In*: SOARES, J.M. & LEÃO, P.C.S. (Eds.) *A Vitivinicultura no semiárido brasileiro*. Brasília DF. Embrapa Informação Tecnológica. p. 679-724.
- PERESSOTTI, E.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; DELMOTTE, F.; BELLIN, D.; DI GASPERO, D.; TESTOLIN, R.; MERDINOGLU, D. & MESTRE, P. 2010. Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *BMC Plant Biology* 10:147.
- PEZET, R.; GINDRO, K.; VIRET, O. & RICHTER, H. 2004. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* 43:145-148.
- POLAND, J.A.; BROWN, P.J.; SORRELLS, M.E. & JANNINK, J.L. 2012. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *Plos One*:7(2):e32253.
- POLESANI, M.; DESARIO, F.; FERRARINI, A.; ZAMBONI, A.; PEZZOTTI, M.; KORTEKAMP, A. & POLVERARI, A. 2008. cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *BMC Genomics* 9:142.

- POLESANI, M.; BORTESI, L.; FERRARINI, A.; ZAMBONI, A.; FASOLI, M.; ZADRA, C.; LOVATO, A.; PEZZOTTI, M.; DELLEDONNE, M. & POLVERARI, A. 2010. General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. *BMC Genomics* 11:1-16.
- REISCH, B.I. & PRATT, C. 1996. Grapes. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). *Fruit breeding: vine and small fruits*. New York: John Wiley 2:297-370.
- RIAZ, S.; DANGL, G.S.; EDWARDS, K.J. & MEREDITH, C.P. 2004. A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. *Theoretical Applied Genetics* 108:864-872.
- RIAZ, S.; TENSCHER, A.C.; RAMMING, D.W. & WALKER, M.A. 2011. Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding. *Theor Appl Genet* 122:1059-1073.
- RISCH, N.J. 2000. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*, 405 15:847-856.
- RITSCHEL, P.S.; CAMARGO, U.A.; MAIA, J.D.G. & REVERS, L.F. 2010. Towards the developing of well adapted grapes for tropical regions. *Acta Horticulturae* 872:421-426.
- ROUNSLEY, S.; MARRI, P.R.; YU, Y.; HE, R.; SISNEROS, N.; GOICOCHEA, J.L.; LEE, S.J.; ANGELOVA, A.; KUDRNA, D.; LUO, M.; AFFOURTIT, J.; DESANY, B.; KNIGHT, J.; NIAZI, F.; EGHOLM, M. & WING, R.A. 2009. De novo next generation sequencing of plant genomes. *Rice* 2:35-43.
- ROUXEL, M.; PAPURA, D.; NOGUEIRA, M.; MACHEFER, V.; DEZETTE, D.; RICHARD-CERVERA, S.; CARRERE, S.; MESTRE, P. & DELMOTTE, F. 2012. Microsatellite markers for characterization of native and introduced populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Applied and Environmental Microbiology* 78:6337-6340.
- ROUXEL, M.; MESTRE, P.; COMONT, G.; LEHMAN, B.L.; SCHILDER, A. & DELMOTTE, F. 2013. Phylogenetic and experimental evidence for host-specialized cryptic species in a biotrophic oomycete. *New Phytologist* 197:251-263.
- RUMBOU, A. & GESSLER, C. 2004. Genetic dissection of *Plasmopara viticola* population from a Greek vineyard in two consecutive years. *European Journal of Plant Pathology* 110:379-392.
- RUMBOU A. & GESSLER C. 2006. Particular structure of *Plasmopara viticola* populations evolved under Greek island conditions. *Phytopathology* 96:501-509.

- RUMBOU, A. & GESSLER, C. 2007. Greek epidemics of grapevine downy mildew are driven by local oosporic inoculum: a population biology approach. *Journal of Biological Research* 7:3-18.
- SCHERER, E. & GISI, U. 2006. Characterization of genotype and mating type in european isolates of *Plasmopara viticola*. *J. Phytopathology* 154:489-495.
- SCHMIDLIN, L.; POUTARAUD, A.; CLAUDEL, P.; MESTRE, P.; PRADO, E.; SANTOS-ROSA, M.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; KARST, F.; MERDINOGLU, D. & HUGUENEY, P. 2008. A stress-inducible resveratrol o-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine. *Plant Physiology* 148:1630-1639.
- SCHRÖDER, S.; TELLE, S.; NICK, P. & THINES, M. 2011. Cryptic diversity of *Plasmopara viticola* (Oomycota, Peronosporaceae) in North America. *Org Divers Evol* 11:3-7.
- SCHWANDER, F.; EIBACH, R.; FECHTER, I.; HAUSMANN, L.; ZYPRIAN, E. & TÖPFER, R. 2011. Rpv10: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theor Appl Genet* DOI 10.1007/s00122-011-1695-4.
- SEIDL, M.F.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.; GOVERS, F. & SNEL, B. 2011. A domain-centric analysis of oomycete plant pathogen genomes reveals unique protein organization. *Plant Physiol* 155:628-644.
- SEIDL, M.F.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.; GOVERS, F. & SNEL, B. 2012. Reconstruction of oomycete genome evolution identifies differences in evolutionary trajectories leading to present-day large gene families. *Genome Biol. Evol.* 4(3):199-211.
- SILVA, P.IT.; MARTINS, A.M.; GOUVEA, E.G.; MARCO PESSOA-FILHO, M. & FERREIRA, M.E. 2013. Development and validation of microsatellite markers for *Brachiaria ruziziensis* obtained by partial genome assembly of Illumina single-end reads. *BMC Genomics* 14:1-9.
- SOANES, D.M.; RICHARDS, T.A. & TALBOT, N.J. 2007. Insights from sequencing fungal and oomycete genomes: What can we learn about plant disease and the evolution of pathogenicity? *Plant Cell* 19: 3318-3326.
- STARK-URNAU, M.; SEIDEL, M.; KAST, W.K.; GEMMRICH, A.R. 2000. Studies on the genetic diversity of primary and secondary infections of *Plasmopara viticola* using RAPD/PCR. *Vitis* 39:163-166.
- STASKAWICS, B.J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B.J. & JONES, J.D.G. 1995. Molecular genetics of plant-disease resistance. *Science* 268:661-667.
- TANKSLEY, S.D.; YOUNG, N.D.; PATERSON, A.H. & BONIERBALE, M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Biotechnology* 7:257-264.

- THIS, P.; LACOMBE, T. & THOMAS, M.R. 2006. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics* 22:511-519.
- TROGGIO, M.; MALACARNE, G.; COPPOLA, G.; SEGALA, C.; CARTWRIGHT, D.A.; PINDO, M.; STEFANINI, M.; MANK, R.; MOROLDO, M.; MORGANTE, M.; GRANDO, M.S. & VELASCO, R. 2007. A dense single-nucleotide polymorphism-based genetic linkage map of grapevine (*Vitis vinifera* L.) anchoring Pinot Noir bacterial artificial chromosome contigs. *Genetics* 176:2637-2650.
- TROUVELOT, S.; VARNIER, A.L.; ALLÈGRE, M.; MERCIER, L.; BAILLIEUL, F.; ARNOULD, C.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; KLARZYNSKI, O.; JOUBERT, J.M.; PUGIN, A. & DAIRE, X. 2008. A β -1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including hr-like cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(2):232-243.
- TYLER, B.M.; TRIPATHY, S.; ZHANG, X.M.; DEHAL, P.; JIANG, R.H.Y., *et al.* (2006) *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* 313: 1261-1266.
- UNGER, S.; BUCHE, C; BOSO, S. & KASSEMAYER, H.H. 2007. The course of colonization of two different *Vitis* genotypes by *Plasmopara viticola* indicates compatible and incompatible host-pathogen interactions. *Phytopathology* 97:780-786.
- VANDERPLANK, J.E. 1968. *Disease Resistance in Plants*. New York, Academic Press.
- VELASCO, R.; ZHARKIKH, A.; TROGGIO, M.; CARTWRIGHT, D.A.; CESTARO, A.; PRUSS, D.; PINDO, M.; FITZGERALD, L.M.; VEZZULLI, S.; REID, J.; MALACARNE, G.; ILIEV, D.; COPPOLA, G.; WARDELL, B.; MICHELETTI, D.; MACALMA, T.; FACCI, M.; MITCHELL, J.T.; PERAZZOLLI, M.; ELDREDGE, G.; GATTO, P.; OYZERSKI, R.; MORETTO, M.; GUTIN, N.; STEFANINI, M.; CHEN, Y.; SEGALA, C.; DAVENPORT, C.; DEMATTE, L.; MRAZ, A.; BATTILANA, J.; STORMO, K.; COSTA, F.; TAO, Q.; SI-AMMOUR, A.; HARKINS, T.; LACKEY, A.; PERBOST, C.; TAILLON, B.; STELLA, A.; SOLOVYEV, V.; FAWCETT, J.A.; STERCK, L.; VANDEPOELE, K.; GRANDO, M.S.; TOPPO, S.; MOSER, C.; LANCHBURY, J.; BOGDEN, R.; SKOLNICK, M.; SGARAMELLA, V.; BHATNAGAR, S.K.; FONTANA, P.; GUTIN, A.; VAN DE PEER, Y.; SALAMINI, F. & VIOLA, R. 2007. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *Plos one*, 2(12):1326.
- VENUTI, S.; COPETTI, D.; FORIA, S.; FALGINELLA, L.; HOFFMANN, S.; BELLIN, D.; CINDRIC, P.; KOZMA, P.; SCALABRIN, S.; MORGANTE, M.; TESTOLIN, R. & DI GASPERO, G. 2013. Historical introgression of the downy mildew resistance gene Rpv12 from the asian species *Vitis amurensis* into grapevine varieties. *Plos one* 8 (4):e61228.
- VERCESI, A.; TOFFOLATTI, S.L.; ZOCCHI, G.; GUGLIELMANN, R. & IRONI, L. 2010. A new approach to modelling the dynamics of oospore germination in *Plasmopara viticola*. *European Journal of Plant Pathology* 128:113-126.

- VIGNANI, R.; SCALI, M.; MASI, E. & CRESTI, M. 2002. Genomic variability in *Vitis vinifera* L. "Sangiovese" assessed by microsatellite and non-radioactive AFLP test. EJB - Electronic Journal of Biotechnology 5 (1):1-11.
- WAN, Y.; HE, P. & WANG, Y. 2007. Inheritance of downy mildew resistance in two interspecific crosses between chinese wild grapes and european grapes. Vitis 46(3):156-157.
- WEI, W.; QI, X.; WANG, L.; ZHANG, Y.; HUA, W.; LI, D.; LV, H. & ZHANG, X. 2011. Characterization of the sesame (*Sesamum indicum* L.) global transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers. BMC Genomics 12:451.
- WELTER, L.J.; GÖKTÜRK-BAYDAR, N.; AKKURT, M.; MAUL, E.; EIBACH, R.; TÖPFER, R. & ZYPRIAN, E.M. 2007. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Molecular Breeding 20:359-374.
- WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; PRADO, E.; COSTE, P.; DUMAS, V.; BUTTERLIN, G. & MERDINOGLU, D. 2006. Genetic analysis of resistance to downy mildew derived from *Muscadinia rotundifolia*. Ninth international conference on grape genetics and breeding, Udine, Italy, July 2-6.
- WONG, F.P.; BURR, H.N. & WILCOX, W.F. 2001. Heterothallism in *Plasmopara viticola*. Plant Pathology 50:427-432.
- WU, J., ZHANG, Y.; ZHANG, H.; HUANG, H.; FOLTA, K.M. & LU, J. 2010. Whole genome wide expression profiles of *Vitis amurensis* grape responding to downy mildew by using Solexa sequencing technology. BMC Plant Biology 10:234.
- ZHANG, Y.; GAO, M.; SINGER, S.D.; FEI, Z.; WANG, H. & WANG, X. 2012a. Genome-wide identification and analysis of the TIFY gene family in grape. Plos one 7 (9):e44465.
- ZHANG, Y.; MAO, L.; WANG, H.; BROCKER, C.; YIN, X.; VASILIOU, V.; FEI, Z. & WANG, X. 2012b. Genome-wide identification and analysis of grape aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily. Plos one 7 (2):e32153.
- ZHU, H.; SENALIK, D.; MCCOWN, B.H.; ZELDIN, E.L.; SPEERS, J.; HYMAN, J.; BASSIL, N.; HUMMER, K.; SIMON, P.W. & ZALAPA, J.E. 2012. Mining and validation of pyrosequenced simple sequence repeats (SSRs) from American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.). Theor Appl Genet 124(1):87-96.

CAPÍTULO 1: Desenvolvimento e validação de marcadores microssatélites para análise da diversidade genética e estrutura de populações de *Plasmopara viticola* no Brasil

RESUMO

O mildio da videira, causado por *Plasmopara viticola*, é uma das principais doenças da cultura da uva no Brasil. Apesar da sua importância econômica, pouco se sabe sobre a variabilidade e a composição das populações do patógeno no país. O presente estudo teve por objetivo estudar a diversidade genética e a estrutura populacional de isolados de *Plasmopara viticola* que infectam vinhedos em diferentes regiões brasileiras. Para isto, novos marcadores microssatélites de *P. viticola* foram desenvolvidos através de sequenciamento NGS (*Next Generation Sequencing*) seguido de montagem parcial *de novo* do genoma do fungo. Um total de 146.822 locos microssatélites di-nucleotídeos com motivos perfeitos foram detectados em 93.134 *contigs*, representando 84.482.175 pb do genoma de *P. viticola*. Um conjunto de 34 sequências microssatélites de dinucleotídeos (motivos AT e AC) foi selecionado para o desenvolvimento de marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*) para estudos genéticos de *P. viticola*. Outros 10 marcadores microssatélites comumente utilizados na genotipagem de isolados de mildio foram usados como controle na avaliação da performance dos novos marcadores. Vinte e dois novos marcadores apresentaram grande robustez analítica, qualidade de análise e conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) variando de 0,15 a 0,71. Testes dos novos marcadores juntamente com os controles possibilitaram a seleção de uma bateria mista de 15 marcadores que foram usados para genotipar 92 isolados de *P. viticola* coletados em

regiões produtoras de uva no Brasil. A amostra de 92 isolados apresentou estruturação, tendo sido dividida em três subpopulações, denominadas PvG1 ($F_{st}=0,56$), PvG2 ($F_{st}=0,25$) e PvG3 ($F_{st}=0,24$). Foi observado um grande efeito no uso de pequenas baterias de marcadores moleculares na análise genética de populações do patógeno, afetando a interpretação dos resultados de subestruturação populacional. A diferenciação detectada por marcadores moleculares é maior em alguns locos do que em outros. A classificação geográfica dos isolados apresenta associação com a classificação subpopulacional do patógeno. Os isolados oriundos dos Estados de São Paulo e Minas Gerais apresentam maior diversidade de subpopulações do que isolados de outras regiões tradicionais no cultivo de uva no Brasil, como o Rio Grande do Sul. Há evidência de que a classificação de subpopulações do patógeno esteja também associada com a espécie de videira (*Vitis labrusca* e *V. vinifera*) de onde os isolados foram obtidos. O emprego de ferramentas moleculares como sequenciamento NGS e marcadores moleculares contribui para uma melhor compreensão das variáveis que afetam as populações de *P. viticola*. Este conhecimento tem implicações diretas no desenvolvimento de estratégias de melhoramento genético para resistência ao mildio.

Palavras-chave: diversidade genética, marcadores microssatélites, montagem *de novo* do genoma, sequenciamento NGS, subestruturação populacional

ABSTRACT

Downy mildew, caused by *Plasmopara viticola*, is one of the most important diseases of grape in Brazil. Despite its economic importance, little is known about the variability and genetic make up of pathogen populations in the country. This study had the objective to study the genetic diversity and the population structure of *Plasmopara viticola* isolates which are infecting grape fields in different regions of Brazil. New *P. viticola* microsatellite markers were developed by NGS (Next Generation Sequencing) followed by partial *de novo* assembly of the fungus genome. A total of 146,822 di-nucleotide microsatellite loci with perfect motifs was detected in 93,134 contigs, which covered 84.482.175 bp of the *P. viticola* genome. A group of 34 di-nucleotide microsatellite sequences (motifs AT and AC) was selected to develop SSR (*Simple Sequence Repeat*) markers to use in genetic studies of *P. viticola*. Another group of 10 microsatellite markers, widely applied in *P. viticola* genotyping was used as control during the evaluation of the new markers. Twenty-two new markers showed high analytical reliability, quality and PIC (Polymorphic Information Content), which varied from 0.15 to 0.71. A mixed battery of new and control microsatellites was used to genotype 92 *P. viticola* isolates, collected in grape producing regions of Brasil. A sample of 92 isolates showed a significant population structure, with isolates clustering into three subpopulations, called PvG1 ($F_{st}=0,56$), PvG2 ($F_{st}=0,25$) e PvG3 ($F_{st}=0,24$). The effect of small batteries of molecular markers used to evaluate the genetic structure of the pathogen populations was tested and found to affect the interpretation of the results. Genetic differentiation detected by molecular markers is higher in some loci than in others. The geographic classification of the isolates is associated with the genetic groups detected in the pathogen sample. Isolates collected in São Paulo and Minas Gerais show greater diversity of genetic groups

(subpopulations) than isolates from other traditional grape growing regions of Brazil, such as Rio Grande do Sul. There is also evidence that the classification of the pathogen isolates in groups is associated with the grape species (*V. labrusca* and *V. vinifera*) from which the isolates have been obtained. The use of molecular tools, such as NGS and molecular markers, contribute for a better understanding of variables affecting the populations of *P. viticola*. This knowledge is directly related to the development of breeding strategies for downy mildew resistance in grapevine.

Keywords: *de novo* genome assembly, genetic diversity, microsatellite markers, next generation sequencing, population structure

1.1 INTRODUÇÃO

A videira (*Vitis vinifera* L.) destaca-se entre as mais importantes espécies frutíferas cultivadas mundialmente, desempenhando um papel importante no setor agrícola de muitos países, incluindo o Brasil. Entre as diversas doenças que ameaçam a qualidade e a produtividade da cultura destaca-se o mídio, causado pelo oomiceto *Plasmopara viticola* (Berk & Curtis.) Berl. & de Toni (Cséfalvay *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2011; Schwander *et al.*, 2011). Trata-se de uma doença de difícil controle, especialmente quando a infecção ocorre durante a floração da planta, afetando a qualidade do fruto e comprometendo a produtividade, principalmente em cultivares da espécie *V. vinifera*. O mídio ocorre na maioria das regiões produtoras de uva do Brasil, com epidemias severas no período chuvoso.

Plasmopara viticola é um patógeno biotrófico obrigatório, diplóide e heterotático (Wong *et al.* 2001). O fungo apresenta duas formas de reprodução, sexuada e assexuada. Os oósporos do fungo podem iniciar infecções primárias após germinar e movimentar na superfície foliar úmida de cultivares suscetíveis de videira, penetrando os estômatos através do tubo germinativo e colonizando os espaços intercelulares do mesófilo (Kortekamp *et al.*, 1998; Kiefer *et al.*, 2002). Após o período de incubação observa-se a produção de esporangióforos e esporângios que esporulam em condições de alta umidade. Os oósporos são fontes de inóculo para infecções primárias em vinhedos e a sua dinâmica de germinação depende de fatores climáticos e endógenos (Vercesi *et al.*, 2010). O período de latência pode levar de 5 a 18 dias, dependendo da temperatura, umidade relativa do ar e da suscetibilidade da cultivar (Agrios, 2005), podendo ocorrer vários ciclos secundários em um mesmo ciclo de cultivo.

Plasmopara viticola foi primeiramente descrito em espécies silvestres de *Vitis* da América do Norte em 1834 (Agrios, 2005). No Brasil, o patógeno foi encontrado pela

primeira vez em 1891, no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) (Inglez de Sousa, 1996), após a introdução de videiras americanas no estado de São Paulo. A introdução e, potencialmente, reintroduções em outras épocas, podem influenciar a composição genética, a diversidade populacional e estrutura de populações do patógeno na região considerada.

O conhecimento da quantidade e distribuição da variação genética dentro e entre populações é um componente importante na compreensão da biologia populacional de uma espécie. É importante estudar a composição das populações do patógeno para compreender a dinâmica das populações e o seu efeito de longo prazo no aparecimento de epidemias da doença. Apesar da importância econômica do míldio, nenhum estudo sobre a diversidade e a estrutura genética populacional do patógeno foi até o momento realizado no Brasil. Pouco se sabe sobre a diversidade genética do patógeno, sobre a existência de estruturação nas populações que causam epidemias, ou sobre similaridades e diferenças genéticas entre isolados do fungo coletados em regiões produtoras do sul do Brasil em relação a outras importantes áreas de produção do Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste. Deve-se destacar que a cadeia produtiva da uva movimentava um mercado de 1.455.809 toneladas de uva no Brasil (Mello, 2013a), país que ocupa a 11ª posição entre os maiores produtores de uva do planeta (Mello, 2013b). O míldio representa uma ameaça constante à produtividade e ao crescimento deste importante setor da agricultura brasileira.

A estratégia atualmente em uso para o controle do míldio baseia-se no emprego de fungicidas em diferentes épocas de cultivo, visando obter frutos com boa qualidade. Contudo, o tratamento químico intenso não só acrescenta altos custos para a produção da uva, mas também causa problemas ambientais que são incompatíveis com as exigências modernas de uma agricultura sustentável. O emprego de resistência genética nos plantios de videira é altamente desejável para controlar a doença, diminuir o custo de produção e reduzir o impacto ambiental da produção agrícola. O desenvolvimento de variedades de videira resistentes ao

míldio necessita de informações sobre o fenótipo da interação entre isolados do patógeno e acessos que compõem o Banco de Germoplasma da cultura, o controle genético da resistência, assim como da diversidade genética e estruturação das populações do patógeno.

Estudos sobre a diversidade genética e estrutura de populações de *P. viticola* baseados em polimorfismo de DNA detectado com o uso de marcadores microssatélites foram realizados nos últimos anos em diferentes partes do mundo (Gobbin *et al.*, 2003a, 2003b, 2005, 2006; Rumbou & Gessler, 2004, 2006, 2007; Delmotte *et al.*, 2006; Scherer & Gisi, 2006; Koopman *et al.*, 2007; Matasci *et al.*, 2010; Rouxel *et al.*, 2012; Fontaine *et al.*, 2013). Tais estudos são baseados na análise de polimorfismo de painéis de marcadores SSR (*Single Sequence Repeats*) desenvolvidos por Gobbin *et al.* (2003a), Delmotte *et al.* (2006), Matasci *et al.* (2010) e Rouxel *et al.* (2012). Como a videira é uma espécie perene e o seu cultivo é clonal, os dados coletados pelos estudos de populações do patógeno causando epidemias nos vinhedos oferecem uma excelente oportunidade de melhor compreensão da dinâmica da interação entre populações do míldio e variedade(s) do hospedeiro ao longo dos anos. Numa espécie perene como a videira, a composição da população do patógeno pode ser analisada sem a interferência de rotação ou substituição varietal, o que é comum em espécies anuais.

Os resultados de estudos de diversidade e genética de populações de *P. viticola* infectando vinhedos em diferentes partes do mundo têm indicado que: (a) isolados de infecções primárias de *P. viticola*, coletados de um mesmo vinhedo, em geral apresentam maior diversidade genética do que os isolados de infecções secundárias, obtidos posteriormente no mesmo vinhedo (Stark-Urnau *et al.*, 2000; Gobbin *et al.*, 2003a); (b) isolados coletados de um mesmo vinhedo possuem baixa diversidade genética, geralmente com um ou poucos genótipos predominantes (Gobbin *et al.*, 2003b), especialmente se forem oriundos de infecções secundárias (Stark-Urnau *et al.*, 2000); (c) baixa variabilidade genética em populações coletadas de infecções secundárias em centenas de vinhedos da Europa e

Estados Unidos, 100 de vinhedos europeus e 50 de vinhedos americanos (Delmotte *et al.*, 2006); 48 de vinhedos europeus e 48 de vinhedos americanos (Rouxel *et al.*, 2012); (d) alta variabilidade genética entre os isolados coletados de infecções primárias de míldio em diferentes vinhedos europeus (Stark-Urnau *et al.*, 2000; Gobbin *et al.*, 2003a, 2003b).

Com relação ao efeito de subestruturação de populações do patógeno, os estudos de *P. viticola* indicam estruturação populacional por isolamento genético e possível efeito fundador, como observado em vinhedos estabelecidos em ilhas gregas (Rumbou & Gessler, 2006). Da mesma forma, um estudo recente com 1.146 amostras populacionais de *P. viticola*, coletadas de infecções secundárias em vinhedos distribuídos na Europa (Fontaine *et al.*, 2013), constatou baixa diversidade genética das populações, com estruturação em apenas dois grupos (subpopulações), geograficamente e geneticamente distintos, um correspondente a isolados de vinhedos da Europa Ocidental e outro de vinhedos do Leste da Europa.

Tais observações conduzem a perguntas importantes sobre o comportamento do fungo *P. viticola* nas condições de plantio de videira no Brasil. É premente verificar, por exemplo, se algumas das conclusões obtidas nos estudos citados acima, como baixa diversidade genética (Delmotte *et al.*, 2006; Fontaine *et al.*, 2013) e baixa estruturação populacional (Fontaine *et al.*, 2013), ou noutra vertente, alta diversidade genética e extensa estruturação populacional (Rumbou & Gessler, 2007) aplicam-se à distribuição da diversidade e potencial estruturação de populações de míldio no Brasil. É também importante compreender qual é o efeito do uso de uma bateria pequena de marcadores microssatélites (≤ 4 locos) em estudos populacionais, conforme vem sendo aplicado em diversos estudos de *P. viticola* (Gobbin *et al.*, 2003a, 2003b, 2005, 2006; Rumbou & Gessler, 2004, 2007; Delmotte *et al.*, 2006; Scherer & Gisi, 2006; Koopman *et al.*, 2007; Matasci *et al.*, 2010). Nas epidemias de míldio do Brasil, é importante verificar ainda se há correlação entre eventual subestruturação populacional e distribuição geográfica dos plantios de videira. Não há informação, até o

momento, sobre a variabilidade genética e sobre a estrutura das populações do patógeno nas principais regiões produtoras de uva do Brasil.

Desta forma, os objetivos do presente trabalho foram: a) desenvolver uma nova bateria de marcadores microssatélites através de sequenciamento NGS (*Next Generation Sequencing*) para análise de polimorfismo molecular em populações de *P. vitícola*; b) comparar o emprego dos novos marcadores microssatélites desenvolvidos no presente trabalho com alguns marcadores usados em análise populacional de *P. viticola* em outras partes do mundo, visando observar se há algum efeito do emprego desses últimos na análise de diversidade genética do fungo; c) estudar a diversidade genética e a estrutura populacional de isolados de *Plasmopara viticola* que infectam vinhedos em diferentes regiões do Brasil.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, as atividades de fenotipagem e genotipagem foram realizadas simultaneamente, objetivando agilizar os estudos de diversidade genética de isolados de *Plasmopara viticola* infectando videiras no Brasil. A Figura 1.1 mostra o fluxograma das principais atividades realizadas.

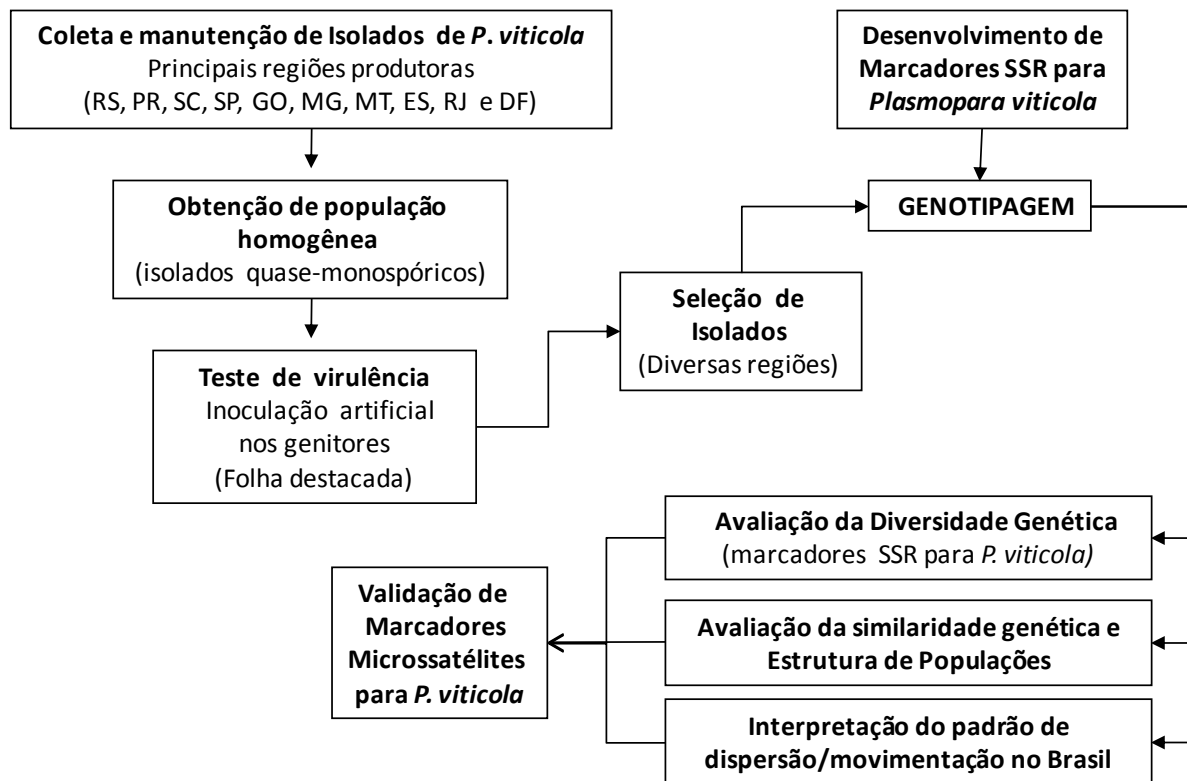


Figura 1.1. Fluxograma de atividades desenvolvidas com objetivo de estudar a diversidade genética e a estrutura populacional de isolados de *Plasmopara viticola* que infectam vinhedos em diferentes regiões do Brasil.

1.2.1 Extração de DNA genômico de *Plasmopara viticola* para sequenciamento NGS

(Next Generation Sequencing)

O isolado SP_JA1, obtido em vinhedo do município de Jales-SP, foi utilizado para extração do DNA usado no sequenciamento NGS. Para obter uma grande quantidade de DNA genômico deste isolado, foram necessárias várias lesões esporulativas de *P. viticola*. Para isto, esporângios de uma única lesão foram multiplicados em folhas da variedade *Cabernet Sauvignon* e congelados a -20°C.

Para a extração do DNA genômico, esporângios/esporangióforos foram retirados de uma lesão foliar para um cadinho de porcelana com o auxílio de um pincel macio molhado em água destilada e, em seguida, transferidos para microtubos para centrifugação e maceração em nitrogênio líquido (Gobbin *et al.*, 2003b). O pó resultante da maceração foi distribuído em tubo de 15 ml, ao qual foi acrescentado 4 ml de tampão CTAB 2X (2% acetyldimethyl tiethylammonium bromide - CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH=8,0, 1% polyvinylpyrrolidone, 0,2% 2-mercaptoethanol). A solução foi incubada em banho-maria por 40 minutos a 65°C, para a solubilização e homogeneização da suspensão, com agitação a cada 10 min. Cerca de 800 µl da suspensão foram então transferidos para microtubo de 2 ml na temperatura ambiente, ao qual adicionou-se 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). A amostra foi agitada para homogeneização e centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos. Cerca de 500 µl do sobrenadante foram, em seguida, transferidos para tubo de 1,5 ml, ao qual adicionou-se 350 µl de álcool isopropanol (4° C). A solução foi então incubada a -20°C por 6 horas para precipitação dos ácidos nucleicos. Após centrifugação a 8.000 rpm durante 10 minutos, foi obtido o precipitado (“pellet”), que foi lavado três vezes com 800 µL de etanol 70%. O DNA precipitado foi ressuspenso com 100 µl de Tris/EDTA (TE) pH 8,0, com Ribonuclease A (RNaseA) e incubado à temperatura de 37°C por 30

minutos para ação da enzima. A qualidade do DNA foi avaliada em eletroforese de gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio (0,15 g/mL). A quantificação do DNA genômico de *P. viticola* foi realizada em equipamento Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) e ajustada para 800 ng/μl.

1.2.2 Sequenciamento NGS e montagem do genoma de *Plasmopara viticola*

O ácido desoxiribonucléico foi preparado para sequenciamento através da construção de uma biblioteca genômica de fragmentos de DNA de *P. viticola*, desenvolvida de acordo com as instruções do fornecedor Illumina (www.illumina.com). Os fragmentos foram obtidos por nebulização do DNA e as extremidades 3' dos fragmentos foram ligadas com bases nitrogenadas de adenina. Adaptadores de fragmentos de DNA com uma única base T na extremidade 3' foram ligadas aos fragmentos com extremidades adenina. Os produtos de ligação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e os fragmentos de ~200 pb foram purificados do gel. Os fragmentos foram então amplificados pela técnica de geração de agrupamentos de DNA por pontes de PCR (“*bridge PCR cluster generation*”), que permite o sequenciamento paralelo em massa por síntese. O sequenciamento NGS utilizou um único canal da célula de fluxo do sequenciador Illumina GAI, no Centro de Genômica, Universidade Católica de Brasília - UCB.

As sequências de leitura (*reads*) resultantes do sequenciamento foram analisadas no Laboratório de Genética da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde as análises foram realizadas. As rotinas de montagem das sequências de leitura foram desenvolvidas com uso do *software* CLC Genomics Workbench (CLC Bio, Aarhus, Denmark). Primeiramente, os dados de sequenciamento do genoma de *P. viticola* foram separados de eventuais

contaminações com DNA de videira que eventualmente podem ter acontecido durante o processo de extração de DNA. Para isto, uma montagem dos dados brutos NGS foi iniciada tendo como modelo a sequência de referência de *Vitis vinifera* (Jaillon *et al.*, 2007), com vistas à remoção total das sequências de leitura do DNA de *Vitis* que foram sequenciadas juntamente com o DNA do mildio. Em seguida, as sequências de leitura de *P. viticola* foram usadas para a montagem *de novo* do genoma do fungo, utilizando a estringência padrão dos parâmetros Fração de Comprimento (*Length Fraction; LF= 0,50*) e Similaridade de Sequência (*Sequence Similarity; SIM= 0,80*), conforme recomendado pelo *software* CLC Genomics Workbench. O parâmetro comprimento mínimo do *contig* foi ajustado para 200 pb. Os *contigs* resultantes desta análise resultaram em um banco de dados de sequências de *P. viticola* com comprimento suficiente para análise genômica, com alta acurácia de montagem, variando de centenas a milhares de pares de bases. Este banco de dados representa uma montagem parcial (*de novo*) do genoma de *P. viticola*, passível de análise para a descoberta e desenvolvimento de marcadores moleculares.

1.2.3 Critérios para seleção dos locos microssatélites de *Plasmopara viticola*

O banco de *contigs* resultante da montagem *de novo* do genoma de *P. viticola* foi utilizado para a detecção de sequências microssatélites ao longo do genoma do fungo utilizando o *software* Phobos (Mayer, 2006). Foram pesquisados no genoma de mildio apenas locos microssatélites que atenderam aos seguintes quesitos: (a) sequência repetitiva de dinucleotídeo; (b) repetições em tandem perfeitas (inteiras; ausência de motivos complexos); (c) cobertura genômica mínima de 100x na região do microssatélite; (d) número mínimo de 9 repetições do motivo; (e) potencial de desenvolvimento de iniciadores de PCR (primers) em

janela inferior a 250 pb na região do microssatélite. Isto permitiu um levantamento preliminar dos tipos mais frequentes de motivos di, tri e tetranucleotídeos repetidos no genoma de *P. viticola* e o número de motivos de repetição para os locos detectados. Um novo banco de dados de microssatélites, com motivos de dinucleotídeos com repetição perfeita, foi então construído.

A identificação dos locos microssatélites pela estratégia descrita acima possibilitou a seleção de milhares de locos SSR no genoma de *P. viticola*. Uma bateria de 34 locos microssatélites foi selecionada, desenvolvida e analisada para validação e uso em rotina na análise genética de isolados de *P. viticola* pelo presente estudo. Para isto, foram desenhados pares de *primers* (iniciadores de PCR) flanqueando as sequências microssatélites selecionadas utilizando o software CLC Primer Designer. Os pares de *primers* foram então sintetizados e os iniciadores “*forward*” de cada loco microssatélite foram marcados com fluorocromos (NED, HEX e FAM) para avaliação de polimorfismo em sequenciador automático de DNA.

1.2.4 Coleta e extração de DNA de isolados de *Plasmopara viticola* de diferentes regiões do Brasil

Durante os anos de 2011, 2012 e 2013, folhas com sintomas de míldio foram coletadas em diversos vinhedos distribuídos em regiões produtoras de uva do Brasil. Ao todo, 92 isolados de *Plasmopara viticola* foram coletadas em 23 municípios de nove estados brasileiros (Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo) e no Distrito Federal, totalizando 41 vinhedos amostrados que apresentavam infecção com míldio (Tabela 1.1).

Os isolados foram coletados em diferentes variedades de uvas pertencentes, em sua maioria, a duas espécies de videira (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*), em ambientes caracterizados por condições climáticas diversas (Tabela 1.1). Um isolado de *Vitis bourquina* também foi coletado para análise. Aparentemente, todos os isolados foram obtidos de infecções secundárias, visto que os vinhedos foram estabelecidos há vários anos nas diferentes localidades. Após a coleta de folhas com lesões, as folhas foram congeladas a -20°C até o uso.

Para a extração de DNA foram utilizadas lesões foliares com “manchas de óleo” bem delimitadas, de aproximadamente 1,0 cm², contendo esporulação do patógeno. O DNA genômico total (planta/*Plasmopara*) foi extraído das folhas seguindo o protocolo descrito por Gobbin *et al.* (2003b), descrito no item 1.2.1. Após a extração, o precipitado foi ressuscitado em 70 µl de Tris/EDTA (TE) pH 8,0 com Ribonuclease A (RNaseA) e incubado à temperatura de 37°C por 30 minutos para ação da enzima. O DNA total (planta/*Plasmopara*) foi quantificado em Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) e ajustado para a concentração de 15 ng/µl.

Tabela 1.1. Identificação e origem de 92 isolados de *Plasmopara viticola* coletados em diferentes acessos de *Vitis* spp., em regiões produtoras de uva de diferentes Unidades da Federação.

nº	Código	Isolado	Acesso de Videira	Espécie	Propriedade	Município	U.F.
1	Pv81	DF_LO1L	Niagara rosada	<i>V. labrusca</i>	Carlos C. Silva	Lago Oeste	DF
2	Pv82b	DF_LO2L	Isabel	<i>V. labrusca</i>	Benedito P. Auler	Lago Oeste	DF
3	Pv23	DF_PL1	BRS Clara	<i>V. vinifera</i>	Uva Zimmermann	Planaltina	DF
4	Pv24	DF_PL2L	Niagara rosada	<i>V. labrusca</i>	Uva Zimmermann	Planaltina	DF
5	Pv42	ES_ST1	BRS Clara	<i>V. vinifera</i>	Sítio Nosso Lar	Santa Tereza	ES
6	Pv42	ES_ST1b	BRS Clara	<i>V. vinifera</i>	Sítio Nosso Lar	Santa Tereza	ES
7	Pv43	ES_ST2L	Niagara rosada	<i>V. labrusca</i>	Sítio Ferrari	Santa Tereza	ES
8	Pv44	ES_ST3L	Isabel precoce	<i>V. labrusca</i>	Sítio Tabocas	Santa Tereza	ES
9	Pv45	ES_ST4L	Niagara rosada	<i>V. labrusca</i>	Casa dos espumantes	Santa Tereza	ES
10	Pv60b	GO_CO1	Sangiovese	<i>V. vinifera</i>	Dr. Marcelo Souza	Cocalzinho	GO
11	Pv61b	GO_CO2	Barbera	<i>V. vinifera</i>	Dr. Marcelo Souza	Cocalzinho	GO
12	Pv62c	GO_CO3	Syrah	<i>V. vinifera</i>	Dr. Marcelo Souza	Cocalzinho	GO
13	Pv63c	GO_CO4	Tempranillo	<i>V. vinifera</i>	Dr. Marcelo Souza	Cocalzinho	GO
14	Pv85	MG_SM1	Syrah	<i>V. vinifera</i>	Deflor - Defesa vegetal	Santana dos Montes	MG
15	Pv85b	MG_SM1b	Syrah	<i>V. vinifera</i>	Deflor - Defesa vegetal	Santana dos Montes	MG
16	PV86	MG_SB1	Syrah	<i>V. vinifera</i>	Fazenda Marengo	Santa Bárbara	MG
17	PV87a	MG_CA1	Syrah	<i>V. vinifera</i>	EPAMIG	Caldas	MG
18	PV87b	MG_CA1b	Syrah	<i>V. vinifera</i>	EPAMIG	Caldas	MG
19	PV88b	MG_CA2	Syrah	<i>V. vinifera</i>	Vitacea	Caldas	MG
20	Pv83a	MT_NM1L	Isabel precoce	<i>V. labrusca</i>	Melina ind.	Nova Mutum	MT
21	Pv83c	MT_NM1cL	Isabel precoce	<i>V. labrusca</i>	Melina ind.	Nova Mutum	MT
22	Pv22	PR_MA1	Itália	<i>V. vinifera</i>	Sr. Araripe Pereira	Marialva	PR
23	Pv22b	PR_MA1b	Itália	<i>V. vinifera</i>	Sr. Araripe Pereira	Marialva	PR
24	Pv21	PR_RO1L	Carmem	<i>V. labrusca</i>	Sítio Corol	Rolândia	PR
25	Pv21b	PR_RO1bL	Carmem	<i>V. labrusca</i>	Sítio Corol	Rolândia	PR
26	Pv84a	RJ_PS1	Syrah	<i>V. vinifera</i>	Inconfidência	Paraíba do Sul	RJ

27	Pv3	RS_BG1	Merlot	<i>V. vinifera</i>	Vinícola Miolo	Bento Gonçalves	RS
28	Pv4	RS_BG2	Seleção 921-98	<i>V. vinifera</i>	Embrapa	Bento Gonçalves	RS
29	Pv5	RS_BG3	C. sauvignon	<i>V. vinifera</i>	Embrapa	Bento Gonçalves	RS
30	Pv25	RS_BG4N	Merlot	<i>V. vinifera</i>	Mário Fochezzato	Bento Gonçalves	RS
31	Pv31	RS_BG4	BRS Clara	<i>V. vinifera</i>	CNPUV	Bento Gonçalves	RS
32	Pv32b	RS_BG5	BRS Linda	<i>V. vinifera</i>	CNPUV	Bento Gonçalves	RS
33	Pv33	RS_BG6L	Isabel	<i>V. labrusca</i>	CNPUV	Bento Gonçalves	RS
34	Pv34	RS_BG7	BRS Morena	<i>V. vinifera</i>	CNPUV	Bento Gonçalves	RS
35	Pv47	RS_BG8	Pinot Noir	<i>V. vinifera</i>	Vinícola Miolo	Bento Gonçalves	RS
36	Pv48	RS_BG9	Cabernet sauvignon	<i>V. vinifera</i>	Vinícola Miolo	Bento Gonçalves	RS
37	Pv66	RS_BG12	Moscato Branco (3061)	<i>V. vinifera</i>	Embrapa Uva e Vinho	Bento Gonçalves	RS
38	Pv67	RS_BG13	Moscato Branco (3057)	<i>V. vinifera</i>	Embrapa Uva e Vinho	Bento Gonçalves	RS
39	Pv68	RS_BG14	Moscato Branco (3058)	<i>V. vinifera</i>	Embrapa Uva e Vinho	Bento Gonçalves	RS
40	Pv69	RS_BG15	Moscato Branco (3059)	<i>V. vinifera</i>	Embrapa Uva e Vinho	Bento Gonçalves	RS
41	Pv70	RS_BG16	BRS Clara	<i>V. vinifera</i>	Embrapa Uva e Vinho	Bento Gonçalves	RS
42	Pv71	RS_BG17	BRS Morena	<i>V. vinifera</i>	Embrapa Uva e Vinho	Bento Gonçalves	RS
43	Pv72b	RS_BG18L	Vênus	<i>V. labrusca</i>	Embrapa Uva e Vinho	Bento Gonçalves	RS
44	Pv73b	RS_BG19	Red Globe	<i>V. vinifera</i>	Embrapa Uva e Vinho	Bento Gonçalves	RS
45	Pv74b	RS_BG20	Itália rubi	<i>V. vinifera</i>	Embrapa Uva e Vinho	Bento Gonçalves	RS
46	Pv75b	RS_BG21	Ribier	<i>V. vinifera</i>	Embrapa Uva e Vinho	Bento Gonçalves	RS
47	Pv76b	RS_BG22	Itália	<i>V. vinifera</i>	Embrapa Uva e Vinho	Bento Gonçalves	RS
48	Pv77	RS_BG23	Benitaka	<i>V. vinifera</i>	Embrapa Uva e Vinho	Bento Gonçalves	RS
49	Pv78	RS_BG24	Itália melhorada	<i>V. vinifera</i>	Embrapa Uva e Vinho	Bento Gonçalves	RS
50	Pv79	RS_BG25L	Niagara rosada	<i>V. labrusca</i>	Embrapa Uva e Vinho	Bento Gonçalves	RS
51	Pv1	RS_CX1L	Niagara Rosada	<i>V. labrusca</i>	Roni Castoldi	Caxias do Sul	RS
52	Pv2	RS_CX2	Herbermont	<i>V. bourquina</i>	Roni Castoldi	Caxias do Sul	RS
53	Pv35b	RS_CX3	Itália	<i>V. vinifera</i>	José Zaurono	Caxias do Sul	RS
54	Pv36	RS_CX4L	Niagara rosada	<i>V. labrusca</i>	José Zaurono	Caxias do Sul	RS
55	Pv37	RS_CX5	Cabernet sauvignon	<i>V. vinifera</i>	José Picoli	Caxias do Sul	RS
56	Pv38	RS_CX6L	Isabel	<i>V. labrusca</i>	Pavilhão da festa da uva	Caxias do Sul	RS
57	Pv39	RS_CX7	Itália	<i>V. vinifera</i>	Oscar Botton	Caxias do Sul	RS

58	Pv40	RS_CX8L	Isabel	<i>V. labrusca</i>	Casa de pedra	Caxias do Sul	RS
59	Pv46	RS_CX9	Itália	<i>V. vinifera</i>	Tania Boff	Caxias do Sul	RS
60	Pv49	RS_CX10L	Isabella	<i>V. labrusca</i>	Roni Castoldi	Caxias do Sul	RS
61	Pv28b	RS_ER1L	Bordô	<i>V. labrusca</i>	Olinto Batistela	Erechim	RS
62	Pv29b	RS_ER2	Benitaka	<i>V. vinifera</i>	Olinto Batistela	Erechim	RS
63	Pv6	RS_FC1	Merlot	<i>V. vinifera</i>	Roberto Molon	Flores da Cunha	RS
64	Pv7	RS_FC2L	Isabel	<i>V. labrusca</i>	Roberto Molon	Flores da Cunha	RS
65	Pv8	RS_FC3	Moscato Branco	<i>V. vinifera</i>	Arthur Molon	Flores da Cunha	RS
66	Pv9	RS_FC4	C. Sauvignon	<i>V. vinifera</i>	Arthur Molon	Flores da Cunha	RS
67	Pv10	RS_FC5	Chardonnay	<i>V. vinifera</i>	Vinícola Argenta	Flores da Cunha	RS
68	Pv11	RS_MB1	Chardonnay	<i>V. vinifera</i>	Vinícola Miolo	Monte Belo	RS
69	Pv26b	RS_SV1	Rubi	<i>V. vinifera</i>	Antonio Zanandrea	São Valentim	RS
70	Pv27	RS_SV2L	Isabel	<i>V. labrusca</i>	Antonio Zanandrea	São Valentim	RS
71	Pv30	RS_SV3L	Niagara rosada	<i>V. labrusca</i>	Antonio Zanandrea	São Valentim	RS
72	Pv50b	SC_VI1	Poloske	<i>V. vinifera</i>	Epagri	Videira	SC
73	Pv51b	SC_VI2	Cabernet sauvignon	<i>V. vinifera</i>	Epagri	Videira	SC
74	Pv52b	SC_VI3	Vermentino	<i>V. vinifera</i>	Epagri	Videira	SC
75	Pv57c	SP_IN1L	Niagara rosada	<i>V. labrusca</i>	Sítio São José	Indaiatuba	SP
76	Pv58b	SP_IN2L	Niagara rosada	<i>V. labrusca</i>	José Valdomiro	Indaiatuba	SP
77	Pv59	SP_IN3L	Niagara rosada	<i>V. labrusca</i>	Sítio Mariana	Indaiatuba	SP
78	Pv12	SP_JA1	Centenial	<i>V. vinifera</i>	Córrego do Jatai	Jales	SP
79	Pv13	SP_JA2	Benitaka	<i>V. vinifera</i>	Venderiano H. Zanetone	Jales	SP
80	Pv14	SP_JA3	Morena	<i>V. vinifera</i>	Embrapa QD1	Jales	SP
81	Pv14b	SP_JA3b	Morena	<i>V. vinifera</i>	Embrapa QD1	Jales	SP
82	Pv15	SP_JA4L	Clara	<i>V. labrusca</i>	Embrapa QD1	Jales	SP
83	Pv15b	SP_JA4bL	Clara	<i>V. labrusca</i>	Embrapa QD1	Jales	SP
84	Pv16	SP_JA5	Linda	<i>V. vinifera</i>	Embrapa QD9	Jales	SP
85	Pv53	SP_LO1L	Niagara rosada	<i>V. labrusca</i>	Sítio Santa Rita	Louveira	SP
86	Pv54	SP_LO2L	Isabel precoce	<i>V. labrusca</i>	Sítio Santa Rita	Louveira	SP
87	Pv55	SP_LO3	Syrah	<i>V. vinifera</i>	Sítio Santa Rita	Louveira	SP
88	Pv56b	SP_LO4	BRS Clara	<i>V. vinifera</i>	Sítio Santa Rita	Louveira	SP

89	Pv17	SP_PO1	Italia	<i>V. vinifera</i>	Sr. Osvaldo	Palmeira D'Oeste	SP
90	Pv18	SP_PO2	Benitaka	<i>V. vinifera</i>	Sr. João	Palmeira D'Oeste	SP
91	Pv19	SP_TP1	Benitaka	<i>V. vinifera</i>	João Zambão	Tupi Paulista	SP
92	Pv20	SP_TP2L	Niagara rosada	<i>V. labrusca</i>	João Zambão	Tupi Paulista	SP

U.F.= Unidade da Federação

1.2.5 Validação de novos marcadores microssatélites desenvolvidos para análise genética de populações de *Plasmopara viticola*

Trinta e quatro novos marcadores microssatélites foram desenvolvidos no presente trabalho e selecionados para validação e análise genética de populações do patógeno. Sequências de iniciadores de PCR (*primers*) desenvolvidas para cada marcador foram sintetizadas e utilizadas na avaliação do potencial emprego em rotina dos marcadores em análise genética de *P. viticola*. Estes marcadores foram avaliados juntamente com outros dez microssatélites de *P. viticola* usados na maioria dos estudos de genética de população do patógeno (Gobbin *et al.*, 2003a; Matasci *et al.*, 2010; Delmotte *et al.*, 2006) (Tabela 1.2). Os 10 marcadores, todos com motivos de dinucleotídeos com repetição perfeita, foram usados como controle comparativo dos novos marcadores desenvolvidos no presente estudo. Os testes de validação dos novos marcadores foram realizados com a genotipagem de 92 isolados de *P. viticola* (Tabela 1.1).

Tabela 1.2. Marcadores microssatélites de *Plasmopara viticola* utilizados como controle na avaliação dos novos marcadores desenvolvidos no presente estudo.

Primer	Sequências Diretas e Reversas dos Primers (5'-3')	Motivo	Fluorocromo	Autor
ISA	ATTAGCGGCATGGACGTT; GAGAAGTTCCGCCAAGTACA	(TC) _n	HEX	Gobbin <i>et al.</i> , 2003
BER	AATGCAATGGTCTTCATCTCG; CTCTGCGGTAAAAGCCTGTC	(TC) _n	FAM	Gobbin <i>et al.</i> , 2003
ISANew	GGCATGGACGTTGACTCAC; GAGAAGTTCCGCCAAGTACA	(TC) _n	NED	Matasci <i>et al.</i> , 2010
BERNew	CAAGCAATGCAATGGTCTTC; GGCATCACTCTCTACCTGCTC	(TC) _n	HEX	Matasci <i>et al.</i> , 2010
Pv7	TCTTCCGAAAAGGGACGTAA; GCGTCACTGCATCTACGAAA	(TG) ₇	FAM	Delmotte <i>et al.</i> , 2006
Pv13	CGATGAAGTGGACCCTCATT; CCGGTAGTCAATTGCACCTT	(TG) ₈	NED	Delmotte <i>et al.</i> , 2006
Pv14	CAGAAACGCACAAGGTCTGA; AATTGCATACTGCAGCAACG	(TG) ₈	HEX	Delmotte <i>et al.</i> , 2006
Pv17	CAGAGTCGAACAAGTACATTG; CTTTGTGCGCTTCTAACAAC	(TC) ₁₂	FAM	Delmotte <i>et al.</i> , 2006
Pv31	TCCCCATGCTGAAGAGTTTC; TTCTTTCTAAGGCCGTGTGG	(CA) ₉	NED	Delmotte <i>et al.</i> , 2006
Pv39	ACGCATGGCGAACACGTAAG; CAGACGGGAAGAAGTTGCTC	(CA) ₆	HEX	Delmotte <i>et al.</i> , 2006

As reações de amplificação dos alelos nos locos microssatélites foram realizadas empregando-se painéis multiplex, contendo dois ou três pares de primers, utilizando as seguintes condições de reação de polimerase em cadeia (PCR): 2 µl de solução 15 ng/µl de DNA genômico de isolado de *P. viticola*; 0,2 µM de Taq DNA polimerase 1 U; 0,2 µl de iniciador 5 µM (direto e reverso); 0,3 µl MgCl₂; 0,8 µl de BSA 2,5 mM; 1 µl de Tampão 10X para Taq DNA polimerase (Life Technologies); 1,5 µl de dNTP 2,5 mM e 3,7 µl de H₂O padrão Milli-Q, totalizando um volume final de 10 µl. As reações de polimerase em cadeia foram realizadas em Termociclador Veriti™ (Applied Biosystems, USA) e as condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos, para ativar a enzima, seguidos de 35 ciclos envolvendo uma desnaturação a 96°C por 30 segundos, temperatura de anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão pela Taq polimerase com incorporação dos nucleotídeos a 72°C por 50 segundos; após os 35 ciclos, foi realizada uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram preparados para genotipagem em sequenciador de DNA utilizando-se 1,3 µl do produto PCR, 0,32 µl do padrão de fragmentos de DNA de tamanho conhecido marcado com fluorescência ROX (Brondani & Grattapaglia, 2001) e 20 µl de formamida HiDi (Applied Biosystems, USA). Os produtos desnaturados foram injetados em sequenciador automático de DNA modelo ABI 3730 (Applied Biosystems, USA). Os resultados da genotipagem foram analisados com o software GeneMapper® v4.1 (Applied Biosystems, USA). Os dados de genotipagem dos 92 isolados de *P. viticola* mostrando os alelos em pares de bases, estão disponíveis no Anexo 1 – Tabela 1.

1.2.6 Análises estatísticas dos dados dos marcadores microssatélites desenvolvidos

Os alelos em cada loco foram identificados pela análise dos produtos de PCR com base nas informações de motivo do microssatélite. A análise individual dos locos foi inicialmente realizada de forma descritiva, observando a presença/ausência de amplificação de produtos de PCR em cada loco. Em seguida, análises detalhadas de cada loco foram realizadas, computando-se o número de alelos detectados em cada loco, a qualidade dos picos nos eletroferogramas obtidos no sequenciador de DNA, a complexidade do padrão de eletroferograma de cada loco, a presença de locos duplicados, bem como o intervalo de tamanho de alelos em pares de base.

Para a obtenção das estimativas de tamanho dos alelos em pares de base para possibilitar comparações entre isolados de *P. viticola*, foi utilizado o programa Allelobin (Idury & Cardon, 1997). O software utiliza a metodologia de quadrados mínimos, com base no motivo do microssatélite, para transformar os dados brutos de tamanho do alelo lidos nos eletroferogramas em valores arredondados para a unidade. Desta forma, é possível estabelecer com acurácia os genótipos de cada isolado do patógeno. Isto permite a minimização de erros de genotipagem ao computar na análise estatística as pequenas alterações de tamanho de alelos detectadas no processo de identificação dos genótipos em sequenciador de DNA.

As estatísticas descritivas e o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) foram calculados para cada marcador com base nos genótipos de 92 isolados de *P. viticola* (Tabela 1.1). Foram estimados os seguintes parâmetros: (a) número de alelos observados em cada loco; (b) a heterozigosidade observada (H_o); (c) a diversidade gênica (DG), segundo a fórmula $[GDe] = (1 - \sum p_i^2)(2n)/(2n-1)$, onde p_i é a frequência do *iesimo* alelo para cada loco e n o número de amostras analisadas; (d) o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC-*Polymorphism Information Content*), estimado com base na probabilidade de que um

indivíduo seja informativo em relação à segregação de seus alelos herdados (Botstein *et al.*, 1980). Além disso, foram efetuados testes de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para todos os marcadores polimórficos. As análises foram realizadas com o programa PowerMarker versão 3.25 (Liu & Muse, 2005).

1.2.7 Avaliação da Diversidade Genética e da Estrutura de População de *P. viticola*

Quinze marcadores microssatélites que apresentaram maior qualidade de análise, maior robustez e maior conteúdo informativo entre os 44 marcadores testados, foram utilizados para análise de diversidade genética e estrutura populacional dos 92 isolados de *P. viticola* descritos na Tabela 1.1.

A análise do padrão de estruturação populacional dos isolados de *P. viticola* foi realizada com o software Structure (Pritchard *et al.*, 2000). Inicialmente, simulações para o número de K (número de *clusters* ou subpopulações do patógeno) foi estimado, com K variando de 1 a 10, assumindo que as amostras possuem miscigenação (*admixture model*), ou seja, frequências alélicas correlacionadas entre as subpopulações, quando existentes. Foram usadas 200.000 interações nas corridas e um *burn-in* de 50.000, para cada valor de K. A definição final do número de subpopulações (K) no conjunto de 92 isolados de *P. viticola* foi definida através da metodologia desenvolvida por Evanno *et al.* (2005). Foram realizados ainda testes de alocação individual de amostras, visando inferir a inclusão de amostras em diferentes subpopulações, com base no genótipo multiloco das amostras. Foram calculados os valores médios de F_{ST} (Índice de Fixação de Wright) para a discriminação estatística das subpopulações na amostra de isolados de *P. viticola*. O valor de F_{ST} é estatística descritiva da medida de diferenciação genética de populações. F_{ST} estima o grau de estruturação de uma população, calculado pela análise da correlação entre os alelos dentro das subpopulações,

medindo o nível de isolamento das mesmas. A interpretação de valores estimados de F_{ST} segue as seguintes considerações (Wright, 1969): $0 - 0,05$ = pouca diferenciação; $0,05 - 0,15$ = diferenciação moderada; $0,15 - 0,25$ = grande diferenciação; $> 0,25$ = diferenciação muito grande. Portanto, estimativas de F_{ST} igual a 0 (zero) identifica uma população panmítica, enquanto que um valor de F_{ST} igual a 1,0 (um) indica que toda a variação genética é explicada pela estruturação da população (ou que duas populações consideradas não possuem alelos em comum e não dividem nenhuma diversidade genética).

As estimativas de similaridade genética entre os 92 isolados do patógeno foram calculadas usando o coeficiente “*band*” de similaridade (Lynch, 1990), implementado no programa NTSYS-pc (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System for personal computers*, Applied Biostatistics, Inc.), versão 2.1 (Rohlf, 1998). A matriz diagonal de distâncias genéticas foi submetida à análise de agrupamento pelo procedimento de SAHN (*Sequential Agglomerative Hierarchical Nested Cluster Analysis*). A análise de agrupamento foi desenvolvida de acordo com o método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Average*). Uma análise de coordenadas principais foi realizada e os valores das primeiras coordenadas (*eigenvalues*) plotados (Jackson, 1991; Rohlf, 2000) para detecção de diferenças individuais e agrupamentos de isolados de *P. viticola*.

Análises semelhantes às descritas acima, que foram desenvolvidas com a bateria de 15 marcadores microssatélites (10 novos + 5 marcadores da literatura), foram também realizadas com 3 baterias de quatro marcadores microssatélites cada, compostas por marcadores com diferentes valores relativos de PIC (baixo, médio e alto). Até o momento, a maior parte das análises de estrutura de populações tem sido feitas com apenas 4 marcadores (Gobbin *et al.*, 2003a, Gobbin *et al.*, 2003b; Rumbou & Gessler, 2004; Gobbin *et al.*, 2005; Gobbin *et al.*, 2006; Delmotte *et al.*, 2006; Scherer & Gisi, 2006; Koopman *et al.*, 2007; Rumbou & Gessler,

2007; Matasci *et al.*, 2010). O objetivo foi avaliar o efeito da bateria de marcadores moleculares na detecção de estruturação genética em populações de *P. viticola*.

Para testar a independência entre a classificação geográfica dos isolados de *P. viticola* e a classificação dos isolados em subpopulações do patógeno, foram realizados Testes Exato de Fisher em tabelas de contingência (gxs), onde g= número de regiões geográficas e s= número de subpopulações, utilizando-se a planilha eletrônica Excel. O teste Exato de Fisher é um teste estatístico específico para análise de dados categóricos quando o tamanho das amostras em diferentes classes é pequeno. O teste foi empregado na análise de associação entre a variação na distribuição geográfica dos isolados do patógeno e a variação na classificação dos isolados em diferentes subpopulações detectadas na análise de estruturação populacional. O teste exato de Fisher é um teste exato e não-paramétrico. O resultado obtido equivale ao valor de significância do teste. As equações para tabelas de contingência 2x3 e 3x3 empregadas na análise são baseadas na extensão de Freeman-Halton para testes Exatos de Fisher (Freeman & Halton, 1951). Para testes 2x3, a equação é a seguinte (onde a, b, c, d, e, f representam os valores distribuídos em cada um dos quadrantes da tabela de contingência, n é o número total de isolados, e $\binom{n}{k}$ é o coeficiente binomial:

$$p = \frac{\binom{a+b}{a} \binom{c+d}{c} \binom{e+f}{e}}{\binom{n}{a+c+e}}$$

Testes Exatos de Fisher também foram utilizados na análise de associação entre a classificação dos isolados em diferentes subpopulações e classificação das espécies de videira em que os isolados foram encontrados. Este teste permite verificar se há evidência de estruturação populacional de isolados de *P. viticola* de acordo com a espécie de videira de onde foram obtidos (ex. *V. vinifera* ou *V. labrusca*).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Montagem *de novo* do genoma de *Plasmopara viticola* para desenvolvimento de novos marcadores microssatélites para a espécie

O sequenciamento NGS resultou em 228.549.872 sequências de leitura de DNA (*reads*), totalizando 17.369.790.272 pares de bases, obtidas do sequenciamento de DNA total extraído de uma lesão de *P. viticola* em folha de videira da variedade Cabernet Sauvignon (Tabela 1.3). O primeiro passo da análise foi retirar deste total de sequências de leitura as sequências de DNA do hospedeiro que eventualmente poderiam estar contaminando as sequências do míldio. Utilizou-se, para tanto, uma análise de alinhamento das sequências do fungo com o genoma referência de videira (Jaillon *et al.*, 2007). Foram identificadas 2.789.995 sequências de leitura de videira (212.039.620 pb) misturadas com as sequências do míldio. Estas sequências foram descartadas da análise. A diferença entre o número total de sequências de leitura (228.549.872) e as sequências de leitura atribuídas a *Vitis* (2.789.995) culminou em um banco de dados de 225.759.877 de sequências de leitura de *P. viticola*, cobrindo 17.157.750.652 pb do genoma do míldio. Este banco de dados de sequências de míldio foi então usado na montagem *de novo* de segmentos do genoma do fungo.

A montagem *de novo* foi iniciada com um valor mínimo de 200 pb para o comprimento dos *contigs*. Foi possível utilizar 205.109.607 de sequências de leitura (15.588.330.132 pb) para montar 93.134 *contigs*, totalizando 84.482.175 pb do genoma de *P. viticola* (Tabela 1.4). O valor de N50 para a montagem *de novo* do genoma de *P. viticola* foi $N50 = 2.552$ pb (Tabela 1.5). O parâmetro N50 é usado em montagem de genomas para estimar o comprimento de *contig* a partir do qual a coleção de todos os *contigs* obtidos (neste caso 93.134) contém pelo menos a metade do somatório de comprimentos de *contigs* da

coleção. O N50 permite comparações entre montagens de genoma para avaliar a eficiência do processo de montagem. Assim, ao comparar duas montagens de genoma, aquela com maior N50 possui, relativamente, maior abundância de *contigs* de maior comprimento. O maior contig montado no genoma de *P. viticola* atingiu 68.036 pb. O tamanho médio foi 907 pb. A montagem *de novo* do genoma de *P. viticola* foi, portanto, eficiente para o propósito de avaliar a estrutura do genoma do fungo e identificar regiões ricas em microssatélites para desenvolvimento de marcadores moleculares.

Tabela 1.3. Resultados do sequenciamento NGS do genoma de *Plasmopara viticola* através de DNA obtido de lesão causada pelo fungo em folhas da cultivar Cabernet Sauvignon de *Vitis vinifera*. As sequências de *Vitis vinifera* foram identificadas e eliminadas do banco de dados de sequências de *P. viticola*.

Descrição	Contagem	Tamanho (pb)	Total de Pares de Bases
Sequência de leitura (<i>reads</i>)	228.549.872	76	17.369.790.272
Identidade com <i>V. vinifera</i>	2.789.995	76	212.039.620
Sequência de leitura pareadas (<i>paired end</i>)	46.096	213,81	
Sequência de leitura (não pareada)	2.743.899	76	
Sequência usada como referência (<i>V. vinifera</i>)	19 (cromossomos)	15.951.885	303.085.820
Sequência diferente de <i>V. vinifera</i>	225.759.877	76	17.157.750.652

Tabela 1.4. Resultados da montagem *de novo* de segmentos do genoma de *Plasmopara viticola* através de sequenciamento NGS de DNA extraído de lesão causada pelo fungo em folhas da cultivar Cabernet Sauvignon de *Vitis vinifera*.

Descrição	Contagem	Tamanho (pb)	Total de Pares de Bases
Sequência de leitura (<i>reads</i>)	225.759.877	76	17.157.750.652
Sequências montadas (<i>de novo</i>)	205.109.607	76	15.588.330.132
Sequência de leitura pareadas (<i>paired end</i>)	11.178.036	216,34	-
Sequência de leitura (não pareada)	192.509.073	76	-
Sequências não montadas	20.650.270	76	1.569.420.520
<i>Contigs</i> (montagem <i>de novo</i>)	93.134	907	84.482.175

Tabela 1.5. Dados de avaliação da montagem *de novo* de segmentos do genoma de *Plasmopara viticola* através de sequenciamento NGS.

	Comprimento (pb)
N75	550
N50	2.552
N25	8.32
Mínimo	111
Máximo	68.036
Média	907
Número de <i>Contigs</i>	93.134
Total (pb) montados	84.482.175

1.3.2 Detecção de sequências microsatélites no genoma de *Plasmopara viticola*

O genoma de *P. viticola* é rico em sequências microsatélites. Análise dos 93.134 contigs montados possibilitou a identificação de 849.804 sequências microsatélites (repetições de di, tri e tetranucleotídeos) no genoma do fungo (Tabela 1.6). Não foram consideradas na análise as repetições com comprimento do motivo maior ou igual a 5 pb, visto que em geral os marcadores baseados neste tipo de sequência são pouco polimórficos. Um banco de dados com sequências microsatélites perfeitas, isto é, sequências idênticas repetidas em tandem, foi criado e utilizado para selecionar os locos de potenciais marcadores. Um total de 178.080 sequências microsatélites perfeitas foi computado, divididas em 146.822 sequências de dinucleotídeos, 29.195 sequências de trinucleotídeos e 2.063 sequências de tetranucleotídeos. Como o objetivo da análise foi a identificação, validação e uso de microsatélites com alto grau de polimorfismo, optou-se pela seleção de sequências repetitivas de dinucleotídeo para o desenvolvimento dos marcadores. Os 146.822 locos microsatélites di-nucleotídeos perfeitos foram detectados em *contigs* com uma cobertura mínima 100X. A vasta maioria dos locos de dinucleotídeos (145.683, o que corresponde a

99,22% deste subconjunto de sequências) possui o número de repetições do motivo variando de 3 a 5 repetições (Tabela 1.6). Foram selecionados 34 locos microssatélites do subconjunto de 1.139 sequências microssatélites de nucleotídeos com 9 ou mais repetições do motivo para síntese e genotipagem dos isolados de *Plasmopara viticola* (Tabela 1.7). As sequências dos iniciadores de PCR (*primers*) desenvolvidos para os 34 novos marcadores microssatélites de *P. viticola* são apresentadas na Tabela 1.8. Nove marcadores possuem sequência repetitiva (AG)_n e 25 possuem sequência repetitiva (AT)_n.

Tabela 1.6. Distribuição de sequências de microssatélites no genoma de *Plasmopara viticola*. Apenas as sequências perfeitas de di, tri e tetranucleotídeos com mínimo de 9 repetições do motivo foram consideradas no desenvolvimento de marcadores microssatélites.

	# SSR	# SSRperf	3 a 5 r.m.	6 a 8 r.m.	9 a 11 r.m.	12 a 14 r.m.	15 a 17 r.m.
DI	197.179	146.822	145.683	928	179	30	2
TRI	366.195	29.195	29.021	169	5	0	0
TETRA	286.430	2.063	2.057	6	0	0	0
TOTAL	849.804	178.080	176.761	1.103	184	30	2

#SSR= número de sequências microssatélites identificadas na montagem parcial do genoma; #SSRperf= número de microssatélites com motivo perfeito (≥ 3 r.m.); r.m.= repetições do motivo

Tabela 1.7. Sequência de DNA contendo região microssatélite (em vermelho) utilizada para desenvolvimento de novos marcadores SSR para análise genética de *Plasmopara viticola*.

contig 3	AAGACTTCCGACTCCCCTAAATTCTGCTGCAGCGCCGCCGAGGAAGCCATTGGAGACGATGGAGTAGTCGGTACCCTTGAGCGCTAATTCTT GAATGACGAAACTAAGGACTGACTCGTCCTTATTTGAAGTG ATATATATATAT TTACACATCAAATGAACTTCGTGTCCAGTAATACAGAGA ACAGATTTCTCCAATAACGTAATGACTTGTTAGTGTGAATTTAAGCCAACCAGAGAGCAAAATGTTTTGATAAATTTCCGGATCACAAACA CATTAAAAAGTCATATTAACGAT
contig 24	CCCAGGCGATACCTGAACCACGTAACATTACACCACTGAAACCTAAATTTAAAGCATTTTTAGCTGATACTACTCCGATATCAACTAACCGTT GTTTCCAAATTCTATTATTGGTTAACATTTCCCTCGATTTTCATCTAATCTAGTACCAAATTGTTACAAAA TATATATATAT CATTTAGTAGCCC TTTAGGTAATCTTGATTTACTCCGCCTGGTCGAAATATGCTGCGTGCAATTCTTGCTCCTGATACTCTTTCGTAATAATTCATTAATTTTTAC GTTCTTCAAATCCCCAAA
contig 214	GCTTTACGCACCATTTAAATATTGGAGCAAAGTTACAGAACGAGCGCTTCCGCGTAATTTTAGTACTTTCTTTAATGCGTGTATCGTACATGT ATAGCTCCAATTACGA ATATATATATATATATATATATATAT TCGATGATAAAATCGGACACGTTAACAACGACGTGGTCTAGCGTCTGAAA AAACGAACTAATACTCACCGAAACCAATGCATCTGTCTCTGTGGTCTTGGCCACGACTGTATGCAGAAACATAAATGTTACATCATATACGC ACGCATCCACATCCACATCTCT
contig 43	AATCCGGTTCGTCAGTGTGTCGAGAAGCTCTGGAAGCAGCAGCACGCACTGCTGCTTCCTTCTTGGCTGCAATCTTGATCGCTTCTGCCTTCTT CCTTTTGTCAATCTGGAAAATCGCATAAG CTCTCTCTCTCT AACAAAATAAATCCTGGCAAAAACCATAAGTACACACCATGACAAGAGGC TCATCGTCAAGCGAAAGGCGTCCACTGGCCTCCGCGGCAGGATTAACCTCCTCAGCGGCCCAAAACCCGTAATAACGTCTTCGGTTCGCGCC ATGGTTCAAAGCCGCAAAGAAATCGTCGG
contig 1395	GCCCCGTTTTCTGCTATTTCGATTCTGACGTTGATTGCGACGCTTCCGCTTCGAGATCACACTGCCCTCAGCTATCTGCGTCAACTTACGCTCCG CTAGCCACTGCGCCTTGACCTGTTTGCGGCGCTGGTGCTTGTCTCAGAGGTTTGTCCGCCATTGAATGTATCGTTCTCAAATATAG TATATATA TATA ATGCTCAAAGTTTATATCTCGATATCGTAATCGAGTCACAACACTAGGTTTGTCTCATGCAATCTCTCTCTAAAGTGCCGTCTTGACCTTA TCCTCCCGACACGTGCGCA
contig 11832	TCAAAGCAAAGCCTACAGAAGCTTCAAGTCGCCATCAAGAAGAAGTCACCCAGACAAGAAGAGTT GAGAGAGAGAGA AAAAGTTCTGAAGG ATAGACAACCGCGCGCAAGAAAGTAAAGTCTATTGAGCTGAAGGATGATGCGATGGCCGTGCAACCTTGTGTCTATAGTGCAAGCTGTAG CCCGTTCGCTCGCACAACGGCGCTATCTTTATTAATTGGCCGTATAAATATAGTGCCTTCGAGGCCGTCTAGGACAAACGACGCTTTATTGG TACAAAACGAGTGCTGCTGAGCTA
contig 30540	TCGTTCTTGATGCGTTCTCATTTCCTCAAAATTTAACAGAAGTGCCAGCTATATTCATCACCACCGTTT TGTGTGTGTGTG CCAAAGTCGC ACCACACGTTGCACAGAAGAGGCTTGTAGGAATCCACAAAATCTTGTGATGTGTTTTAGCTGCTTAGTGGCAACAGTAAATGCAGTTAGCTTT TTATGCATTTTGAAGCTAGCGAGTCTTACAAATAGCACTAACTGCGCATTAGACACATGCGGAAGGCGTCTTAGAACCTTTGTGATGGTCCA GGCAGACACATTATCGGCGTA

contig 40219 ACAACTTTTTTCGTCCGAAAACTTATTGCCATAGATTTTTTACAAGGCCCAACAAATCAGCTTCAGCACTATGGT**TCTCTCTCTCTC**GACGC
TTTTATCCACCGGTGTAGGTATCGACACCAATGGCCCATAGAGACAAATCTTAAGTGTCTGTTTGCGTAAATTTCTAGTCATTCCTGCAGCAA
GCGCTTGTAACGACAAAACTGATCATTGGGATGACATTCTGAAGAATCAAGCTATTTTGTAGTGTTCGGGAGCGACACTATTGCAGCAATC
AAATATCACCCGAGATGTCTGA

contig 600 TCATCCTTACAAAGATCAAGTCAAGGCCTCTTTCATATTTAATACTACCTGGCGTGGTGCACACC**GAGAGAGAGAGA**TTATCGATGTCGGAG
CAAATCACTGAGCAGCAAGTGGTGGCTACCTACAAGAGTCTGCGCGCCGAGGTGCGGCAGATAGCAGAAAAGATCTCTGAGCTAGAGTCAG
AGACTACAGAACACGATCGTGTGATCCAGACGCTCAAAGAGCTGCCAGCGACCGTAAAGCGTACCGCATGGTTCGGTGGCGTTTTGGTGGAG
CGCACAGTGCAAGAGGTTCTACCCG

contig 429 GGCTGTACCTATTTGACGAGACGGATGATTTGCGCATGTGGAAATCTTTGGATAACGGGCCAGGTACATAGCTCATCAAACCGCTACTATAT
CATATATATATATCGTAAGCAAACACCCTCCCTTTATTGATGCTTGACCGCTTTCATTAGCAAGTAAAGAAGGTCACGTCGTCCGGCCGGGCT
AGTATATCCGATACCAAGTATAAATGAGTAGCTTACAATGGCTGCGACAGCCATAATCACCTAACGCCATATCTTATTACCTTACTTAAGGCT
CAAGTAAGTCTGGTCTTCAA

contig 118 AGAGTTTCGAAAGGATCGTTTGTGTTTGGTCTGACGAATCAAAATATTTGTTTCTTTGTCGTGTTCGATGCTGGAGCAATCGAGAATAGCTCTAG
TATATATATATACGAAGCTTGGTTTAGGAGAGCACGAAAATATAAGTTCATGTCGGATACTTCAGATGTGGTAGCGCTCCTTTCCGATAAAG
AGCTAAAGCATCAGTTGACGCAAAGCATTTACCGTCAACCCATGAATGATCTGTACGATCACGTTGCCCAAAGTAAGAAGGATTTGATGAA
CTGACTATATTGATAATTTATAA

contig 347 TGGCTTCTTACGACGCCGGGTA AAAATTGTCTAAGATAATAAATGACTGCACGCCGAAATATCGCGCTGAAGTAATGGCGCAATTGAATCACA
ATTCTTCTGTAGATACCACGCAAAGCAGCCTACCA**ATATATATATAT**TGCGGCGTGGGATCAAGATATGCGTGCTGATCAACACCACAACCC
GTGTTAACTCCTCCTTCTACGTTGGACCCGATGCTCAGAACGAGCGGACCTCTTGGACGACAACATGCATCGACGCTGGATGTTGACGAGT
CAACTGGCATGCTCGCCACTAGA

contig 455 GAGGTTTTTTTTCTTGATAAACTAGACCCATTGCTTTGCAAATTT**ATATATATATA**GATATATATACATTGTCGATTGCACGCTTCAATTCCTT
AAGTGCGGGAAAGGTGAATGATCGTTCTTCAAAAAAATTTCAATTTTCTGCACGCCTTCTGTGTGCAAGAAGTCGCAACCTCATCACGCCTA
ACAACACGTTTGCTGTCAAATTTAGGCCTACGTGGGCAAATTTACAGCCTGGATCCCAAGATGGATAGATCACCTTTCTGTATTTGTTCGGATC
CGCTCTTTGTGCTACTCGGA

contig 544 TATATTATGTGTGAGTCGCAACAGTTCGTTAATATTAACGCTTCTATTTTTTGCAGCGCAATAGCACCTTGAG**GTGTGTGTGTG**TTTTTTTTCT
TCTTCTTAGCAATGTACGCATCCTGTGCTCAATATTATTGTCCAAGAGCAATAGCTACTATCAGTTACTCAAACACTAGCATAGAATTGCAAA
GATCGATGTACAAGTCATCATTGCAAATTTTTCAAGTCGCGATAACAAATGTGACTCAGCACCAGTTCCTGCCACTTACCCTACTGATGGCAC
CCAATTA AAAATGTTATGGCTA

contig 629 CAAGACGCTATGAGATGACTGATGAGCGCTATGCGTTGTCTTTGCTCCTCGATTATTGTTCGACTCTACGATCATCATCCAGGTCTATCACGGA

CTTCGTGTACAGG**CACACACACACA**AGGAATAAAATTTTAGGATTGGCTTGTCTTTGACCGTAATTTGTTTTATCGACCGCTTTTCGTAGTTTAC
CGACGTGTCTATCGGAGACCTTCCCCTTTGATGCCAAGACGTGGTAAGCTGCCAGGTATTGCCGTTCTCTCTCAGATAGGTCTGGGTTTAATG
AAGATACACCTTGTGCTGACA

contig 190 TGAATAAGGAGTCCAGTATAGAAAGCCAGCATCTAAAAGAGTGGCTTGGAGATAGCAAGAAAGTTTGAAGCTTAAAACTC**ATATATAT**
ATATATTTCGCTTCACAATTTACCTTCTACCGTGCACACCATATCTAAAAGGCTAACAGCCGCACCGGACTCGTCTCCTCCAACCTCGCCTCAAC
AACGCCATCCATATGGACCTATTCTTACTGGGATTTGTCATGCTCATGACGCTGGTAAAGTAGTGTGCGACTGGCGCTTGTGCAGGTAGCCAAG
CCTGTGCCGGTGACTGAGACGT

contig 822 TGCTAATTTAATTTGACTCTTCAACCACTTCGCGGTTCTTCTCCAGATCACGA**ATATATATATATAT**TGAACACCTCGAAGTACCGATCTATT
CTCAGTTCCCTCCAACAAGTGCTGCAAAGGTATTGTATTTGCCCCCTAGAACTATCGCAAAGTTGCTATATATCTTATTAATAGCCTATGTATT
CTGAATATATGATCAGTAGGCCTACCAAAGGCTGATATTGAGTGATGTTTCACTCCATGTTTTGTTATAGCAGCATGTACTTTTTGATAGAGA
ATCTATTCCACTTTAGATGG

contig 1342 TAAGAGACTTCGCGTACGCAGATCGATGATTATAATTCTTGAACACACAAGTGTTTAAACAATACTTAGGGTACTTATCAGCACTGTCAC
GTAACGGTTGAGCTAATAAGGTTTGACGAGTATCTGGCGTGTTACAGCCCGCATTTTA**ATATATATATATAT**TTATACAAATAGAGATAAAT
ACGAGTACATTTTGTGATCTAATTTTGAAGCAATACATCTCTTGTATGTCTCGGCATCGGCATATGACCAATCCATGCGCTGAGAGCTAAAG
CTCCGAGCGCGGAGATGGTCAC

contig 1644 CGCAAAGCGGGACGTCTGAGAATAAAGGAATCGCTTCAGCGGGAGATTTTGGTTCTAGAAAGCCAATCTCCAGGGTATCGGCTTCCAAC
CCTTTGTTGCGGTCTGATATTAAGTCTGCTAGCATTAGGAT**GAGAGAGAGAGAG**ACCTCAGCTAAGGGACTCACAAGTTTTGTTGTTTAAAC
GTTAAGGACTGCGGGGTTATGGGCCGTGACTTCGGCACACATTTGCCTTCACGACTTTAAACAGATCCTATCTTTACTTAGTGCGGATACA
AATCCCCTGAGCTAAGCTTGTA

contig 1725 AATCGATTTCGTTACGTACGCTTTTGTAAATGGATCGATTTGGGCGACATAATGCCATACTATAAACC**AGAGAGAGAGAGAG**GGTAAAAGAA
ATTCAACAGTGTCAACCAAACTTTCTCGTTAGACGCGGTACCTGTTTAAAGGTGCGGATGAGCATCAACACACGCGCGTCTCCTCCTGAG
ACTGTCGAATCTCGCTGCTGAGCTTTTGCACAAGTGGAGTCACTTTCTCACTCTTCCAGCAATGCAAAGGCACAGCTGGAGAGCGTATACGCT
CAACGCTTCCCTTACACAGAACT

contig 1823 CATTTTAGCTTCAAAAAGTAATACGGGTCTCAGATCGCTATTTAAGGTTTGTAGTACAAGCCAGAGTATTAAAGCCAAAAATATCTG**ATATATAT**
ATATATGAATTAACACTATCTGAATTTTCCGATAGAGCCTTTAAGCGGTAGATATGCTGAAATTTTACCTAGCATATTGATTCTCACAAATA
TACGAAAAAACATTTTTTTAGATGGGGTAGCGCTATTTTGTGAGCACCTTAGTACCAAGCACTACTTTCTTTTTGGAATTTAAGCACCCTCG
ACCCTTGTACACATTATAACT

contig 3312 GCGAAACTCAACGGTTTTGACCTCGAAAATTAACGAAAGAAAGCCTTTTGAAGTGGATTAGAAGTTATG**ATATATATATATATGTATATATA**
TATATGAGCCGCGTTATCCATCCCCCTTCGTTATTCATCCCCATTTAAGTGATTGGCTAATTAATAAAAATACTGAATGGCTAAAACCTC
GGGCTTGGTATTTAAATGTTTCGTGACGCCACTAAATTACAACACGAATTAAGTATTTTCTTCTGTACTGCGCGCTACAGGATAATGTTAATT
CTGAAGACTGCTCAAACGTTCA

contig 3521 AATTCGACTCTATGATCAAAGTAGGAAGAATTGGCTTCCAGATATTCTTCAAATACGTTAGTACGCGTACCGA**GATATATATATATAT**CGA
TGAAGTTTTTGGCCATGGGTCAGTAGTCATCATTTTCGAGTCAGATCATTTTTATAGGAAGCCAGCTTTTTTACAAAGAGTAAGCTGAGTCCAAA
GACTGTTTCGCCTTTCACAGATGCCACTGCACCATAAAAAGCCCTCTCCACTTTTGATTGTGCGTAAAATAAAAAGCTGCGACGGCAACAATGTC
GCTTTCAAAGCTTGCGCCTCTA

contig 4293 GAACGTTATATTCGTACCCTTTGAATTCGAGTACTTTTAACTATGTGGCTCAACCACAGCGTAACTCGGAACCTACTATGT**TATATATATATA**
TACCTCGAACACCTTTGCCTTGATCTTGCTAACAAGTGCTACCATGTAACGCATTTCGCGAAGGAGCTTATTGGAGGTTGGTCGTCGGACAAGG
ATGAAATGGCTAGCGGGGCGACATCGGTGAAGGAGGAGGAGTTTGAATTGCTTGAAGCATATTGAAAAGTGATATTATAATGAGAGCTCAA
ACGGATTCTTGCTTGCTACAGC

contig 5514 AAATAATGTATAACGAGTCCAAAAGATTATCCACTATATGTAAGTCCAGGCGCACCATACATTGAGCTTGATGGCAAGCTGCTTTTGTACAG
AATCGAAAATCTCAACATTACGCTTTTATAGAGGCATTCTTGCTCAAATAAGGAGA**ATATATATATATATAT**TCTTGATAAAATCCTTCTCTTAGA
AATACCGCCTTTCAAATCTCATTAGCTTAACTCCTTAACTTCAAGCAAGAGCTCAGTAGCTTAAAGTGTTTTGTGATTAGTATTCTACCAT
CGCAGGGCTCTCGATTGAAGT

contig 968 CTCGAAATGATCGAGCCGGATTGTATCTTTGCCGCATGCTCTAGAAAGAGTTTC**ATATATATATATATAT**GTACAGCTGTACAACAGAGATT
TTATCGCTGCACCGAAGAAGGTAGTTATACCGATGTCTAGCGTATAAAATTATGTCTACCGCGGCATATGTCATGCGGCTTTTACCGTACAAG
TGCTTATATATTTTAAAGATATAAGGTATGTAGCTTATCTGTGTCAGACGCCGATTGATATAATATATATTTAGTATGCTTTTTTGCCTTCTCATG
GGAATACGACATTTAAATCG

contig 6503 TTTAAATATCTGCGCTAAGAAACGAATGAGGCTTTCAATTTGCTATTTGCTAGCTACTAGTCATGTGGTGCA**ATATATATATATATAT**CTGAA
TATAAAAGCCACACTAGCTCGGCCTTAATCCTTGCATAATCATTATCACATCACATTAACGCTAGGAAAAGGTTGGGGTGACGCCCTCCTCTC
AAGCGCGGGGGCTAAATGCTCGCGCGCT

contig 4936 TATGGGTACGTGCCCTTCTTCTTCCGAATTATACTGTGGTACTATCAGCCGCTCGTACATGCTTTGTCTGCAATAAACACAACGCCAAAATGT
GAGACTCAAGGTTTCGAGGATATATTTATATATGAACATTGCCCACTGAGG**ATATATATATATATATAT**GAACATTGCCCACTTAAATGCAGAGT
GCGCCGACATCGTCTCTGAATGATCGATAATACACGCCGAAACGTGCTTTTTTCAGGACAGTAAATTGTCCGATAAAATTGTGCTCAACTTTC
TATAAAAACCTGAATTTCTAT

contig 297 TCTCTGTCCCTAGGAACGCGAATTAAGTGAAATTTGCGCGGAAAGATAGGGTA**ATATATATATATATATAT**TGTCAAAAAGATCAGAGATCA
TGGATCTATACTAGTACATGCTCTGCCGAAAGCAGTCGAGGTCGCCTAAAAGCTCACAAGTTCTTGAGTAGAGTTCAAGAGACGCCGAT
CGCGAGGAACATCAAGGCAAAAAACACTTGGCAGTACTGACACAGTTTTCTCGTTGCGAATTCGTTCTAGAATGGAAGGTGTACCCCAAATT
GACGAGTGAATGATGGATATAACCG

contig 332 GAGCAGTAATTCTGCGGGTTGAAAATTATAGTTTCTGTAATAGATTTCTTGATTGGATAAAGTCTTTTGCGAAGATGCGGCAGCAAATGAAGG
CGTTGTCAAATGTTAACGGTAGA**ATATATATATATATATAT**TATTTTAAAGTAAATCTCGTGAAATTACTAAATTATATCGCTACTAGCCACC

GTGGAATACCTGACCCTTCCTGGTTGGATTTAGTAGTAGCCGTCGTTCAAATCCAGCGCACCACTATAGGACAAGTTATAATGCAGCATGTAT
TATTGTAACGAATGTTTGTGC

contig 1957 CAAATTACATTTGGTGCATGATGACTTTATCTAAAAGTCGTACC**ATATATATATATATATATAT**TAAGAGTCGTTCCGTGAAGATCGGGTAAT
CTAGCTCAACGTGGAAGTTATGTAATTAGATGCGCAGGGCGAAGCAAACCTCCTGCTTTGAAAACCATATTTTTTCGTAGAGGACAAGCTTGGC
ATGCTTTTTTCGAATTTGCGCCTATAATCTTGTGGCTAATTTGTCTGAAGATTCTCCCGATTTTTCTTGCAGATTACCCTGAGAGTTCCGATAGC
ATGGCTGGCGTAAGAGTCAAC

contig 1020 CTTTTTTGTACAAACGCCATGTAGAGCCTAAATTGCGTCAGCAGACACCTGAATGCT**TATATATATATATATATATA**GTCAGGAGCCCCAAGG
TCATAGTCAGCCACTCCAAGAAAGCATACAGCTCTTAGTCCTGACCTATTATAGCTATTACACACTCTCGCATGAAAAGTTGATAATCCTCGT
CGACTGTGTGGAGTGCATTGCACACTGTACATTAAGCAATGTTCTTTTGTGGTAATACTGGCGTCTGTGTCGGTATTGCTGCCGTTTTTGGCCT
ACTATATGCGTGCATGATGCG

contig 1075 TGTATCAAATTATACTCACCCCTTTTATCGAACAGAACGAACCTTGTCTCCAATTTTTATATAA**ATATATATATATATATATAT**TGGACGAAT
GCAATTCATTTTTTCCCTTGTGACTACTTTGCACTTAGTCTAATAATTGTTTTTATTAAAGACTTTTCTTGGTCAAAGACAAAGAATCTAAGC
CTGTCTTCACTTATTGCATTAGCATTTGTATTTATCCTATGGTGCCTAAGCCTGTTTATATATAAACGTATGTGCATGAGTAGTTTTTTAGTTT
TCACTCAATACAAACATA

contig 12349 GCTATAAGAGGCACGGCTCAATTGGTAACAAGCGCCCGTATTTAGCTGACTGGTTCTCGAAGAAGCTTTTTTCTGGTGATTG**ATATATATATA**
TATATATATATGTATATATAGAGTCATAGGGATACATACTAAGTAAAGGAATTGAGTCGAATTTGACATCAGACGAACCTTATCAAATCAT
TGGTTCGGCTCTAATGAAAATTGATCAGATTGTGGTATTAGGTGACAGAGTGTGGTGTGCTCCCGAAACTCCTGACGGAGACTCTGCAATACT
TGAGATTAGTATCAGCAATCAG

Tabela 1.8. Dados de amplificação de produtos de PCR dos 34 locos microssatélites de *Plasmopara viticola*, mostrando o número de repetições do SSR, número do *contig*, cobertura média no *contig*, comprimento do *contig*, iniciadores de PCR - *primers* (direta e reversa), motivo de repetição, temperatura de anelamento, tamanho esperado dos fragmentos e variação alélica.

Marcador	Nº repetições SSR	Nº do Contig	Cobertura média Contig	Tamanho do Contig	Primer Sequência direta	Primer Sequência reversa	Motivo	TA °C	Tamanho esperado do fragmento (pb)
PvCNG1	6	600	125	12957	CAAGTCAAGGCCTCTTTC	TGCTCAGTGATTTGCTCC	(AG)6	58	90
PvCNG2	10	1075	138	40245	ATACTCACCCCTTTTATCG	CAAAGTAGTCACAAGGGAA	(AT)10	58	114
PvCNG3	6	429	125	19334	TTGACGAGACGGATGATTT	TGGCGTTAGGTGATTATGG	(AT)6	58	242
PvCNG4	7	1725	240	23561	CGTACGCTTTTTGTAATGGA	GTTTTGGTTGACACTGTTG	(AG)7	58	99
PvCNG5	7	3521	133	14228	TCAAAGTAGGAAGAATTGGC	CTGACTCGAAATGATGAC	(AT)7	58	119
PvCNG6	7	1644	139	8724	GGACGTCTGAGAATAAAGGAA	TAAAGTCGTGAAGGCAAATG	(AG)7	58	235
PvCNG7	6	455	110	19347	GATAAACTAGACCCATTGC	TCATTCACCTTTCCCGCA	(AT)6	58	100
PvCNG8	9	1957	143	3706	TGGTGCGATGATGACTTT	GCCTGCGCATCTAATTAC	(AT)9	58	120
PvCNG9	6	1395	117	13047	TCGATTCTGACGTTGATTG	GAGAGAGATTGCATGAGC	(AT)6	58	242
PvCNG10	13	43	125	7764	GCTTCTGCCTTCTTCCTTT	TCTTGTCATGGTGTGTA	(AG)6	58	102
PvCNG11	7	3312	130	19231	AACGGTTTTGACCTCGAA	TAACGAAGTGGGGGGATG	(AT)7	58	119
PvCNG12	6	24	12679	41207	ACCACGTAACATTACACCA	AAAGAGTATCAGGAGCAAG	(AT)6	58	242
PvCNG13	10	1020	187	34760	GTACAAACGCCATGTAGA	TGGAGTGGCTGACTATGA	(AT)10	58	103
PvCNG14	6	40219	122	1389	CGTCCGAAAAACTTATTGC	GGGCCATTGGTGTGATA	(AG)6	58	119
PvCNG15	6	3	128	11558	CCGACTCCCCTAAATTCT	TTTTGCTCTCTGGTTGGCTT	(AT)6	58	240
PvCNG16	6	544	138	13030	AGTCGCAACAGTTCGTTA	GGATGCGTACATTGCTAAGA	(AC)6	58	104
PvCNG17	6	11832	117	2432	AAGCTTCAAGTCGCCATC	CATCCTTCAGCTCAATAGAC	(AG)6	58	119
PvCNG18	7	1342	137	25312	GTACGCAGATCGATGATT	CCGAGACATAACAAGAGAT	(AT)7	58	227
PvCNG19	6	30540	148	1045	GCGTTCTCATTTCCTCAA	CAAGCCTCTTCTGTGCAA	(AC)6	58	107
PvCNG20	7	822	138	18216	TGACTCTTCAACCACTTCG	ACAATACCTTTGCAGCAC	(AT)7	58	115
PvCNG21	7	5514	134	1914	ACGAGTCCAAAAGATTATCC	ACTGAGCTCTTGCTTGAA	(AT)7	58	231

Tabela 1.8. Continuação

Marcador	Nº repetições SSR	Nº do Contig	Cobertura média Contig	Tamanho do Contig	Primer Sequencia direta	Primer Sequencia reversa	Motivo	TA °C	Tamanho esperado do fragmento (pb)
PvCNG22	8	968	150	12243	GAGCCGGATTGTATCTTTG	ATAACTACCTTCTTCGGTG	(AT)8	58	108
PvCNG23	8	6503	164	14242	GCGCTAAGAAACGAATGA	TGCAAGGATTAAGGCCGA	(AT)8	58	118
PvCNG24	11	12349	109	1136	GCACGGCTCAATTGGTAA	ACAAACACTCTGTCACCT	(AT)10	58	232
PvCNG25	7	190	135	7835	AGTATAGAAAGCCCAGCAT	TGTGCACGGTAGAAGGTA	(AT)7	58	114
PvCNG26	7	1823	154	10214	CAAAAGTAATACGGGTCTCA	CGCTACCCCATCTAAAAAAA	(AT)7	58	206
PvCNG27	8	4936	359	9429	CCCTTCCTTCTTCCGAAT	CGTTTCGGCGTGTATTAT	(AT)8	58	218
PvCNG28	9	297	107	8055	GGAACGCGAATTAAGTGA	CTTTCGGCAGGACATGTA	(AT)9	58	114
PvCNG29	6	347	136	61615	CGCCGGGTAAAATTGTCTAA	ACGTAGAAGAGGAGGAGT	(AT)6	58	195
PvCNG30	6	118	183	31335	GGATCGTTTGTTTTGGTCTG	TGGGTTGACGGTGAAATG	(AT)6	58	216
PvCNG31	7	4293	149	939	GTACCCTTTGAATTCGAGT	TGTTAGCAAGATCAAGGC	(AT)7	58	114
PvCNG32	9	332	155	11522	CTGCGGGTTGAAAATTATAG	AACGACGGCTACTACTAAA	(AT)9	58	222
PvCNG33	6	214	138	38643	GGAGCAAAGTTACAGAACGA	GCCAAGACCACAGAGACA	(AT)13	58	213
PvCNG34	6	629	140	41000	GATGACTGATGAGCGCTA	TCTGAGAGAGAACGGCAA	(AC)6	58	249

1.3.3 Validação dos novos marcadores microssatélites desenvolvidos para análise genética de populações de *Plasmopara viticola*

Os 34 novos marcadores microssatélites foram avaliados para detecção de polimorfismo de DNA em isolados de *P. viticola*, juntamente com outros dez microssatélites largamente usados em estudos de genética de população do patógeno (Gobbin *et al.*, 2003a; Matasci *et al.*, 2010; Delmotte *et al.*, 2006) (Tabela 1.9). Para esta análise, foram usados todos os 92 isolados de *P. viticola* (Tabela 1.1).

Todos os 44 marcadores apresentaram sucesso de amplificação de alelos. O tamanho esperado dos alelos no isolado controle para cada um dos 34 novos marcadores foi confirmado (Tabela 1.9). Entre os novos marcadores, 26 dos 34 apresentaram polimorfismo na amplificação de alelos dos 92 isolados de *P. viticola* e 8 foram monomórficos (PvCNG01, PvCNG03, PvCNG04, PvCNG06, PvCNG16, PvCNG17, PvCNG25 e PvCNG30). Estes resultados representam 100% de sucesso na taxa de amplificação alélica e de 76,5% na obtenção de marcadores polimórficos, em condições não otimizadas para locos microssatélites. Dois dos marcadores polimórficos apresentaram falhas de amplificação (PvCNG24 e PvCNG33), necessitando de pequenos ajustes para otimização. O loco PvCNG33, por exemplo, apresentou 7 alelos nos testes de genotipagem e o maior PIC entre todos os marcadores testados, e pode ser trabalhado para uso em rotina na análise genética de *P. viticola*. Entretanto, nenhuma tentativa de otimização foi realizada para estes dois locos visto que o rendimento de marcadores informativos foi elevado.

Tabela 1.9. Parâmetros genéticos de 44 marcadores microssatélites (34 desenvolvidos neste estudo e 10 selecionados da literatura) utilizados na genotipagem de 92 isolados de *P. viticola* coletados em regiões produtoras de uva do Brasil.

Nº de marcadores	Origem	Marcador	Alelo c/ maior frequência	Nº de genótipos	Nº de isolados	No. of obs.	Nº de alelos	Diversidade gênica	Heterozigosidade observada (Ho)	PIC
1	novo	PvCNG01	1,0000	1	92	68	1	0,0000	0,0000	0,0000
2	novo	PvCNG02	0,7093	7	92	86	4	0,4405	0,4651	0,3835*
3	novo	PvCNG03	1,0000	1	92	67	1	0,0000	0,0000	0,0000
4	novo	PvCNG04	1,0000	1	92	69	1	0,0000	0,0000	0,0000
5	novo	PvCNG05	0,6467	10	92	92	5	0,5200	0,5870	0,4678*
6	novo	PvCNG06	1,0000	1	92	75	1	0,0000	0,0000	0,0000
7	novo	PvCNG07	0,9318	6	92	88	4	0,1299	0,0795	0,1268
8	novo	PvCNG08	0,5870	9	92	92	7	0,5368	0,7500	0,4547*
9	novo	PvCNG09	0,9011	7	92	91	6	0,1845	0,1758	0,1787
10	novo	PvCNG10	0,8125	4	92	80	4	0,3091	0,0250	0,2686
11	novo	PvCNG11	0,5407	7	92	86	7	0,5996	0,2907	0,5335*
12	novo	PvCNG12	0,8750	7	92	56	6	0,2293	0,1429	0,2215
13	novo	PvCNG13	0,7889	4	92	90	3	0,3544	0,2444	0,3252*
14	novo	PvCNG14	0,5471	2	92	85	2	0,4956	0,9059	0,3728*
15	novo	PvCNG15	0,8956	7	92	91	7	0,1950	0,1209	0,1904
16	novo	PvCNG16	1,0000	1	92	76	1	0,0000	0,0000	0,0000
17	novo	PvCNG17	1,0000	1	92	78	1	0,0000	0,0000	0,0000
18	novo	PvCNG18	0,8581	8	92	74	8	0,2579	0,2568	0,2495
19	novo	PvCNG19	0,9877	2	92	81	2	0,0244	0,0000	0,0241
20	novo	PvCNG20	0,8430	9	92	86	6	0,2770	0,1860	0,2596
21	novo	PvCNG21	0,8663	13	92	86	12	0,2472	0,1977	0,2437
22	novo	PvCNG22	0,5707	8	92	92	7	0,5167	0,8261	0,4140*

23	novo	PvCNG23	0,3598	12	92	82	7	0,7417	0,9268	0,6982*
24	novo	PvCNG24	0,6800	8	92	25	7	0,5056	0,1600	0,4757
25	novo	PvCNG25	1,0000	1	92	76	1	0,0000	0,0000	0,0000
26	novo	PvCNG26	0,9398	4	92	83	3	0,1147	0,0964	0,1110
27	novo	PvCNG27	0,8667	8	92	90	6	0,2410	0,2000	0,2291
28	novo	PvCNG28	0,6919	12	92	86	9	0,4659	0,5000	0,4127*
29	novo	PvCNG29	0,8989	7	92	89	6	0,1877	0,1910	0,1808
30	novo	PvCNG30	1,0000	1	92	72	1	0,0000	0,0000	0,0000
31	novo	PvCNG31	0,9167	6	92	90	6	0,1564	0,0333	0,1509
32	novo	PvCNG32	0,6053	11	92	76	7	0,5755	0,7105	0,5320*
33	novo	PvCNG33	0,4028	10	92	36	7	0,7423	0,7500	0,7065
34	novo	PvCNG34	0,9716	4	92	88	3	0,0556	0,0114	0,0548
35	*	BER	0,5402	4	92	87	3	0,5578	0,0690	0,4682*
36	**	BER NEW	0,7733	6	92	86	4	0,3739	0,1512	0,3401*
37	*	ISA	0,5078	2	92	64	2	0,4999	0,9844	0,3749
38	**	ISANew	0,5584	8	92	77	5	0,5939	0,6623	0,5335*
39	***	Pv13	0,9348	2	92	92	2	0,1219	0,0000	0,1145
40	***	Pv14	1,0000	1	92	73	1	0,0000	0,0000	0,0000
41	***	Pv17	0,5057	8	92	87	7	0,5836	0,8851	0,5003*
42	***	Pv31	0,8274	5	92	84	4	0,3002	0,0833	0,2794
43	***	Pv39	1,0000	1	92	90	1	0,0000	0,0000	0,0000
44	***	Pv7	0,6644	5	92	73	4	0,4706	0,2603	0,3928*
Mean			0,7956	6	92	79	4	0,2865	0,2711	0,2561

— Marcadores microssatélites de *P. viticola* publicados (*Gobbin *et al.*, 2003; ** Matasci *et al.*, 2010; *** Delmotte *et al.*, 2006).

Marcadores em negrito apresentaram maior Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) e foram selecionados para análises de diversidade genética e estruturação dos 92 isolados de *Plasmopara viticola*.

Entre os 10 marcadores de uso amplo na análise de isolados de míldio testados no presente estudo, dois (Pv14 e Pv39) não apresentaram polimorfismo na amostra de 92 isolados de *P. viticola* (Tabela 1.9). Os demais apresentaram PIC variando entre 0,11 e 0,53, e número de alelos entre 2 e 7. Os 26 novos marcadores polimórficos apresentaram PIC variando entre 0,055 a 0,71, enquanto o número de alelos variou entre 2 e 12. Entre os cinco marcadores que apresentaram o maior PIC (Conteúdo de Informação de Polimorfismo), quatro foram desenvolvidos no presente trabalho (PvCNG33, PvCNG23, PvCNG11, PvCNG32) e apenas um (ISANew) já vinha sendo usado na genotipagem de míldio (Matasci *et al.*, 2010).

Os dados obtidos no presente estudo estimulam a busca de novos marcadores moleculares para análise da diversidade de *P. viticola*, oferecendo uma nova bateria de marcadores com alto conteúdo informativo, qualidade e robustez para estudos do patógeno (Tabela 1.9). Estes dados indicam que há um grande potencial para desenvolvimento de novos marcadores para *P. viticola*, adequados às análises populacionais do patógeno.

O emprego de sequenciamento NGS no desenvolvimento de marcadores microssatélites (e SNPs) possibilita a substituição de estratégias tradicionais, como a construção e sequenciamento de bibliotecas enriquecidas de sequências microssatélites para desenvolvimento de SSRs (Ritschel *et al.*, 2004). Para este propósito, o sequenciamento NGS é menos intensivo em tempo e trabalho, e mais eficiente no rendimento final de marcadores polimórficos, conforme vem sendo observados em diferentes espécies (Silva *et al.*, 2013).

1.3.4 Caracterização genotípica de isolados de *Plasmopara viticola* coletados em regiões produtoras de uva do Brasil

Os testes com os 44 marcadores microssatélites em 92 amostras diversas do patógeno possibilitaram a seleção de quinze marcadores com elevado Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC > 0,3). Esta bateria foi constituída por marcadores com alto potencial de revelar polimorfismo entre isolados do patógeno (Tabela 1.10). Os marcadores selecionados foram: **PvCNG2, PvCNG5, PvCNG8, PvCNG11, PvCNG13, PvCNG14, PvCNG22, PvCNG23, PvCNG28, PvCNG32**, BER, BERNew, ISANew, Pv7, Pv17. Entre os 15 marcadores da bateria, 10 foram desenvolvidos no presente trabalho (negrito), e cinco são marcadores de uso corrente na genotipagem de isolados de *P. viticola* (Tabela 1.10).

O padrão de amplificação observado nos eletroferogramas dos 15 marcadores é apresentado na Figura 1.2. O objetivo da análise foi estudar a diversidade genética dos isolados, detectar a potencial de existência de grupos ou subpopulações do patógeno, analisar a correlação entre a origem geográfica dos isolados e variabilidade do míldio, assim como a independência entre a classificação em subpopulações do patógeno e a espécie de videira.

Entre os quinze locos selecionados a heterozigosidade observada (H_o) variou entre 0,06 a 0,91 (média = 0,39) e a Diversidade Gênica de 0,35 a 0,59 (média = 0,45). Os maiores valores estimados de H_o foram de 0,56, 0,66, 0,80 e 0,91 para os locos PvCNG22, ISANew, Pv17 e PvCNG14, respectivamente (Tabela 1.10). O Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC) de cada marcador variou entre 0,31 e 0,53 para os locos PvCNG8 e ISANew, respectivamente (média = 0,38). O número de alelos nos locos analisados variou de dois a sete (média = 4,20), totalizando 63 alelos entre os 92 isolados de *P. viticola*.

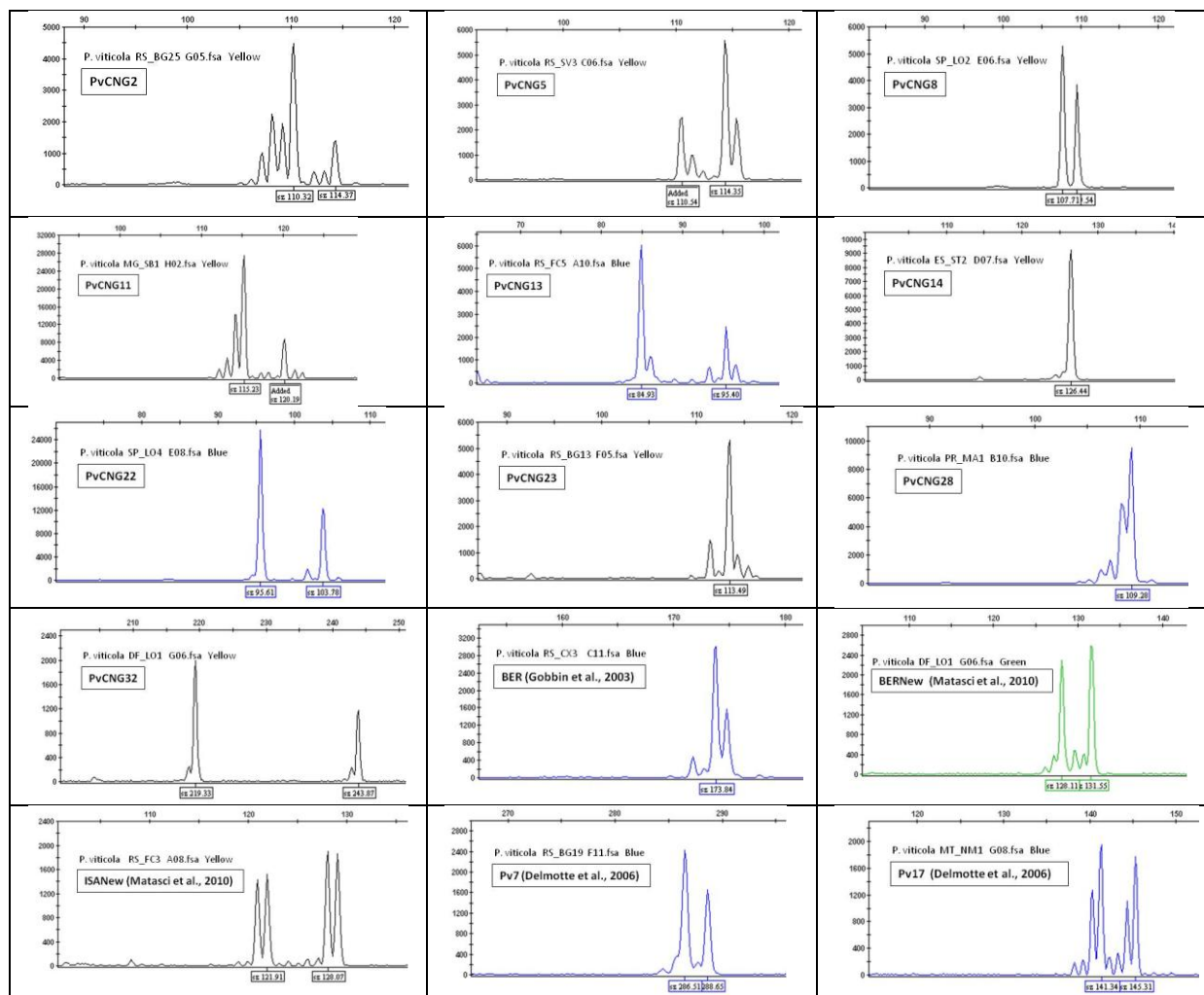


Figura 1.2. Eletroferogramas ilustrando o padrão de amplificação dos 15 locos microssatélites empregados na genotipagem de 92 isolados de *Plasmopara viticola* coletados nas principais regiões produtoras de uva do Brasil.

Dez alelos foram compartilhados pelos 92 isolados analisados: 108pb (PvCNG2 e PvCNG8), 109pb (PvCNG23 e PvCNG28), 110pb (PvCNG2 e PvCNG8), 111pb (PvCNG5, PvCNG23 e PvCNG28), 113pb (PvCNG5 e PvCNG23), 114pb (PvCNG2 e PvCNG11), 115pb (PvCNG5, PvCNG14, PvCNG23 e PvCNG28), 116pb (PvCNG8 e PvCNG11), 121pb (PvCNG28 e ISANew) e 127pb (PvCNG14 e ISANew). O alelo mais comum encontrado foi 115 pb (PvCNG5) com frequência de 0,79. A Figura 1.3 apresenta a distribuição de frequências alélicas em cada um dos 15 locos analisados.

Expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foram significativas em 12 dos 15 locos analisados (p -value $<0,05$), com exceção dos locos PvCNG8, PvCNG23 e PvCNG32 (Tabela 1.10). Para a maioria dos locos analisados, portanto, há evidência de que os 92 isolados de míldio não constituem uma população panmítica, ou alguma força evolutiva (ex. deriva, migração) que altera o equilíbrio de frequências alélicas nestes locos.

Tabela 1.10. Estimativas de parâmetros genéticos de 15 locos microssatélites desenvolvidos para *Plasmopara viticola*, usados na genotipagem de 92 isolados de *P. viticola*, apresentando o valor de frequência do alelo mais comum no loco, número de alelos amplificados em cada loco (Na), a variação alélica observada, diversidade gênica (DG), Heterozigosidade observada (Ho), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) e valor de significância (p -value) para equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).

Loco	Alelo com maior frequência	Na	Variação alélica	DG	Ho	PIC	EHW p_value
PvCNG2	0,77	4	108-114	0,37	0,26	0,33	0,00
PvCNG5	0,79	5	111-119	0,36	0,34	0,33	0,00
PvCNG8	0,78	4	108-118	0,35	0,31	0,31	0,17
PvCNG11	0,64	4	94-120	0,49	0,06	0,40	0,00
PvCNG13	0,79	3	85-95	0,35	0,24	0,33	0,00
PvCNG14	0,55	2	115-127	0,50	0,91	0,37	0,00
PvCNG22	0,70	3	96-106	0,43	0,56	0,35	0,01
PvCNG23	0,71	4	109-115	0,43	0,46	0,37	0,02
PvCNG28	0,74	5	107-121	0,40	0,39	0,34	0,00
PvCNG32	0,73	7	216-244	0,45	0,45	0,42	0,08
*BER	0,54	3	171-175	0,56	0,07	0,47	0,00
**BERNew	0,75	4	128-138	0,40	0,14	0,36	0,00
**ISANew	0,56	5	121-129	0,59	0,66	0,53	0,00
***Pv7	0,64	3	286-308	0,48	0,17	0,39	0,00
***Pv17	0,56	7	141-155	0,56	0,80	0,47	0,00
Média	0,68	4,2	-	0,45	0,39	0,38	-

Marcadores microssatélites de *P. viticola* publicados (*Gobbin *et al.*, 2003; ** Matasci *et al.*, 2010; *** Delmotte *et al.*, 2006)

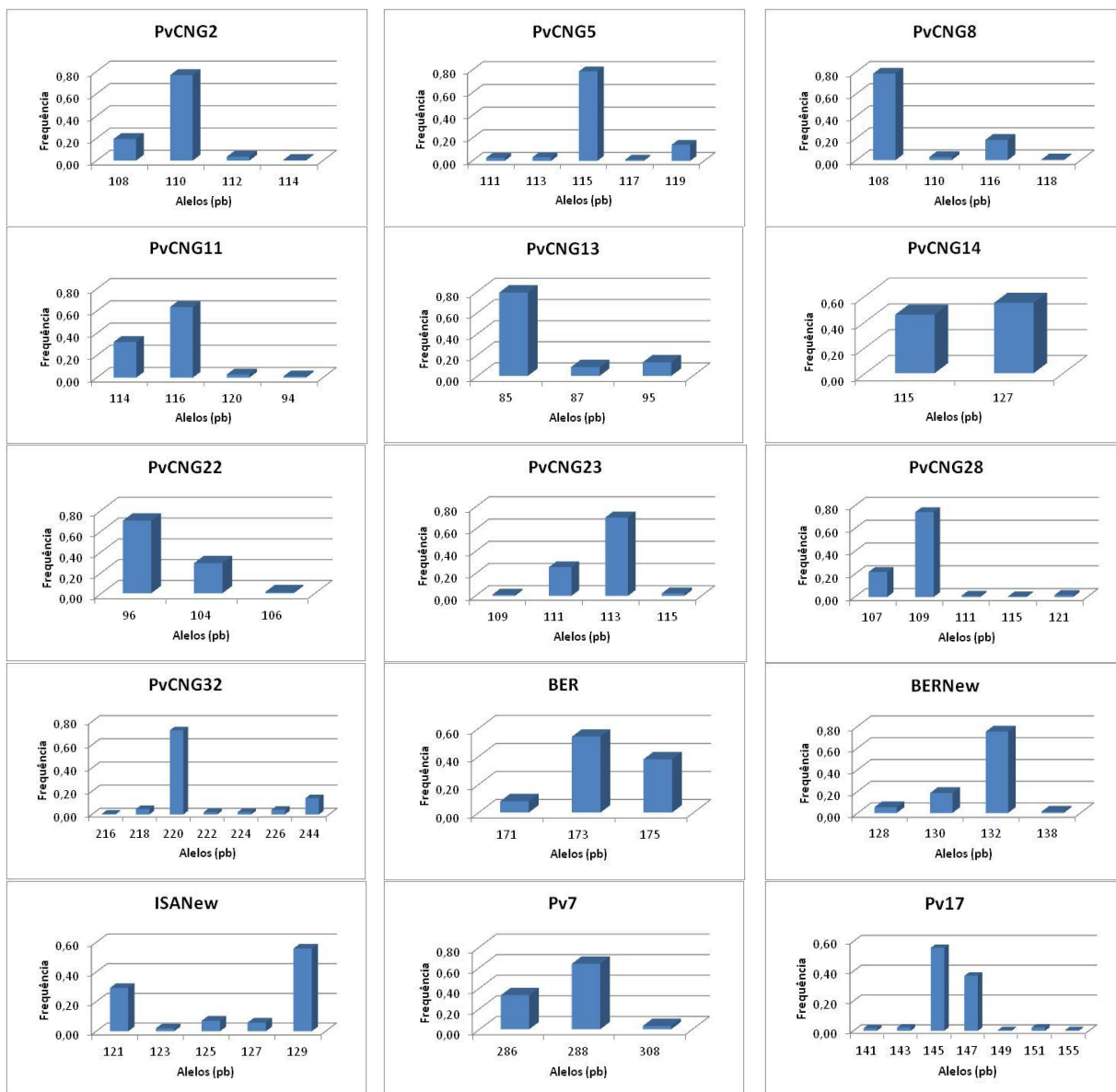


Figura 1.3. Distribuição de frequência alélica em cada um dos 15 locos microssatélites selecionados para genotipagem de 92 isolados de *Plasmopara viticola*.

1.3.5 Estrutura genética de populações de *Plasmopara viticola*

A análise do padrão de estruturação populacional dos isolados de *P. viticola* foi realizada através de simulações para estimar o valor de ΔK (Evanno *et al.*, 2005) para os 92 isolados de míldio (Figura 1.4). A análise de polimorfismo de DNA indica que os isolados de *P. viticola* genotipados no presente estudo estão agrupados em três subpopulações distintas. Estimativas de coeficiente de inclusão (Q), baseadas em vetores de ancestralidade, possibilitaram a inclusão dos 92 isolados em uma das três subpopulações, denominadas PvG1, PvG2 e PvG3. A representação dos valores de Q é apresentada na Figura 1.5. As estimativas do coeficiente de inclusão (Q) de cada amostra, em cada uma das três subpopulações detectadas, permitem inferir a relação entre a estruturação observada e a distribuição das amostras de *P. viticola*. A porcentagem de isolados de *P. viticola* alocados nos três grupos foi de 24,7% (PvG1), 63,2% (PvG2) e 12,1% (PvG3) (Figura 1.5).

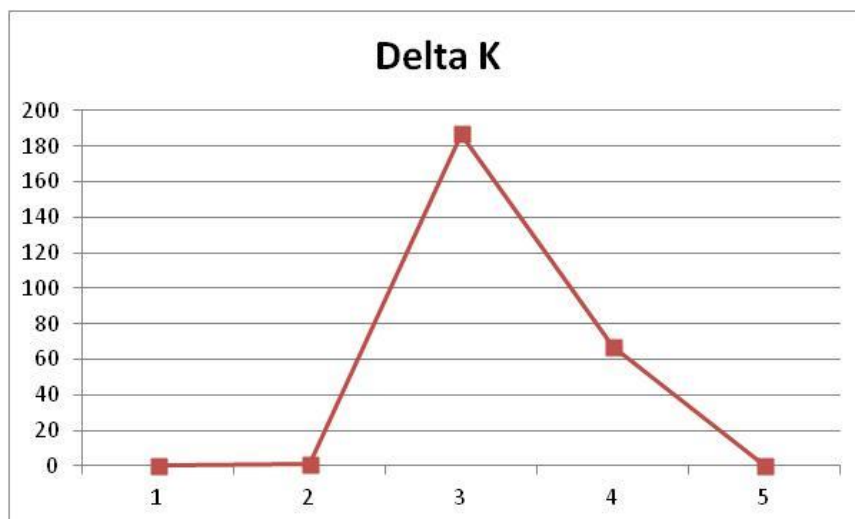


Figura 1.4. Valores de ΔK (eixo Y), com seu valor modal (eixo X) detectando um K de 3 grupos ($K = 3$), indicando que os isolados de *Plasmopara viticola* estão divididos em três subpopulações.

Os valores médios de diferenciação genética (F_{ST}) calculados para as três subpopulações de *P. viticola* foram: $(F_{ST})_{PvG1} = 0,56$; $(F_{ST})_{PvG2} = 0,25$ e $(F_{ST})_{PvG3} = 0,24$. O coeficiente de fixação de Wright (F_{ST}) estima o grau de estruturação de uma população, medindo o nível de isolamento das mesmas, separando-as em subpopulações. Valores de F_{ST} acima de 0,25 indicam uma diferenciação muito grande entre as subpopulações detectadas. Embora as subpopulações possuam alelos em comum, parte significativa da diversidade genética é encontrada dentro dos três grupos detectados. Isto significa que as frequências alélicas dentro de cada uma das populações tendem a ser diferentes.

A análise de frequências alélicas dentro de cada subpopulação indicou, realmente, que alguns locos microssatélites são mais eficientes do que outros na diferenciação das mesmas (Figura 1.6). No loco marcador BERNew, por exemplo, o alelo 130 apresenta frequência acima de 80% na subpopulação PvG1, enquanto o alelo 132 está praticamente fixado na população PvG2. Este único marcador praticamente discrimina os isolados das subpopulações PvG1 e PvG2. O marcador BERNew, contudo, não é eficiente na discriminação de isolados da subpopulação PvG3 de isolados das demais subpopulações.

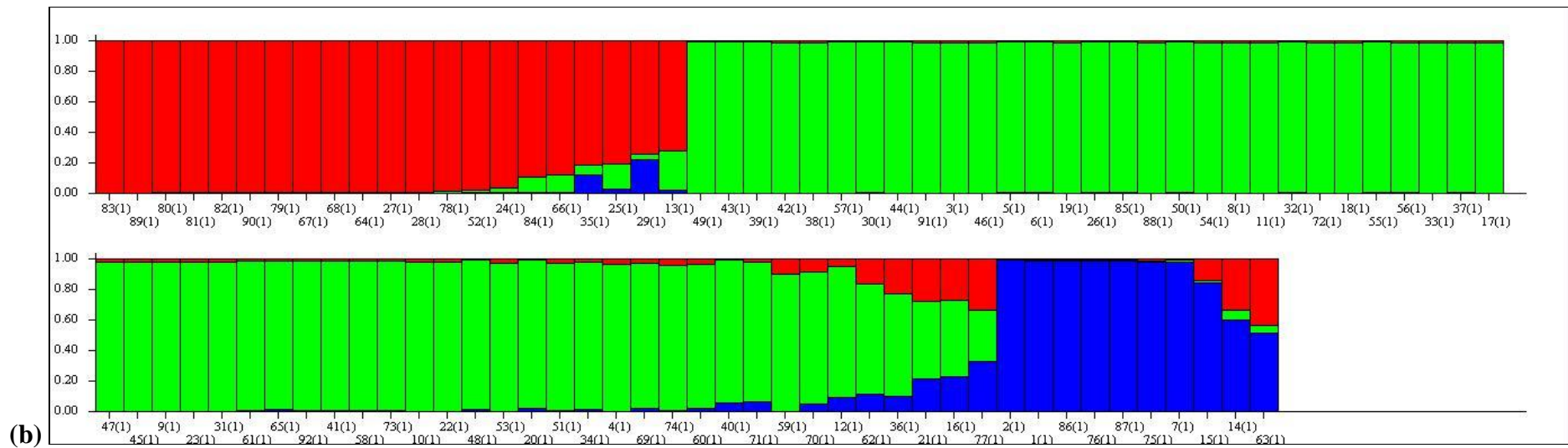
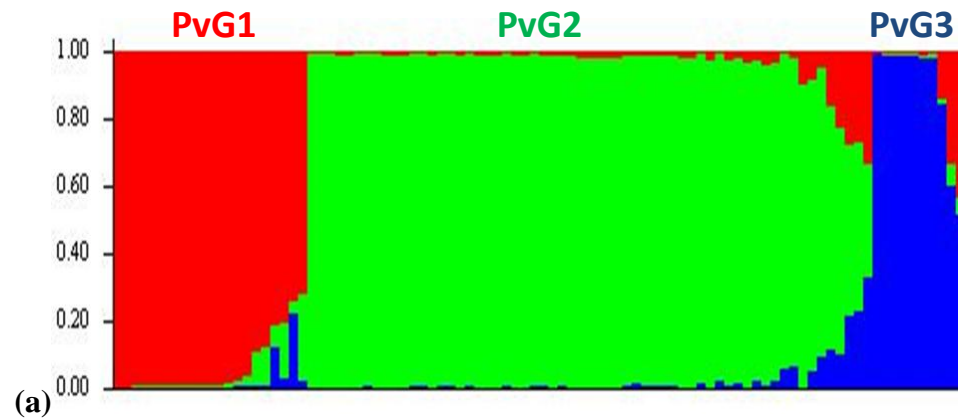


Figura 1.5. Distribuição dos 92 isolados de *Plasmopara viticola* em três subpopulações do patógeno, de acordo com genótipos multiloco obtidos com uma bateria de 15 marcadores microssatélites. (a) Distribuição geral dos isolados nas subpopulações PvG1 (vermelho), PvG2 (verde) e PvG3 (azul) com base nos valores estimados de vetores de ancestralidade ou coeficiente de inclusão (Q); (b) Codificação dos isolados em cada população. As barras coloridas representam a probabilidade de inclusão (Q) de cada isolado nas diferentes subpopulações.

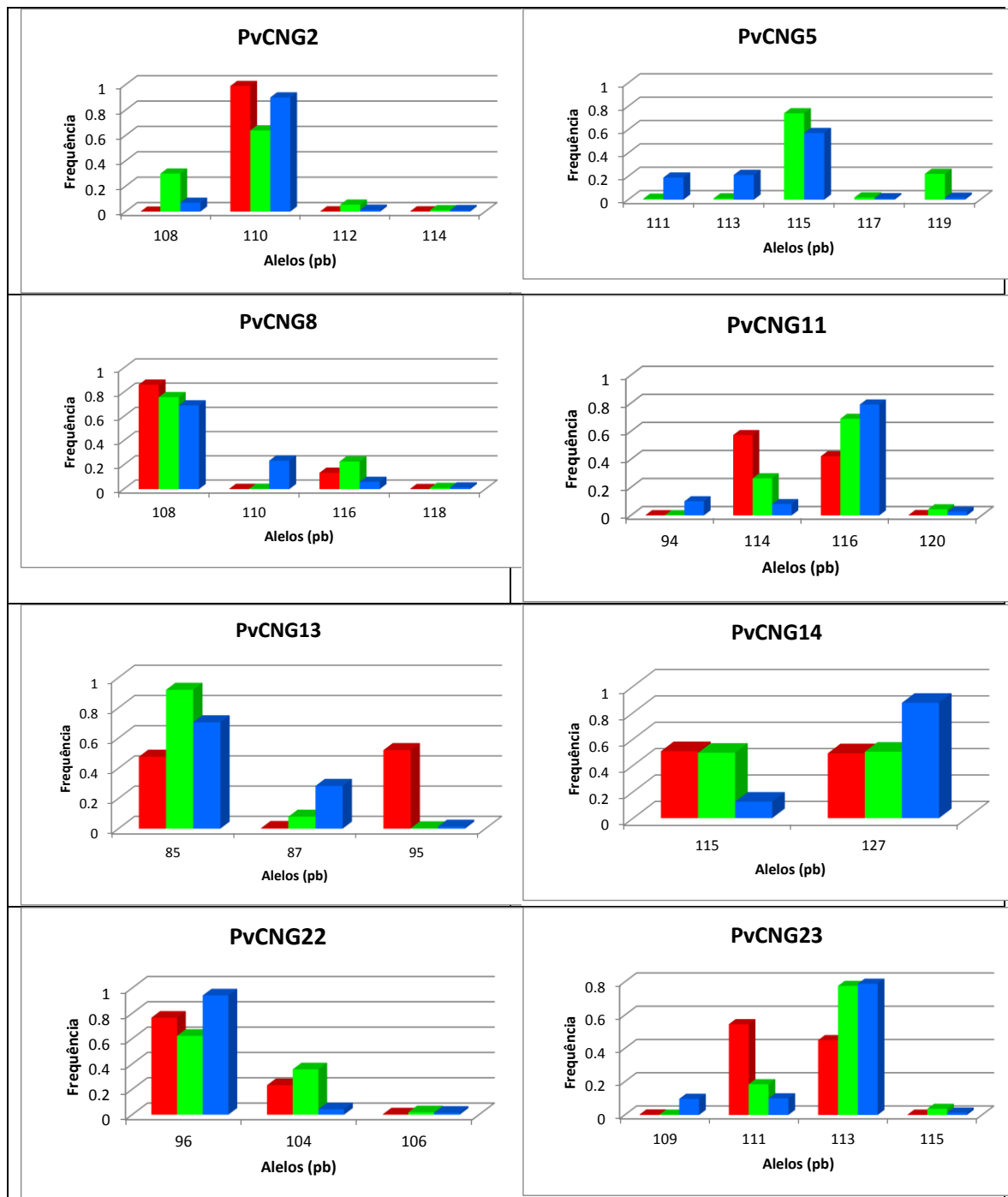


Figura 1.6. Distribuição de frequência de alelos em cada um dos 15 locos microssatélites, estimada de acordo com a alocação dos isolados nas três subpopulações de *Plasmopara viticola* (PvG1= vermelho, PvG2= verde e PvG3= azul).

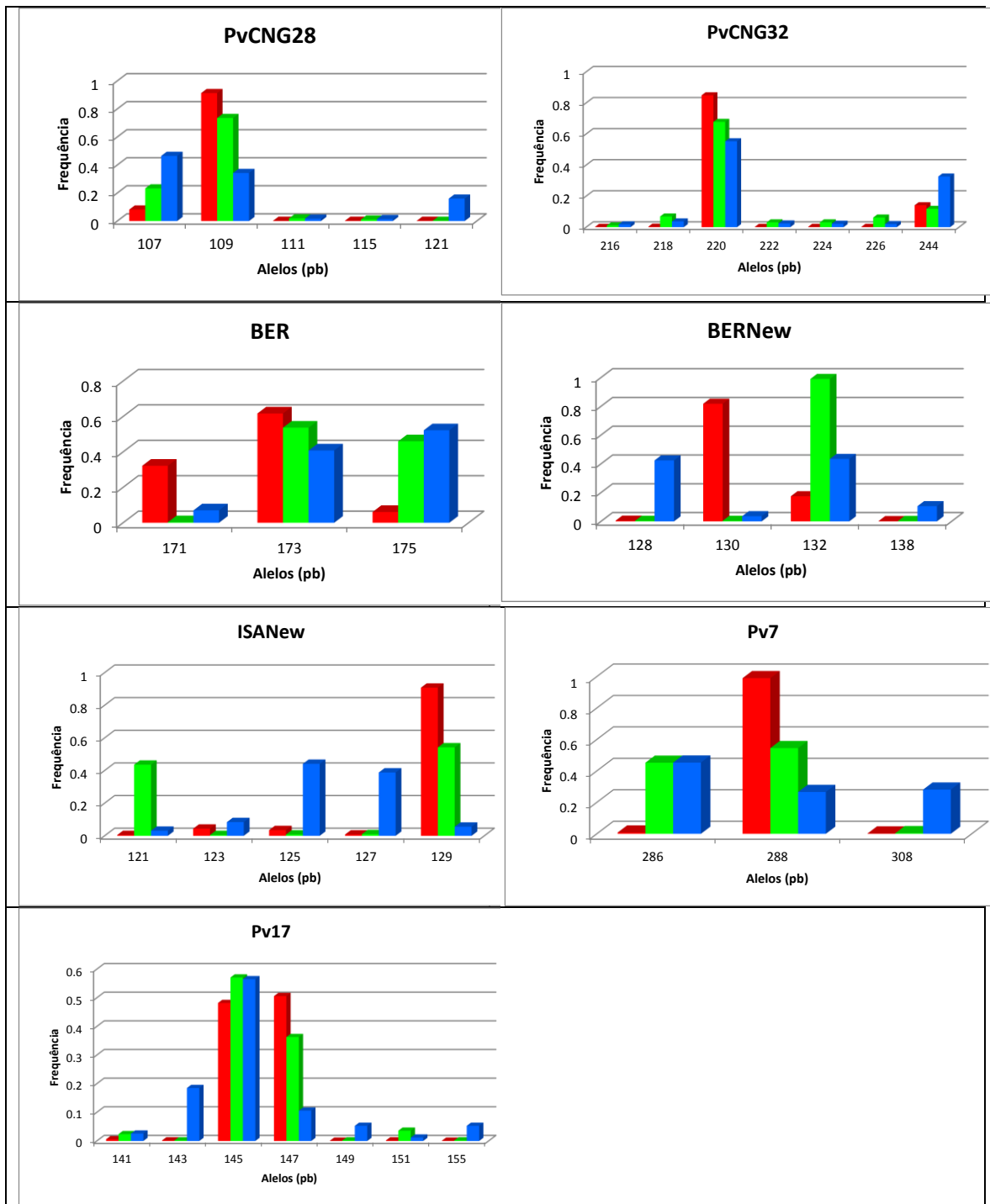


Figura 1.6. Continuação

Uma matriz diagonal de distâncias genéticas par-a-par foi submetida à análise de agrupamento pelo método UPGMA e uma matriz de distâncias genéticas entre os 92 isolados foi construída (Rohlf, 2000). Uma análise de coordenadas principais (Jackson, 1991) foi realizada e os valores das primeiras coordenadas (*eigenvalues*) plotados para detecção de diferenças individuais e agrupamentos de isolados de *P. viticola* (Figura 1.7). Os resultados também indicam que os 92 isolados de *P. viticola* podem ser separados em três grupos distintos.

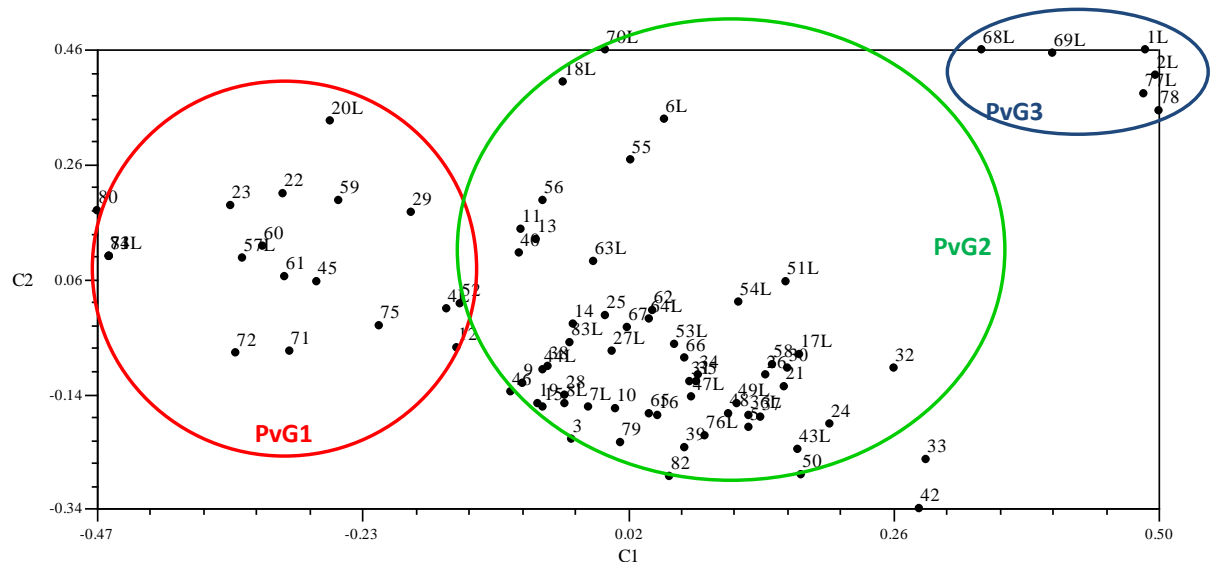


Figura 1.7. Análise de coordenadas principais para detecção de diferenças genotípicas individuais e de agrupamentos de isolados de *Plasmopara viticola* coletados no Brasil. Os isolados podem ser discriminados em três subpopulações do patógeno (PvG1, PvG2 e PvG3). Os isolados coletados de *Vitis labrusca* receberam a letra “L” após o número da amostra.

Até o momento, a maior parte das análises de estrutura de populações de *P. viticola* tem sido feita com apenas 4 marcadores (Tabela 1.11) (Gobbin *et al.*, 2003a, Gobbin *et al.*, 2003b; Rumbou & Gessler, 2004; Gobbin *et al.*, 2005; Gobbin *et al.*, 2006; Delmotte *et al.*, 2006; Scherer & Gisi, 2006; Koopman *et al.*, 2007; Rumbou & Gessler, 2007; Matasci *et al.*, 2010). Para avaliar o efeito da bateria de marcadores

moleculares na detecção de estruturação genética em populações de *P. viticola*, 3 grupos compostos por 4 marcadores microssatélites foram montados e usados para analisar a estruturação da amostra de 92 isolados de *P. viticola*. Os valores relativos de PIC (baixo, médio e alto) dos 44 marcadores avaliados no presente trabalho foram usados para montar cada grupo. Os grupos foram montados como se segue, indicando o nome do marcador em cada grupo, seguido do valor de PIC entre parêntesis: (a) Grupo 1: PvCNG26 (0.11), PvCNG07 (0.13), PvCNG09 (0.18), PvCNG31 (0.15); (b) Grupo 2: PvCNG08 (0.31), PvCNG02 (0.33), PvCNG05 (0.33), PvCNG13 (0.33); Grupo 3: PvCNG32 (0.42), BER (0.47), Pv17 (0.47), ISANew (0.53).

Tabela 1.11. Marcadores microssatélites e principais observações de alguns estudos sobre diversidade genética e estrutura da populações de *Plasmopara viticola*.

Marcadores	Nº de amostras	Nº de Genótipos	Nº de Grupos	Diversidade Genética	Local de coleta	Fonte de pesquisa
RAPD	48	29	-	alta	Alemanha	Stark-Urnau <i>et al.</i> (2000)
4 SSR	190	158	-	alta	Itália	Gobbin <i>et al.</i> (2003a)
4 SSR	97	430	-	alta	Itália	Gobbin <i>et al.</i> (2003b)
4 SSR	753	77	-	alta	Grécia	Rumbou & Gessler (2004)
4 SSR	4685	2342	-	alta	França, Suíça, Itália, Alemanha	Gobbin <i>et al.</i> (2005)
4 SSR	8991	3910	5	alta	França, Suíça, Itália, Alemanha e Grécia	Gobbin <i>et al.</i> (2006)
4 SSR	1322	204	3	baixa	Ilhas Gregas	Rumbou & Gessler (2006)
7 SSR	150	-	-	baixa	Europa e América	Delmotte <i>et al.</i> (2006)
3 SSR	54	43	-	alta	Alemanha, Itália, França e Suíça	Scherer & Gisi (2006)
4 SSR	862	1297	-	alta	África do Sul	Koopman <i>et al.</i> (2007)
4 SSR	4872	1297	16	alta	Grécia	Rumbou & Gessler (2007)
4 SSR	857	-	-	alta	Suíça	Matasci <i>et al.</i> (2010)
31 SSR	96	89	-	baixa	USA e Europa	Rouxel <i>et al.</i> (2012)
8 SSR	1146	515	2	baixa	Europa (68 vinhedos)	Fontaine <i>et al.</i> (2013)

Os resultados desta análise indicam que há realmente um grande efeito da bateria de marcadores usados para realizar a análise de estruturação de populações do patógeno. A análise com os marcadores do Grupo 1 (Figura 1.8a) indicou a existência

de três ou cinco subpopulações ($K_3= 4,3$; $K_5= 3,9$), com valores de $F_{st(1)}= 0,652$, $F_{st(2)}= 0,648$ e $F_{st(3)}= 0,006$ (no caso de 3 subpopulações). Os valores estimados de (Q) indicam dúvida na alocação da maior parte dos indivíduos nas 3 subpopulações. A análise com os marcadores do Grupo 2 (Figura 1.8b), indicou a existência de apenas duas subpopulações, com valores de $F_{st(1)}= 0,419$ e $F_{st(2)}= 0,01$. Neste caso, os valores de (Q) também indicam dúvida para a alocação de parte dos indivíduos nas subpopulações. A análise com os marcadores do Grupo 3 (Figura 1.8c), indicou a existência de duas ou três subpopulações ($K_2= 8,9$ e $K_3= 9,6$), com valores de $F_{st(1)}= 0,419$ e $F_{st(2)}= 0,01$ (no caso de 2 subpopulações). Os valores de (Q) também indicam dúvida para a alocação de alguns dos indivíduos nas subpopulações.

Não há dúvida de que a diferenciação detectada por marcadores moleculares é maior em alguns locos do que em outros. Isto significa que algumas regiões do genoma de *P. viticola* permitem uma melhor avaliação do processo de diferenciação de subpopulações do que outras regiões. Este fenômeno tem sido observado em diferentes organismos, como em humanos, onde valores de F_{st} para o mesmo conjunto populacional podem variar dependendo do tipo de marcador utilizado (SSR, SNPs) (Holsinger & Weir, 2009) e do grupo de marcadores dentro de cada classe. Isto significa que ao selecionar os marcadores usados na análise de estruturação de populações, é importante atentar para a cobertura genômica, isto é, para o uso de uma bateria de marcadores representativa e dispersa pelo genoma do organismo estudado, de forma a amostrar as variações de locos com diferentes sinais da dinâmica das populações estudadas ou da sua própria história evolutiva. É importante também que os marcadores selecionados possuam o conteúdo informativo adequado para a análise. No extremo, uma pequena bateria de marcadores com alelos fixados, em contraste com a grande

bateira de marcadores altamente polimórficos, seria pouco ou nada informativa para uma análise de estrutura genética de populações.

1.3.6 Testes de independência a classificação de *Plasmopara viticola* em subpopulações e a origem das amostras coletadas

A relação entre a classificação geográfica dos isolados de *P. viticola* coletados no Brasil e a classificação dos isolados nas três subpopulações do patógeno foi examinada através do emprego de Testes Exatos de Fisher para examinar a independência entre estas variáveis. Para isto, os isolados foram inicialmente classificados em três categorias: oriundos do estado do Rio Grande do Sul e de São Paulo (maior representação no total de amostras analisadas) e de “outros estados”. Os isolados foram ainda classificados de acordo com as três categorias de subestruturação (PvG1, PvG2 e PvG3). O teste foi realizado pela análise de tabela de contingência 3x3. O valor estimado do teste exato de Fisher para esta comparação foi 0,00000019, indicando que a classificação geográfica e a classificação de subpopulações do patógeno não são independentes. Há evidência estatística, portanto, para afirmar que a classificação geográfica dos isolados está associada à classificação dos mesmos em subpopulações.

Em outro teste, os isolados foram divididos em dois grandes grupos: isolados oriundos de São Paulo, por apresentar alta variabilidade de isolados classificados nas três subpopulações do patógeno, e em outro grupo, isolados oriundos dos demais estados. O teste foi realizado pela análise de tabela de contingência 2x3. O valor do Teste Exato de Fisher foi 0,00007422, novamente significativo. Os isolados ainda foram

separados de acordo com três regiões geográficas brasileiras: Centro-Oeste, Sudeste e Sul, resultando em um valor estimado do Teste Exato de Fisher $_{3 \times 3} = 0,00049$, e Sudeste e Sul (eliminando as poucas amostras do Centro-Oeste), resultando em um valor estimado do Teste Exato de Fisher $_{2 \times 3} = 0,0001458$. Todos estes resultados indicam, portanto, que não há independência entre a origem geográfica dos isolados e a classificação dos mesmos nas três subpopulações detectadas. Em outras palavras, as subpopulações do patógeno estão distribuídas de acordo com a classificação geográfica dos isolados.

Esta conclusão pode ser melhor examinada à luz dos dados da Tabela 1.12. Observa-se que 19 isolados constituíram a subpopulação 1 (PvG1), 65 constituíram a subpopulação 2 (PvG2) e 8 constituíram a subpopulação 3 (PvG3), distribuídos em 23 municípios produtores de uva (Figura 1.9). Os isolados provenientes do Rio Grande do Sul, maior estado produtor de uvas, representam 48,9% dos isolados analisados (45 isolados foram coletados neste estado). Apesar do grande número de isolados do Rio Grande do Sul, eles foram classificados apenas nas subpopulações PvG1 e PvG2 (nenhum isolado da subpopulação PvG3 foi encontrada neste estado, ou em Santa Catarina ou no Paraná) (Figura 1.5). Por outro lado, foram coletados apenas 6 isolados em Minas Gerais (6,5% do total de isolados) e, no entanto, eles estão distribuídos nas três subpopulações do patógeno (PvG1, PvG2 e PvG3).

Já os isolados provenientes dos estados do Mato Grosso, Paraná, Rio de Janeiro e Santa Catarina são todos da subpopulação PvG2. Isolados provenientes do Distrito Federal e Espírito Santo pertencem às subpopulações PvG2 e PvG3. Por fim, os isolados coletados em São Paulo pertencem às três subpopulações (PvG1, PvG2 e PvG3).

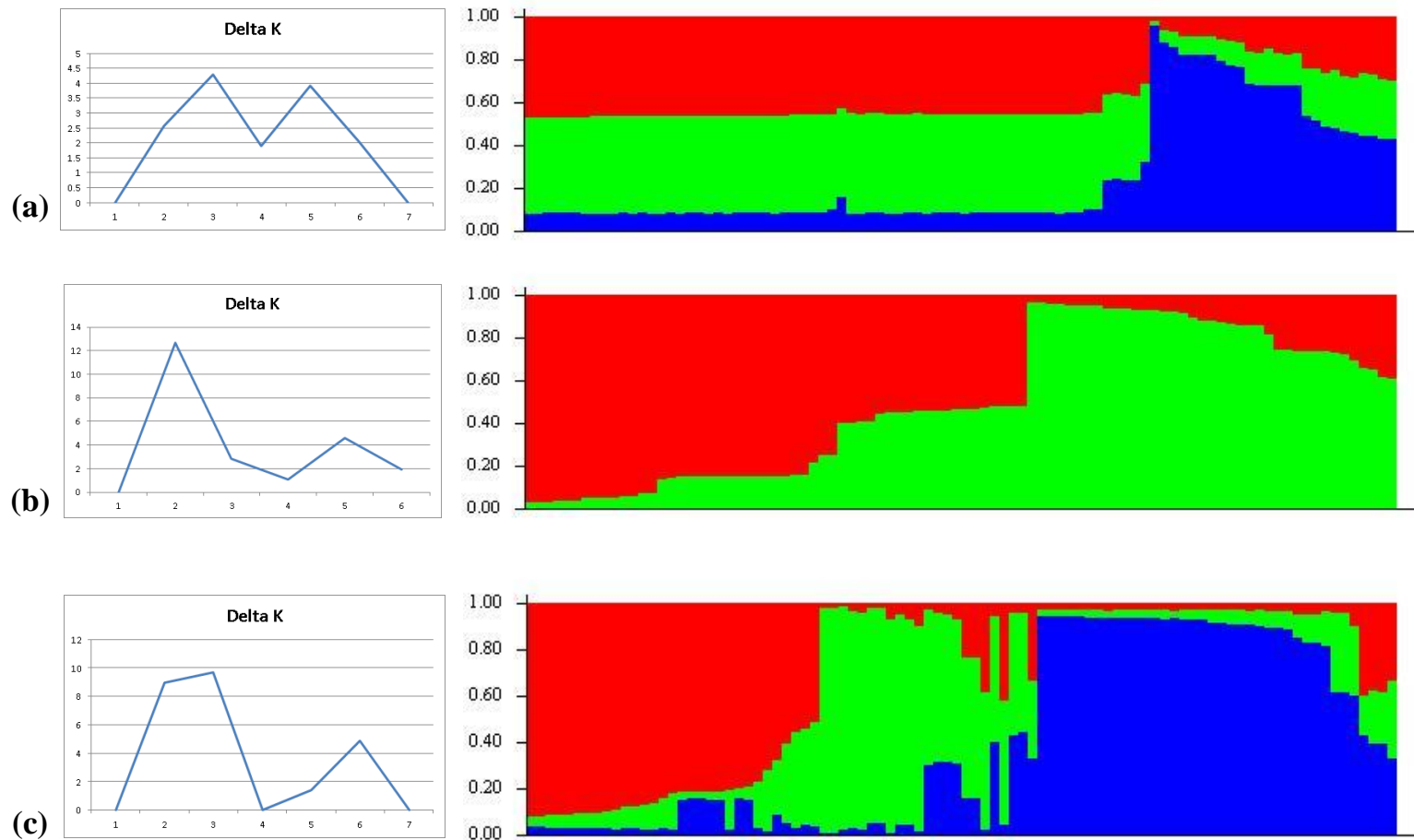


Figura 1.8. Distribuição dos 92 isolados de *Plasmopara viticola* em subpopulações do patógeno de acordo com três grupos de marcadores moleculares selecionados com base no valor relativo de PIC (baixo, médio e alto). Os valores de ΔK e a probabilidade de inclusão (Q) de cada isolado nas diferentes subpopulações (barras coloridas) são apresentados para (a) Grupo 1 (PIC baixo), (b) Grupo 2 (PIC médio) e (c) Grupo 3 (PIC alto).

Estes dados indicam que há uma relação entre a classificação geográfica dos isolados e a classificação em subpopulações do patógeno, constatada pelos Testes Exatos de Fisher. A maior diversidade do patógeno foi encontrada na Região Sudeste, nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, onde isolados das três subpopulações foram amostrados. Embora não haja informação entre a classificação dos isolados em subpopulações e resistência genética ao patógeno, os resultados sugerem que os testes de campo para resistência ampla ao patógeno devem ser conduzidos em regiões que apresentam maior diversidade de subpopulações, como São Paulo e Minas Gerais.

Os Testes Exatos de Fisher foram também usados para examinar a independência entre a classificação dos isolados em subpopulações do patógeno e o fato deles terem sido isolados em diferentes espécies de *Vitis* (*V. vinifera* e *V. labrusca*). Parece lógico tentar verificar se uma maior diversidade de espécies de videira favorece a diversificação do patógeno em diferentes subpopulações.

O teste foi realizado pela análise de tabela de contingência 2x3. O valor estimado do Teste Exato de Fisher foi 0,016. Há indicativo, portanto, de associação entre a espécie de uva plantada (*V. labrusca* ou *V. vinifera*) e a classificação de subpopulações do patógeno (PvG1, PvG2 e PvG3). A Figura 1.10 ilustra esta associação. Observa-se na figura que os isolados de *P. viticola* da subpopulação PvG2 são encontrados na mesma frequência em variedades das espécies *V. labrusca* e *V. vinifera*. Contudo, a frequência de isolados da subpopulação PvG3 coletados em *V. vinifera* é muito baixa (3%) enquanto que em *V. labrusca* é mais elevada (20%). O oposto ocorre com isolados da subpopulação PvG1: são encontrados em baixa frequência (10%) em *V. labrusca* e em frequência mais elevada (25%) em *V. vinifera*.

Tabela 1.12. Distribuição de 92 isolados de *Plasmopara viticola* oriundos de diferentes regiões geográficas do Brasil, representadas em 23 municípios produtores de uva, classificados de acordo com as subpopulações do patógeno (PvG1, PvG2 e PvG3).

Estado	Município	Subpopulações Detectadas			
		PvG1	PvG2	PvG3	Nº de isolados
DF	Lago Oeste-DF	-	-	1,00	2
DF	Planaltina	-	1,00	-	2
ES	Santa Tereza	-	0,80	0,20	5
GO	Cocalzinho	0,25	0,75	-	4
MG	Caldas	-	1,00	-	3
MG	Santana dos Montes	-	0,50	0,50	2
MG	Santa Bárbara	1,00	-	-	1
MT	Nova Mutum	-	1,00	-	2
RJ	Paraíba do Sul	-	1,00	-	1
SP	Indaiatuba	-	0,33	0,67	3
SP	Jales	1,00	-	-	7
SP	Louveira	-	0,50	0,50	4
SP	Palmeira D'Oeste	1,00	-	-	2
SP	Tupi Paulista	-	1,00	-	2
PR	Marialva	-	1,00	-	2
PR	Rolândia	-	1,00	-	2
RS	Bento Gonçalves	0,17	0,83	-	24
RS	Caxias do Sul	0,10	0,90	-	10
RS	Erechim	-	1,00	-	2
RS	Flores da Cunha	0,40	0,60	-	5
RS	Monte Belo	1,00	-	-	1
RS	São Valentim	-	1,00	-	3
SC	Videira	-	1,00	-	3

Não há dados precisos sobre a distribuição geográfica de plantios de variedades de *V. labrusca* e *V. vinifera* no Brasil. Contudo, é possível presumir que as regiões do Brasil que possuem maior diversidade de plantio de variedades de diferentes espécies de *Vitis* para produção de vinho, suco, passas ou consumo *in natura*, devem possuir também maior diversidade de subpopulações do patógeno. O Estado de São Paulo, por exemplo, parece se adequar a esta situação.

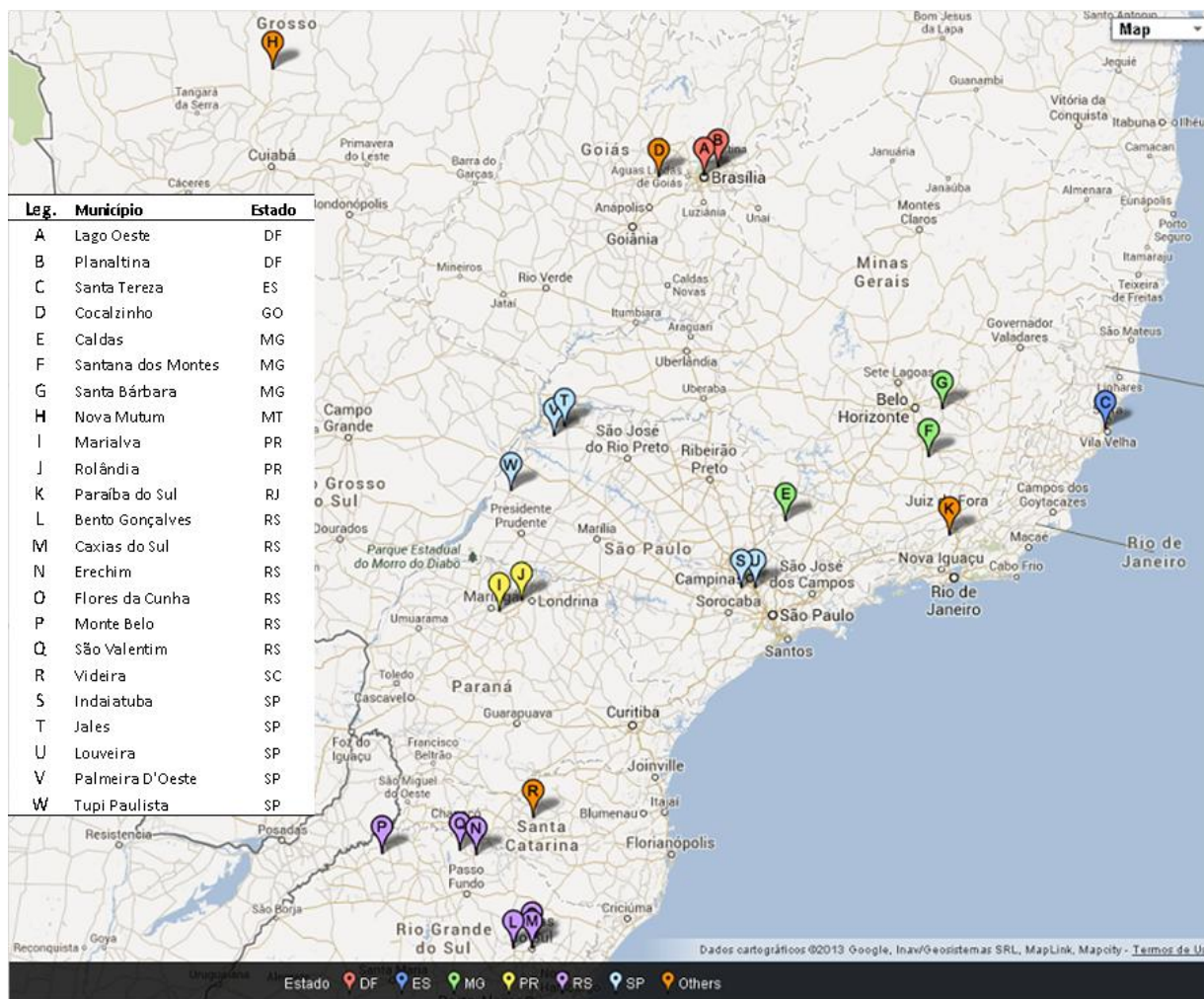


Figura 1.9. Mapa geográfico do Brasil com a localização das coletas de 92 populações de *P. viticola*, durante os anos de 2011, 2012 e 2013. A legenda mostra os municípios e os estados produtores de uva: A-B (Distrito Federal), C (Espírito Santo), D (Goiás), E-G (Minas Gerais), H (Mato Grosso), I-J (Paraná), K (Rio de Janeiro), L-Q (Rio Grande do Sul), R (Santa Catarina) e S-W (São Paulo).

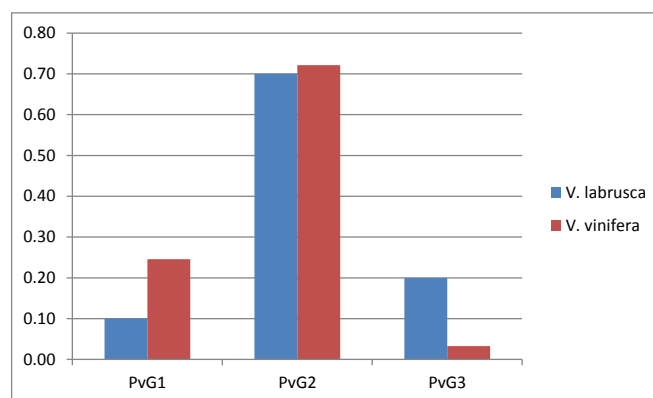


Figura 1.10. Distribuição de frequência de isolados de *Plasmopara viticola* de 3 subpopulações (PvG1, PvG2 e PvG3) coletados em variedades de uva das espécies *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera*.

A detecção de estruturação em amostras de isolados de *P. viticola* utilizando baterias mais extensas de marcadores microssatélites ainda é rara em míldio. No presente trabalho foram empregados 15 marcadores microssatélites (10 deles recém-desenvolvidos) para genotipar 92 isolados do patógeno. Foram detectados 242 genótipos, distribuídos em 3 subpopulações (PvG1, PvG2 e PvG3). Fontaine *et al.* (2013) utilizaram oito marcadores microssatélites e 1.146 isolados do patógeno, coletados em 68 vinhedos em toda Europa, e detectaram 515 genótipos distribuídos em apenas duas subpopulações. As duas subpopulações possuem origens geográficas distintas, sendo a primeira composta por isolados obtidos de vinhedos da Europa Ocidental e a segunda de vinhedos do Leste da Europa. Outro estudo descreve a genotipagem de 8.991 isolados de *P. viticola* (Gobbin *et al.*, 2006), coletados em 5 países (França, Suíça, Itália, Alemanha e Grécia). Os isolados foram genotipados com apenas 4 marcadores microssatélites. Foram identificados 3.910 genótipos e os autores concluíram que a amostra de isolados de mildio estava estruturada em cinco subpopulações, associadas com a origem geográfica. Rumbou & Gessler (2006) genotiparam 1.322 isolados de mildio de vinhedos das Ilhas Gregas (3 ilhas). Foram utilizados 4 marcadores na genotipagem e detectados 204 genótipos, distribuídos em 3 subpopulações, originárias das 3 ilhas amostradas. Em 2007 esses mesmos autores genotiparam 4.872 amostras coletadas na Grécia com 4 marcadores microssatélites, e detectaram 1297 genótipos, distribuídos em 16 subpopulações (Rumbou & Gessler, 2007).

Estes estudos parecem indicar que as estimativas de diversidade genética e do nível de estruturação de amostras de isolados de *P. viticola* apresentam grande variação em função de fatores como: (a) especificidades dos isolados coletados (efeitos de deriva genética, migração ou movimentação de clones contaminados, capacidade reprodutiva do patógeno, dinâmica da associação patógeno-hospedeiro, etc.); (b) especificidade dos marcadores moleculares (número de marcadores empregados na genotipagem, conteúdo informativo dos marcadores,

emprego de marcadores de motivo complexo na análise, etc.); (c) especificidade do ambiente, tais como: condições climáticas afetando as fases reprodutivas (sexuada e assexuada) do patógeno, isolamento geográfico, histórico da interação patógeno-hospedeiro nas regiões produtoras, uso intensivo de fungicidas, etc. O desafio atual do estudo de genética de populações de *P. viticola* está no desenho de experimentos que permitam separar algumas das variáveis acima para melhor compreensão da dinâmica das populações do patógeno. O emprego de ferramentas moleculares como sequenciamento NGS e marcadores moleculares contribui para uma melhor compreensão destas variáveis, conforme observado no presente trabalho. Este conhecimento tem implicações diretas no desenvolvimento de estratégias de melhoramento genético para resistência ao míldio.

1.4 CONCLUSÕES

- O sequenciamento NGS possibilitou a montagem parcial (*de novo*) de 84.482.175 pb do genoma de *P. viticola*, distribuídos em 93.134 *contigs*. A análise do genoma parcial montado possibilitou a detecção de 146.822 locos microssatélites di-nucleotídeos com motivos perfeitos no genoma do fungo;
- Um conjunto de 34 sequências microssatélites de dinucleotídeos (motivos AT e AC) foi selecionado para o desenvolvimento de marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*) para estudos genéticos de *P. viticola*.
- Os 15 marcadores selecionados possibilitaram a identificação de 242 genótipos nos 92 isolados de míldio. A amostra de 92 isolados apresentou estruturação, tendo sido dividida em três subpopulações, denominadas PvG1 ($F_{st} = 0,56$), PvG2 ($F_{st} = 0,25$) e PvG3 ($F_{st} = 0,24$).
- Foi observado um grande efeito no uso de pequenas baterias de marcadores moleculares na análise genética de populações do patógeno, afetando a interpretação dos resultados de subestruturação populacional. A diferenciação detectada por marcadores moleculares foi maior em alguns locos do que em outros.
- A classificação geográfica dos isolados apresenta associação com a classificação subpopulacional do patógeno. Os isolados oriundos dos Estados de São Paulo e Minas Gerais apresentaram maior diversidade de subpopulações do que isolados de outras regiões tradicionais no cultivo de uva no Brasil, como o Rio Grande do Sul.
- Há evidência de que a classificação de subpopulações do patógeno esteja também associada com a espécie de videira (*V. labrusca* e *V. Vinifera*) de onde os isolados foram obtidos.
- Embora não haja informação entre a classificação dos isolados em subpopulações e resistência genética ao patógeno, os resultados sugerem que os testes de campo para

resistência ampla ao patógeno devem ser conduzidos em regiões que apresentam maior diversidade de subpopulações, como São Paulo e Minas Gerais.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press. San Diego.
- BOTSTEIN, D.R.L.; SKOLNICK, W.M. & R. W. DAVIS, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32:314-331.
- BRONDANI, R.P.V.; GRATAPAGLIA, D. 2001. Cost-effective method to synthesise a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. Biotechniques 31:793-795.
- CSÉFALVAY, L.; DI GASPERO, G.; MATOUŠ, K.; BELLIN, D.; RUPERTI, B. & OLEJNÍČKOVÁ, J. 2009. Pre-symptomatic detection of *Plasmopara viticola* infection in grapevine leaves using chlorophyll fluorescence imaging. Eur J Plant Pathol 125:291-302.
- DELMOTTE, F.; CHEN, W.J.; RICHARD-CERVERA, S.; GREIF, C.; PAPURA, D.; GIRESE, X.; MONDOR-GENSON, G. & CORIO-COSTET, M.F. 2006. Microsatellite DNA markers for *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew of grapes. Molecular Ecology Notes 6:379-381.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S. & GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology 14:2611-2620.
- FONTAINE, M.C.; AUSTERLITZ, F.; GIRAUD, T.; LABBÉ, F.; PAPURA, D.; RICHARD-CERVERA, S. & DELMOTTE, F. 2013. Genetic signature of a range expansion and leap-frog event after the recent invasion of Europe by the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. Molecular Ecology 22:2771-2786.
- FREEMAN, G.H. & HALTON, J.H. (1951). Note on an exact treatment of contingency, goodness of fit and other problems of significance. Biometrika, 38, pp. 141-149.
- GOBBIN, D.; PERTOT, I. & GESSLER, C. 2003a. Identification of microsatellite markers for *Plasmopara viticola* and establishment of high throughput method for SSR analysis. European Journal of Plant Pathology 109:153-164.
- GOBBIN D.; PERTOT I. & GESSLER C. 2003b. Genetic structure of a *Plasmopara viticola* population in an isolated Italian mountain vineyard. Journal of Phytopathology, 151:636-646.
- GOBBIN, D.; JERMINI, M.; LOSKILL, B.; PERTOT, I.; RAYNAL, M. & GESSLER, C. 2005. Importance of secondary inoculum of *Plasmopara viticola* to epidemics of grapevine downy mildew. Plant Pathology 54:522-534.
- GOBBIN, D.; RUMBOU, A.; LINDE, C.C. & GESSLER, C. 2006. Population genetic structure of *Plasmopara viticola* after 125 years of colonization in European vineyards. Molecular Plant Pathology 7:519-531.

- HOLSINGER, K.E. & WEIR, B.S. 2009 Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . *Nature Reviews* 10:639-650
- IDURY, R.M. & CARDON, L.R. 1997. A Simple Method for automated allele binning in microsatellite markers. *Genome Research* 7:1104-1109.
- INGLEZ DE SOUZA, J. S. Uvas para o Brasil. Piracicaba: FEALQ, 1996. 791p.
- JACKSON, J.E. A user's guide to principal components. Wiley: New York, 569p. 1991
- JAILLON, O.; AURY, J.M.; NOEL, B.; POLICRITI, A.; CLEPET, C.; CASAGRANDE, A.; CHOISNE, N.; AUBOURG, S.; VITULO, N.; JUBIN, C.; VEZZI, A.; LEGEAI, F.; HUGUENEY, P.; DASILVA, C.; HORNER, D.; MICA, E.; JUBLOT, D.; POULAIN, J.; BRUYÈRE, C.; BILLAULT, A.; SEGURENS, B.; GOUYVENOUX, M.; UGARTE, E.; CATTONARO, F.; ANTHOUARD, V.; VICO, V.; FABBRO, C.D.; ALAUX, M.; DI GASPERO, G.; DUMAS, V.; FELICE, N.; PAILLARD, S.; JUMAN, I.; MOROLDO, M.; SCALABRIN, S.; CANAGUIER, A.; CLAINCHE, I.L.; MALACRIDA, G.; DURAND, E.; PESOLE, G.; LAUCOU, V.; CHATELET, P.; MERDINOGLU, D.; DELLEDONNE, M.; PEZZOTTI, M.; LECHARNY, A.; SCARPELLI, C.; ARTIGUENAVE, F.; PÈ, M.E.; VALLE, G.; MORGANTE, M.; CABOCHE, M.; ADAM-BLONDON, A.F.; WEISSENBACH, J.; QUÉTIER, F. & WINCKER, P. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449:463-468.
- KIEFER, B.; RIEMANN, M. & BUCHE, C. 2002. The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Planta* 215:387-393.
- KOOPMAN, T.; LINDE, C.C.; FOURIE, P.H. & MCLEOD, A. 2007. Population genetic structure of *Plasmopara viticola* in the Western Cape Province of South Africa. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY* 8:723-736.
- KORTEKAMP, A.; WIND, R.; ZYPRIAN, E. 1998. Investigation of the interaction of *Plasmopara viticola* with susceptible and resistant grapevine cultivars. *J Plant Dis Protec* 105:475-488.
- LIU, K. & MUSE, S.U. 2005. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21:2118-2129.
- LYNCH, M. 1990. The similarity index and DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution*, 7:478-484.
- MATASCI, C.L.; JERMINI, M.; GOBBIN, D. & GESSLER, C. 2010. Microsatellite based population structure of *Plasmopara viticola* at single vine scale. *European Journal of Plant Pathology* 127:501-508.
- MAYER, C. 2006. *Phobos*. 3.3.11 edn. Website <http://www.rub.de/spezzoo/>, consultado em 26/10/2013.

- MELLO, L.M.R. 2013a. Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2012. Bento Gonçalves RS. Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico 137.
- MELLO, L.M.R. 2013b. Atuação do Brasil no mercado vitivinícola mundial: Panorama 2012. Bento Gonçalves RS. Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico 138.
- MOREIRA, F.M.; MADINI, A.; MARINO, R.; ZULINI, L.; STEFANINI, M.; VELASCO, R.; KOZMA, P. & GRANDO, M.S. 2011. Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (*Vitis* spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. *Tree Genetics & Genomes* 7:153-167.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, P. & DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- RITSCHER, P.S.; LINS, T.; TRISTAN, R.L.; BUSO, G.S.C.; BUSO, J.A. AND FERREIRA, M.E. 2004 Development of microsatellite markers for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.) *BMC Plant Biology* 4:1-14.
- ROHLF, F.J. 1998. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0, User's Guide. New York: Exeter Software.
- ROHLF, F. J. 2000. Software NTSYS 2.1: Numerical taxonomic and multivariate analysis system. New York, Exeter Software.
- ROUXEL, M.; PAPURA, D.; NOGUEIRA, M.; MACHEFER, V.; DEZETTE, D.; RICHARD-CERVERA, S.; CARRERE, S.; MESTRE, P. & DELMOTTE, F. 2012. Microsatellite markers for characterization of native and introduced populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Applied and Environmental Microbiology* 78:6337-6340.
- RUMBOU, A. & GESSLER, C. 2004. Genetic dissection of *Plasmopara viticola* population from a Greek vineyard in two consecutive years. *European Journal of Plant Pathology* 110:379-392.
- RUMBOU A. & GESSLER C. 2006. Particular structure of *Plasmopara viticola* populations evolved under Greek Island conditions. *PHYTOPATHOLOGY* 96:501-509.
- RUMBOU, A. & GESSLER, C. 2007. Greek epidemics of grapevine downy mildew are driven by local oosporic inoculum: a population biology approach. *Journal of Biological Research* 7:3-18.
- SCHERER, E. & GISI, U. 2006. Characterization of genotype and mating type in european isolates of *Plasmopara viticola*. *J. Phytopathology* 154:489-495.
- SCHWANDER, F.; EIBACH, R.; FECHTER, I.; HAUSMANN, L.; ZYPRIAN, E. & TÖPFER, R. 2011. Rpv10: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theor Appl Genet* DOI 10.1007/s00122-011-1695-4.

- SILVA, P.IT.; MARTINS, A.M.; GOUVEA, E.G.; MARCO PESSOA-FILHO, M. & FERREIRA, M.E. 2013. Development and validation of microsatellite markers for *Brachiaria ruziziensis* obtained by partial genome assembly of Illumina single-end reads. *BMC Genomics* 14:17.
- STARK-URNAU, M.; SEIDEL, M.; KAST, W.K.; GEMMRICH, A.R. 2000. Studies on the genetic diversity of primary and secondary infections of *Plasmopara viticola* using RAPD/PCR. *Vitis* 39:163-166.
- VERCESI, A.; TOFFOLATTI, S.L.; ZOCCHI, G.; GUGLIELMANN, R. & IRONI, L. 2010. A new approach to modelling the dynamics of oospore germination in *Plasmopara viticola*. *European Journal of Plant Pathology* 128:113-126.
- WONG, F.P., BURR, H.N. & WILCOX, W.F. 2001. Heterothallism in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology* 50:427-432.
- WRIGHT, S. 1969. Evolution and the genetics of populations volume 2: the Theory of Gene Frequencies, pg 294–295, , Univ. of Chicago Press, Chicago.

CAPÍTULO 2: Mapeamento de QTLs de Resistência ao Agente Causal do Míldio (*Plasmopara viticola*) em Progenie de Híbridos de Videira (*Vitis* spp.)

RESUMO

Uma das principais doenças das regiões produtoras de uva do Brasil é causada por *Plasmopara viticola*, agente causal do míldio da videira. Entre as estratégias de controle da doença destaca-se o emprego de resistência genética para a obtenção de variedades resistentes. A resistência ao míldio é uma característica complexa, quantitativamente herdada, e vem sendo estudada em várias espécies de *Vitis* e gêneros afins. O presente estudo teve por objetivo construir mapas genéticos para os genitores da progênie F1 do cruzamento CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 e mapear regiões do genoma de videira que conferem resistência ao patógeno. O mapa do genitor feminino CNPUV 733-34 cobriu 1.104 cM do genoma da videira, com distância média entre marcadores de 6,69 cM. O mapa do genitor masculino CNPUV 1103-88 cobriu 958 cM do genoma da videira, com distância média entre marcadores de 7,48 cM. O fenótipo da interação patógeno-hospedeiro foi mensurado em bioensaios em ambiente controlado e em ensaio de infecção natural no campo. Os mapas genéticos possibilitaram o mapeamento de QTLs associados ao controle genético de resistência a *P. viticola* no genoma da videira. Três QTLs foram detectados por mapeamento de Intervalo Simples e Intervalo Composto no mapa genético do genitor feminino CNPUV 733-34. Um dos QTLs está localizado no GL 5, no intervalo entre os marcadores UDV041-UDV042 (LOD = 3,9) e explica 6% da variação fenotípica para resistência a *P. viticola*. Dois

outros QTLs (C18-1 e C18-2), apresentaram efeito moderado de resistência a *P. viticola*, foram detectados no GL 18, e explicam até 22,3% da variação fenotípica. O intervalo do QTL C18-1 (LOD = 7,6) é flanqueado pelos marcadores VMC7F2 e VVIN16, que estão separados por 5 cM. O intervalo do QTL C18-2 (LOD = 6,3) é flanqueado pelos marcadores VVIU04 e VVIN83, separados por 22 cM. Os QTLs são estáveis, isto é, foram detectados por dois anos em condições de campo e nas repetições do bioensaio em condições controladas de laboratório. Os efeitos aditivos da resistência a *P. viticola* em condições de campo e bioensaio foram provenientes do genitor materno (CNPUV 733-34). O mapeamento de Marcas Simples identificou ainda dois marcadores (VMC3D7 e VMC3G11), localizados nos cromossomos 10 e 16, associados ao controle de resistência a *P. viticola* herdado do genitor masculino (CNPUV 1103-88). O mapeamento genético de QTLs de resistência ao míldio utilizando diferentes fontes de resistência nos programas de melhoramento genético da videira é um passo importante para o aumento da eficiência do desenvolvimento de variedades resistentes ao patógeno.

Palavras-chave: mapeamento genético, marcadores microssatélites, QTL, resistência genética

ABSTRACT

One of the most important diseases of grapevine in Brazil is caused by *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew. Among the strategies proposed to control the disease, great attention has been given to the use of genetic resistance in grapevine improvement. Downy mildew resistance is a complex trait, quantitatively inherited, which has been studied in *Vitis* and several wild relatives. This work aimed to develop genetic maps for the parental varieties of an F1 progeny derived from the cross CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 and map grapevine genomic regions associated with resistance to the pathogen. The map of the female genitor CNPUV 733-34 covered 1,104 cM, with an average recombination distance between markers of 6.69 cM. The map of the male genitor CNPUV 1103-88 covered 958 cM, with an average recombination distance between markers of 7.48 cM. Host-pathogen interaction phenotype was measured by controlled bioassays using artificial inoculation, and by natural infection in the field. Genetic mapping determined the location of *P. viticola* resistance QTLs in grapevine. Three QTLs mapped on the female genitor genome were detected by Interval Mapping and Composite Interval Mapping procedures. One of these QTLs was located in LG 5, in the UDV041-UDV042 marker interval (LOD= 3.9), explaining 6% of the phenotypic variation for *P. viticola* resistance. Two additional QTLs (C18-1 e C18-2), showing a moderate effect on *P. viticola* resistance, were detected in LG 18, explaining up to 22.3% of the phenotypic variation. The C18-1 QTL interval (LOD= 7.6) is flanked by markers VMC7F2 and VVIN16, which are 5 cM apart. The C18-2 QTL interval (LOD= 6.3) is flanked by markers VVIU04 and VVIN83, which are 22 cM apart. Both QTLs are stable, i.e., they have been detected using data of two consecutive years of field evaluation and also of three independent bioassays conducted in laboratory conditions. Additive effects

of resistance in field and controlled conditions are derived from the female genitor (CNPUV 733-34). Single Marker analysis identified two other markers (VMC3D7 and VMC3G11), located in chromosomes 10 e 16, which are associated with downy mildew resistance, inherited from the male genitor (CNPUV 1103-88). Mapping downy mildew resistance QTLs using germplasm accessions derived from different sources of resistance in breeding programs is an important step towards higher efficiency in the improvement of grapevine resistance to the pathogen.

Keywords: genetic resistance, linkage analysis, microsatellite markers, QTL

2.1 INTRODUÇÃO

A videira (*Vitis* spp.) destaca-se entre as mais importantes espécies frutíferas cultivadas no mundo. O seu cultivo vem passando por mudanças significativas, merecendo destaque a emergência de novas regiões produtoras em áreas tropicais, que vêm produzindo safras cada vez maiores, com produtividades acima da média mundial. O oomyceto *Plasmopara viticola* (Berk. e Curt.) Berl. & de Toni é o agente causal do míldio em videira. No Brasil, esta doença ocorre na maioria das regiões produtoras de uva, principalmente quando condições de temperaturas amenas e de alta umidade relativa do ar predominam ao longo do ciclo vegetativo da planta. O tratamento químico intenso para o controle da doença eleva o custo de produção, além de causar problemas ambientais, que são incompatíveis com as exigências modernas de uma agricultura sustentável. Uma alternativa ao uso dos fungicidas é o melhoramento para resistência genética ao patógeno, apoiado em ferramentas de biologia molecular.

O mapeamento de regiões do genoma da planta que controlam características de interesse, como resistência a patógenos, tem sido empregado na identificação de marcadores moleculares com o objetivo de facilitar e aumentar a eficiência da seleção de genótipos superiores nos programas de melhoramento genético (Ferreira & Grattapaglia, 2006). O mapeamento genético permite identificar marcadores que flanqueiam os locos de características quantitativas (QTL), permitindo o seu uso em seleção assistida ou no isolamento de genes envolvidos no controle da característica.

O desenvolvimento de mapas genéticos como ferramentas para o melhoramento da videira foi retardado em comparação com outras culturas, devido à alta heterozigosidade dos clones, depressão por endogamia e ciclo da cultura. O primeiro mapa genético de videira foi publicado por Lodhi *et al.* (1995). Posteriormente, outros mapas foram construídos baseados

em diferentes tipos de marcadores moleculares, como RFLP, RAPD, AFLP e microssatélites (Dalbó *et al.*, 2000; Doligez *et al.*, 2002, 2006; Grando *et al.*, 2003; Adam-Blondon *et al.*, 2004; Doucleff *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2004; Riaz *et al.*, 2004, 2006; Di Gaspero *et al.*, 2007; Troggio *et al.*, 2007; Costantini *et al.*, 2008). O primeiro mapa genético de referência baseado apenas em marcadores microssatélites foi desenvolvido por Riaz *et al.* (2004). Nesse estudo, 21 grupos de pesquisa formaram um consórcio internacional para identificar marcadores baseados em microssatélites (VMC, *Vitis Microsatellite Consortium*, coordenado pelo AGROGENE, Moissy Cremayel, França). Mais de 350 marcadores VMC foram desenvolvidos e usados para construção de um mapa de ligação de referência, aprovado internacionalmente a partir do cruzamento das variedades *Riesling e Cabernet Sauvignon*. Dois conjuntos de marcadores microssatélites para a videira foram posteriormente desenvolvidos por pesquisadores da Itália (série UDV, Di Gaspero *et al.*, 2005) e da França (série VVI, Merdinoglu *et al.*, 2005).

A resistência ao míldio é uma característica complexa, quantitativamente herdada (Moreira *et al.*, 2011), e vem sendo estudada em várias espécies de *Vitis* e gêneros afins. Fontes de resistência ao míldio foram identificados em espécies silvestres americanas (Eibach *et al.*, 2010) e asiáticas (Wan *et al.*, 2007; Jurges *et al.*, 2009). Uma estratégia potencialmente eficiente para compreender a genética de resistência a doenças é o mapeamento das regiões do genoma responsáveis pelo seu controle, utilizando marcadores moleculares. A informação de mapa é especialmente útil para o desenvolvimento de sistemas de seleção indireta para fenótipos de grande dificuldade de análise (Ferreira, 2003).

Os mecanismos envolvidos na interação *Vitis/Plasmopara* ainda não são bem conhecidos, e esforços têm sido feitos na localização e compreensão das regiões do genoma da videira que controlam resistência a *P. viticola*. Os mecanismos de resistência esclarecidos até agora incluem barreiras físicas, como pilosidade e fechamento dos estômatos, o acúmulo

de compostos fenólicos antimicrobianos, aumento da atividade da peroxidase, o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PRs) e reação de hipersensibilidade (HR) (Kortekamp *et al.*, 1998; Kortekamp & Zyprian 2003; Kortekamp 2006; Allègre *et al.*, 2007). A resposta da planta à infecção do patógeno tem sido caracterizada predominantemente por meio de estudos de incompatibilidade em espécies resistentes como *Vitis riparia*, *V. rupestris*, *V. rotundifolia* e *V. amurensis* (Merdinoglu *et al.*, 2003; Díez-Navajas *et al.*, 2008; Marguerit *et al.* 2009; Peressotti *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2011; Blasi *et al.*, 2011; Schwander *et al.*, 2011).

Videiras nativas da América do Norte têm sido extensivamente cruzadas com *V. vinifera*, com o objetivo de introduzir genes de resistência ao míldio. “*Villard blanc*”, também conhecida como *Seyve Villard*, transmite para a progênie ampla resistência ao míldio (Cadle-Davidson, 2008). Híbridos da série “*Seibel*” e “*Seyve Villard*” foram introduzidos no Brasil e utilizados no programa de melhoramento genético de videira da Embrapa.

Marcadores moleculares associados a genes de resistência ao míldio foram identificados em diferentes estudos, voltados para a compreensão das regiões de resistência oriundas de várias espécies, como: *Muscadinia rotundifolia* (Merdinoglu *et al.*, 2003; Wiedemann-Merdinoglu *et al.*, 2006), espécies silvestres norte americanas (Welter *et al.*, 2007; Bellin *et al.*, 2009), *Vitis riparia* (Marguerit *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2011) e *Vitis amurensis* (Blasi *et al.*, 2011; Schwander *et al.*, 2011; Venuti *et al.*, 2013). Estes esforços oferecem uma boa perspectiva de utilização de marcadores moleculares em seleção assistida para melhoramento genético de resistência ao míldio em videira.

Os objetivos do presente trabalho foram: a) construir mapas genéticos utilizando marcadores microssatélites para ambos os genitores de uma progênie F1 obtida do cruzamento entre dois híbridos apirênicos heterozigotos (CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88) e um mapa integrado baseado em alelos que segregam nos dois parentais, através da estratégia de pseudo-cruzamento teste; b) mapear QTLs (*Locos de Características Quantitativas*) para

resistência ao míldio da videira e c) proceder análise comparativa dos QTLs mapeados na população F1 do cruzamento CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 com QTLs de resistência ao míldio detectados em outros estudos com espécies de *Vitis*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades de genotipagem e fenotipagem foram realizadas simultaneamente, possibilitando agilizar as análises para construção dos mapas de ligação e o mapeamento de QTLs de resistência ao míldio. A Figura 2.1 mostra o fluxograma das principais atividades realizadas durante o estudo.

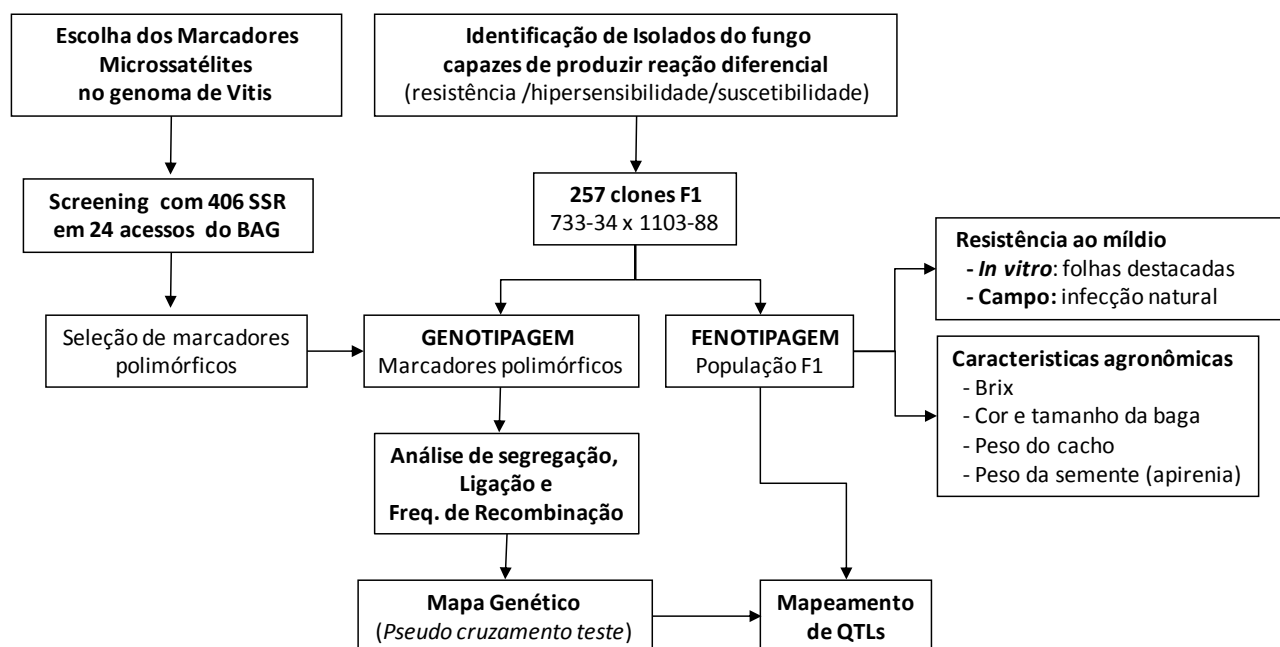


Figura 2.1. Fluxograma de atividades desenvolvidas neste estudo com objetivo de construir mapas de ligação e mapear QTLs de resistência ao míldio da videira.

2.2.1 População de mapeamento genético

Os experimentos de avaliação da interação-patógeno hospedeiro (fenotipagem), a genotipagem e o mapeamento de QTLs foram conduzidos em uma família de 257 irmãos completos, geração F1, gerada pelo cruzamento entre dois híbridos de *Vitis vinifera* CNPUV 733-34, resistente ao míldio e CNPUV 1103-88, suscetível à doença. Esse cruzamento foi desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária (Embrapa Uva e Vinho). A população segregante foi obtida através de resgate de embriões oriundos do cruzamento, através de cultura *in vitro* em 2008.

O genitor materno (CNPUV 733-34) é um híbrido interespecífico entre *Seyve Villard* 18315 x *Fantasy seedless*. CNPUV 733-34 apresenta as seguintes características agronômicas: tamanho de baga pequeno (17 a 20 mm); apirenia (traço grande); cor da baga rosada escura (preta); brix (14 a 19); resistente ao míldio. A resistência ao míldio transmitida por esse híbrido é proveniente de espécies de *Vitis* silvestres norte-americanas introgridida para *Seyve Villard* 18315 (*Villard Noir*) que tem no seu *pedigree*, as seguintes proporções: 7,04% de *V. labrusca*, 3,91% de *V. riparia*, 29,69% de *V. rupestris*, 9,38% de *V. aestivalis*, 1,56% de *V. cineria* e 48,42% de *V. vinifera* (Maul *et al.*, 2008).

O genitor paterno (CNPUV 1103-88) é um híbrido interespecífico entre CNPUV 659-4 x *Superior Seedless*. CNPUV 1103-88 possui as seguintes características agronômicas: tamanho de baga grande (20 x 36 mm); apirenia (traço pequeno/minúsculo); cor da baga branca; brix (17 a 24); suscetível ao míldio. O *pedigree* deste híbrido é altamente complexo, pois inclui híbridos das séries “Seibel” e “Seyve Villard”, cuja constituição genética é composta por cinco diferentes espécies silvestres: *V. rupestris*, *V. aestivalis*, *V. cinerea*, *V. labrusca*, *V. lincedumi*, cultivares moscatel (Muscat à *petits grains*, Muscat of Alexandria,

Moscat Hamburg e Sultana Moscata), além de variedades apirênicas Sultanina (Thompson seedless) e Ruby Seedless.

2.2.2 Extração e quantificação de DNA

Para extração de DNA foram coletadas folhas jovens de clones da progênie F1 CNPUV 733-34 X CNPUV 1103-88 e dos seus genitores, embaladas em papel alumínio, identificadas e armazenadas em freezer a -20°C. O DNA foi extraído utilizando aproximadamente 150 mg de folha, baseada no protocolo CTAB (Ferreira & Grattapaglia, 1998). As amostras foram maceradas em equipamento “*FastPrep*” BIO101 com o uso de esferas metálicas (*beads*), juntamente com 800 µL de tampão CTAB 2X (2% acetyldimethyl tiethylammonium bromide - CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH=8,0, 1% polyvinylpyrrolidone, 0,2% 2-mercaptoethanol). As amostras foram incubadas em banho maria por 40 minutos a 65°C para a solubilização e homogeneização da suspensão, com agitação a cada 10 minutos. Após centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos, 500 µl do sobrenadante foram transferidos para tubo de 1,5 ml, ao qual foi adicionado 350 µl de isopropanol gelado. O tubo foi armazenado a -20°C por 2 horas para precipitação dos ácidos nucleicos. Após centrifugação a 8.000 rpm durante 10 minutos, foi obtido o precipitado (“*pellet*”), que foi lavado três vezes com 800 µL de etanol 70%. Os “*pellets*” foram desidratados em centrífuga a vácuo e ressuspensos em solução 60 µl de Tris/EDTA (TE) pH 8,0 com Ribonuclease A (RNaseA), mantida à temperatura de 37°C por 30 minutos para ação da enzima. A qualidade do DNA foi avaliada em eletroforese de gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio (0,15 g/mL). A quantificação do DNA genômico foi realizada em

equipamento Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) e ajustada para 5ng/µl. O DNA para uso nas reações e os estoques foram mantidos em freezer -20°C.

2.2.3 Seleção de locos microssatélites para genotipagem

Um total de 574 marcadores microssatélites, constituídos por motivos di, tri e tetranucleotídeos, foi utilizado como referência inicial para a seleção de marcadores distribuídos por todo o genoma da videira, com potencial de uso em estudos genéticos da espécie. A seleção dos microssatélites foi inicialmente baseada na disposição relativa dos marcadores ao longo do genoma, com base no mapa de referência construído por Doligez *et al.* (2006). Os 574 marcadores são oriundos dos seguintes grupos de pesquisa: VMC e VMCNG (*Vitis Microsatellite Consortium*, Agrogene, Moissy Cramayel, France, descritos por Di Gaspero *et al.*, 2000 e Adam-Blondon *et al.*, 2004); VVS (Thomas & Scott, 1993); VVC (Decroocq *et al.*, 2003); VVMD (Bowers *et al.*, 1996, 1999); VrZAG (Sefc *et al.*, 1999); UDV (Di Gaspero *et al.*, 2005) e VVI (Merdinoglu *et al.*, 2005). Demais marcadores foram descritos em Mejía *et al.* (2011). Do total de 574 marcadores utilizados como referência foram selecionados e sintetizados 406 locos, distribuídos ao longo dos 19 grupos de ligação de *Vitis vinifera*, com média aproximada de 20 cM entre marcadores.

Os iniciadores de PCR (*primers*) de cada marcador foram sintetizados e marcados (*primer "forward"-5'*) com os fluorocromos NED, HEX ou FAM. Todos os 406 marcadores foram testados em um primeiro passo de triagem de polimorfismo (*screening*) utilizando DNA dos dois clones genitores e vinte e dois acessos diversos de *Vitis*, de grande importância para o programa de melhoramento genético de videira da Embrapa Uva e Vinho (Tabela 2.1).

Esta primeira triagem foi realizada para conhecer a qualidade e o padrão de amplificação e de eletroferogramas dos marcadores, selecionar os locos polimórficos informativos para mapeamento, confirmar a segregação Mendeliana esperada para os alelos observados nos genitores em cada loco, avaliar as combinações de marcadores para montagem de painéis multiplex, além de confirmar a configuração alélica dos genitores.

2.2.4 Genotipagem da progênie F1 e dos genitores com marcadores microssatélites

Os marcadores microssatélites selecionados foram combinados em painéis multiplex, variando de 3 a 6 marcadores para análise simultânea em sequenciador de DNA. A montagem dos painéis multiplex levou em consideração o espectro de fluorescência do marcador, as temperaturas de anelamento e o comprimento do produto da amplificação.

As reações de amplificação foram realizadas utilizando as seguintes soluções: 2 µl de solução 5 ng/µl de DNA genômico; 0,19 µM de Taq DNA polimerase 1 U; 0,19 µl de solução 5 µM de iniciador de PCR (direto e reverso); 0,3 µl MgCl₂; 0,8 µl de BSA 2,5 mM; 1 µl de Tampão 10X para Taq DNA polimerase; 1,5 µl de dNTP 2,5 mM e 3,4 µl de H₂O padrão Milli-Q, totalizando um volume final de 10 µl. As reações de polimerase em cadeia foram realizadas em Termociclador Veriti™ (Applied Biosystems, Foster City, California/USA). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos, para ativar a enzima, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento do primer por 90 segundos e extensão pela Taq polimerase com incorporação dos nucleotídeos a 72°C por 60 segundos; após os 35 ciclos, foi realizada uma extensão final a 60°C por 30 minutos.

Para as reações de genotipagem não houve necessidade de checagem de produto de PCR por eletroforese em gel de agarose. Desta forma, o produto de PCR foi diretamente submetido à eletroforese capilar em sequenciador de DNA para obtenção dos genótipos. Foram utilizando-se 1,3 µl do produto PCR, 0,32 µl do padrão de fragmentos de DNA de tamanho conhecido marcado com fluorocromo ROX (Brondani & Grattapaglia, 2001) e 20 µl de formamida HiDi (Applied Biosystems, Foster City, California/USA) na eletroforese capilar em sequenciador de DNA. Os produtos de PCR desnaturados foram injetados em sequenciador automático de DNA modelo ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, California/USA).

Os dados de genotipagem foram analisados com o Software GeneMapper® v4.1 (Applied Biosystems, Foster City, California/USA). O programa permite a obtenção de planilhas com comprimento estimado dos alelos (pb) a cada loco. Essas planilhas posteriormente foram analisadas com o programa Allelobin (Idury & Cardon, 1997), que implementa um arredondamento das estimativas de cada alelo em pares de base, baseado na metodologia de quadrados mínimos, com base no motivo de repetição do microssatélite.

Os dados de genotipagem dos 257 indivíduos F1 mostrando os alelos em pares de bases arredondados, estão disponíveis no Anexo 2 – Tabela 2.

Tabela 2.1. Acessos de videira selecionados no Banco de Germoplasma da Embrapa Uva e Vinho utilizados para a seleção de marcadores microssatélites utilizados no presente estudo.

Nr.	Acesso	Introdução	Finalidade	Espécie	Origem
1	Moscato Branco	2697	Vinho fino branco e espumante	<i>Vitis vinifera</i>	Origem desconhecida
2	Ancellota	2709	Vinho fino tinto	<i>Vitis vinifera</i>	Italiana
3	Riesling Itálico	2785	Vinho fino branco	<i>Vitis vinifera</i>	Italiana
4	<i>Cabernet Sauvignon</i>	1788	Vinho fino tinto	<i>Vitis vinifera</i>	Francesa
5	Chardonnay	1793	Vinho fino branco	<i>Vitis vinifera</i>	Francesa
6	<i>Sauvignon Blanc</i>	1912	Vinho fino branco	<i>Vitis vinifera</i>	Francesa
7	Muscat Frontignan	1768	Vinho fino branco	<i>Vitis vinifera</i>	Francesa
8	Merlot	2770	Vinho fino tinto	<i>Vitis vinifera</i>	Francesa
9	Carmenére	1940	Vinho fino tinto	<i>Vitis vinifera</i>	Francesa
10	Tempranillo		Vinho fino tinto	<i>Vitis vinifera</i>	Espanhola
11	Syrah	1773	Vinho fino tinto	<i>Vitis vinifera</i>	Pérsia (?)
12	Thompson Seedless	1867	Uva fina de mesa apirênica	<i>Vitis vinifera</i>	Pérsia (?)
13	Itália	1766	Uva fina de mesa	<i>V. vinifera</i> (Bicane x Moscatel de Hamburgo)	Itália
14	<i>Vitis Silvestris</i>	2438	-	<i>Vitis silvestris</i>	Europa
15	CNPUV 733-34 - Mãe		Uva de mesa tipo fino	Híbrida resistente ao míldio	Brasileira
16	CNPUV 1103-88 - Pai		Uva de mesa tipo fino	Híbrida susceptível ao míldio	Brasileira
17	Isabel	1829	Vinho de mesa e suco	Híbrida (<i>V. labrusca</i> x <i>V. vinifera</i>)	Americana
18	Isabel Precoce	2526	Vinho de mesa e suco	Clone Isabel	Brasileira
19	Concord Clone 30		Vinho de mesa e suco	Clone Concord	Brasileira
20	Concord (Francesa)		Vinho de mesa e suco	<i>Vitis labrusca</i>	Americana
21	1103 Paulsen	1782	Porta-enxerto	Híbrida (<i>V. berlandieri</i> x <i>V. rupestris</i>)	Americana
22	IAC 572	2034	Porta-enxerto tropical	<i>V. tiliifolia</i> x '101-14 Mgt'	Americana
23	<i>Vitis Armata</i>	1752	Fonte resistência ao míldio e antracnose	<i>Vitis armata</i>	Chinesa
24	<i>V. rotundifolia</i> cv. Magnolia	2514	Resistencia à pérola-da-terra	<i>Vitis rotundifolia</i>	Americana

2.2.5 Fenotipagem: bioensaio em ambiente controlado

Um bioensaio para avaliação da interação patógeno-hospedeiro visando identificar plantas de videira com reação de hipersensibilidade (resistência) ou com sintomas da doença (suscetibilidade) após inoculação com *P. viticola* foi desenvolvido para este estudo. Os testes foram inicialmente realizados por meio de inoculação pontual em folhas destacadas de plantas dos dois genitores CNPUV 733-34 (resistente ao míldio) e CNPUV 1103-88 (suscetível) e *Cabernet Sauvignon* (suscetível) como controle positivo. Foram utilizados dez diferentes isolados de *P. viticola*, coletados em vinhedos localizados em Jales-SP e em Planaltina-DF.

O bioensaio foi baseado na inoculação pontual de folhas destacadas de plantas de videira com suspensão de esporos do patógeno. As inoculações foram realizadas utilizando apenas a quarta e a quinta folha expandida do ápice dos brotos de plantas mantidas em casa de vegetação, no estágio de 8 a 10 folhas. O objetivo foi homogeneizar o tamanho e o estágio de desenvolvimento das folhas usadas no bioensaio. Antes da inoculação, folhas destacadas de cada variedade foram desinfestadas por 5 minutos em hipoclorito de sódio a 0,02%, lavadas três vezes em água destilada e secas com guardanapos esterilizados. As folhas foram dispostas com a parte abaxial para cima em placa de petri esterilizada (15 cm de diâmetro), sobre papel filtro umedecido com 12 µl de água destilada. De cada isolado foram retirados esporângios em água destilada com auxílio de um pincel macio. Foram inoculadas três folhas destacadas de cada variedade (CNPUV 733-34, CNPUV 1103-88 e *Cabernet Sauvignon*), nas quais foram depositadas 8 (oito) gotículas de 10 µl da suspensão ajustada a $1,5 \times 10^5$ esporângios/ml, após contagem com um hematocitômetro (Figura 2.2).



Figura 2.2. Detalhe do bioensaio de avaliação de resistência/suscetibilidade de videira a isolado de *Plasmopara viticola* em ambiente controlado. Oito gotas com suspensão de esporos do patógeno foram despositadas na superfície abaxial de folhas destacadas da progênie CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 para avaliação do fenótipo da interação patógeno-hospedeiro.

Após a inoculação, as placas de Petri contendo as folhas inoculadas foram vedadas e incubadas em câmara de crescimento com temperatura de 23°C e fotoperíodo de 12 horas.

O fenótipo da interação patógeno-hospedeiro foi avaliado sete dias após a inoculação, usando uma escala semi-quantitativa de notas, variando de 1 (muito resistente) a 9 (altamente suscetível) (Figura 2.3). A descrição dos sintomas observados para a aplicação das notas é apresentada na Tabela 2.2. Foram classificados como resistentes (R) os indivíduos que apresentaram notas 1 a 3, e como suscetíveis (S) aqueles que apresentaram notas variando de 5 a 9. As reações de hipersensibilidade foram observadas em microscópio de luz para discriminar entre a ocorrência de necrose subestomática limitada a poucas células ou completa ausência de reações necróticas.

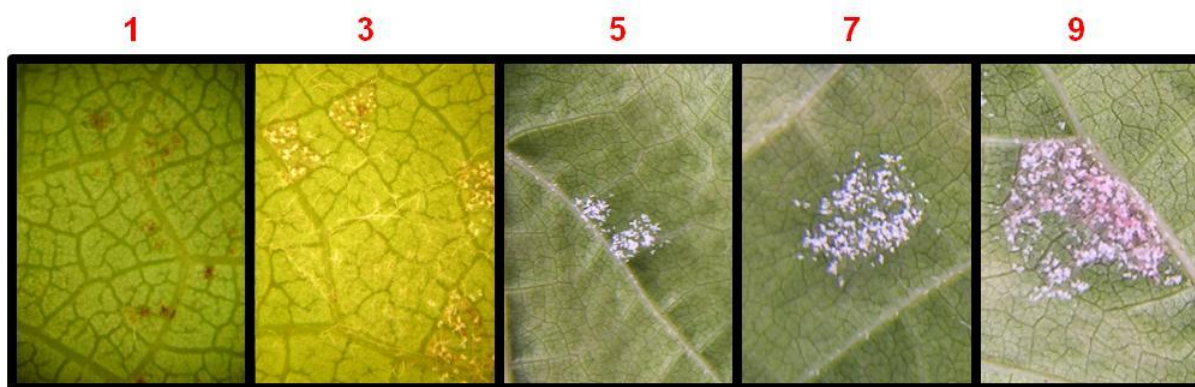


Figura 2.3. Escala de notas do bioensaio utilizada para avaliação do fenótipo da interação entre *Plasmopara viticola* e videira através de inoculação pontual de esporângios em folhas destacadas.

Tabela 2.2. Descrição de sintomas da escala de notas de resistência do bioensaio utilizado para avaliação do fenótipo da interação entre *P. viticola* e videira. As análises foram realizadas 7 dias após a inoculação. Foram classificados como resistentes (R) os indivíduos que apresentaram notas de 1 a 3, e como suscetíveis (S) aqueles que apresentaram notas variando de 5 a 9.

Nota	Classificação do fenótipo da interação patógeno-hospedeiro em folha destacada de videira em bioensaio de inoculação pontual
1	Reação de hipersensibilidade (HR), observados no microscópio de luz, sem esporulação ou micélio.
3	Resposta de hipersensibilidade (HR), com poucas frutificações dispersas do fungo, medindo até 4 mm, e formação irregular do micélio no local da inoculação, com melhor visualização em microscópio de luz.
5	Lesão pequena com esporulação dispersa de <i>P. viticola</i> , medindo de 4-6 mm e formação de micélio.
7	Lesão grande com forte esporulação e abundância de micélio, medindo de 6-8 mm.
9	Lesão grande com forte esporulação e micélio denso, crescendo além da área inoculada.

Todos os bioensaios para identificação de isolados com reação diferencial entre os genitores (CNPUV 733-34, CNPUV 1103-88) e de avaliação de segregação para resistência a *P. viticola* na população F1 seguiram o protocolo descrito acima.

Identificação de isolado de *Plasmopara viticola* com reação diferencial entre os genitores da população F1 CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 - Foram coletadas folhas de videira com sintomas de míldio, na fase de “manchas de óleo”, em vinhedos estabelecidos na Embrapa Uva e Vinho de Jales-SP e em Planaltina-DF (Casa da Uva Zimmermann). Cada

isolado foi obtido de uma única lesão foliar para minimizar a variabilidade genética. Dez isolados de *P. viticola* obtidos desta forma foram inoculados em folhas de plantas saudáveis de *Cabernet Sauvignon* plantadas em vaso, com objetivo de multiplicar o inóculo. Plantas de *Cabernet Sauvignon* foram inoculadas com cada um dos 10 isolados e foram cobertas com sacos plásticos pulverizados internamente com água destilada, para manter a umidade. As plantas foram mantidas isoladas em ambiente sombreado. Os sacos plásticos foram retirados após 12 horas e as plantas foram pulverizadas com água destilada 5 vezes ao dia para favorecer o estabelecimento da infecção.

Após o período de incubação mínimo variando de 7 a 10 dias, o inóculo dos 10 isolados foram utilizados em testes de detecção de reação diferencial com os dois genitores (CNPUV 733- e CNPUV 1103-88), utilizando *Cabernet Sauvignon* (suscetível) como controle positivo. O bioensaio foi desenvolvido conforme descrito anteriormente.

2.2.6 Fenotipagem da progênie F1 do cruzamento CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 para resistência a *Plasmopara viticola*

Uma réplica da progênie F1 do cruzamento CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88, composta por uma família de 191 irmãos-completos, foi avaliada através de bioensaios de resistência ao míldio, realizados por meio de inoculação pontual em folhas destacadas. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Genética da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Utilizou-se no bioensaio o isolado que apresentou reação diferencial de resistência/suscetibilidade nos testes de virulência com os genitores da população. Antes da inoculação as folhas foram desinfestadas conforme metodologia descrita anteriormente para o bioensaio.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições (191 progênies F1 x 3 repetições), empregando as linhagens genitoras CNPUV 733-34 e CNPUV 1103-88 como controle. CNPUV 733-34 apresenta um fenótipo de resistência ao isolado de *P. viticola* que foi selecionado (nota 3), com reação típica de hipersensibilidade. CNPUV 1103-88 apresenta um fenótipo de suscetibilidade (nota 9), com desenvolvimento progressivo de sintomas da doença. Cada placa de Petri foi tratada como uma unidade experimental. Em cada placa foram avaliadas três folhas destacadas, inoculadas com 8 (oito) 10 µl de uma suspensão de esporângios ajustada para 1.5×10^5 esporângios/ml. Testes de kurtose, skewness e Kolmogorov-Smirnov foram usados para avaliar a normalidade da distribuição dos dados obtidos. Um teste de Friedman (F) (Friedman, 1937) foi utilizado para testar diferenças significativas entre as notas atribuídas a cada clone em cada replicação do experimento. Um teste de qui-quadrado, corrigido para normalidade, foi realizado para testar a evidência de segregação Mendeliana 1:1 e 3:1 na progênie F1, assumindo um controle monogênico e digênico de resistência ao míldio devido a gene(s) dominante(s) em heterozigose no genitor resistente (CNPUV 733-34). Os dados foram analisados utilizando o software MedCalc (MedCalc Statistical Software version 12.7.7 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2013).

2.2.7 Fenotipagem: avaliação de resistência ao míldio da videira em condições de campo

A progênie F1 do cruzamento CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88, composta por uma família de 257 irmãos-completos, também foi avaliada para resistência ao míldio em campo, nos anos de 2010 e 2011. Para os experimentos de campo, borbulhas de cada clone da progênie F1 foram enxertadas (IAC 572) e plantadas em cinco ruas da quadra nove da Estação

Experimental da Embrapa Uva e Vinho em Jales-SP, em sistema de espaldeira, com espaçamento de 2,5 m entre fileiras e 1,5 m entre plantas (Figura 2.4).



Figura 2.4. Clones da progênie F1 do cruzamento CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 plantados na Estação Experimental da Embrapa Uva e Vinho em Jales-SP. Esta população foi utilizada para análise de resistência ao míldio em condições de campo. As avaliações fenotípicas de resistência ao míldio foram realizadas nos anos de 2010 e 2011.

As avaliações de resistência/suscetibilidade foram feitas sob condições naturais de infecção do patógeno. No período que precedeu cada avaliação não foi realizada qualquer pulverização química para controle de doenças. O delineamento experimental utilizado nos ensaios de campo foi em blocos inteiramente casualizados com duas repetições no tempo (257 progênies F1 x 2 repetições), empregando as linhagens genitoras CNPUV 733-34 e CNPUV 1103-88 como controle. Conforme mencionado, CNPUV 733-34 apresenta um fenótipo de resistência ao isolado de *P. viticola* que foi selecionado, com reação típica de hipersensibilidade. CNPUV 1103-88 apresenta um fenótipo de suscetibilidade, com desenvolvimento progressivo de sintomas da doença.

Cada clone F1 foi avaliado criteriosamente, observando os sintomas gerais nas folhas, bem como o tamanho e a quantidade de lesões esporulativas na face abaxial das folhas e folhas em senescência. A repetição experimental foi realizada ao longo do tempo, isto é, os mesmos clones foram avaliados durante dois anos seguidos após infecção natural. A classificação da severidade dos sintomas foi realizada de acordo com escala de notas e descritores dos sintomas (Tabela 2.3; Figura 2.5). A nota média da avaliação de cada clone da progênie F1 nos dois anos foi submetida ao teste de Wilcoxon Signed Rank. O teste, que não se baseia na premissa de distribuição normal dos dados, é recomendado para comparações em par (dados de 2010 e 2011), é usado quando a mesma característica (resistência a doença) é medida em diferentes condições (ex. repetições experimentais em datas diferentes) nos mesmos indivíduos, neste caso, a progênie da população F1.

Os dados das avaliações de fenotipagem da população F1 estão disponíveis no Anexo 2 – Tabela 3.

Tabela 2.3. Escala de notas utilizadas para classificação de resistência/suscetibilidade de videira ao patógeno *Plasmopara viticola*, com descrição das características avaliadas em condições de campo (IPGRI/UPOV, OIV, 1997).

Nota	Reação de plantas de videira à infecção com <i>Plasmopara viticola</i> em folhas (OIV452) em campo
1	Sem sintomas
3	Manchas pequenas (pequenas lesões necróticas, menores de 1 cm de diâmetro, pouca esporulação ou presença de micélio)
5	Manchas médias (manchas de pequeno a médio tamanho, de 1-2 cm de diâmetro, com desenvolvimento limitado do fungo e formação irregular de micélio).
7	Manchas grandes (vastas lesões, forte esporulação, abundância de micélio, queda tardia de folhas).
9	Manchas muito grandes (vastas lesões coalescente, folha totalmente atacada; forte esporulação e micélio denso, queda precoce das folhas).

Escala de notas de 1 a 9 (IPGRI/UPOV, OIV, 1997).

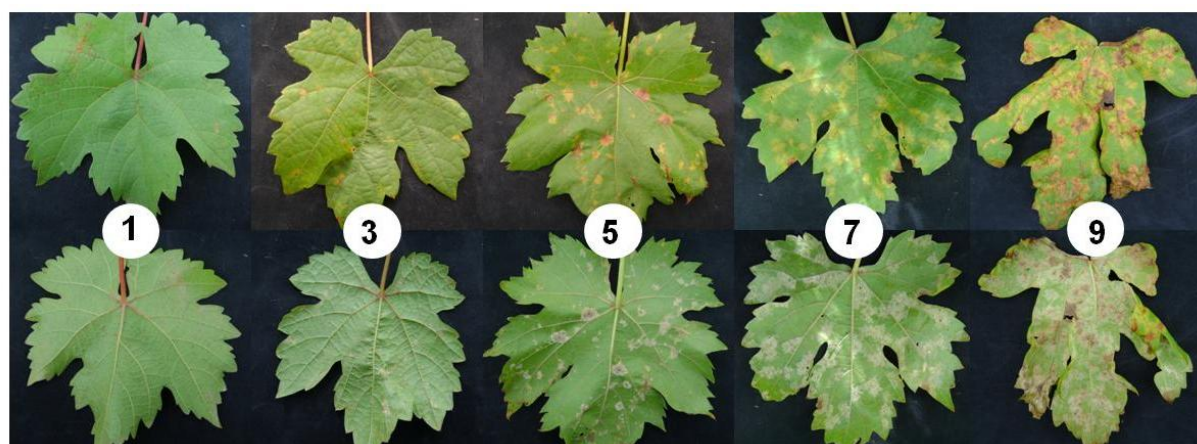


Figura 2.5. Escala de notas para avaliação da severidade do míldio (*Plasmopara viticola*) em folhas de videira, em condições de campo (superior: superfície adaxial; inferior: superfície abaxial).

2.2.8 Análise de segregação e construção de mapa de ligação

Os dados genotípicos foram separados em dois arquivos: o grupo 1, com os marcadores em heterozigose no genitor masculino (CNPUV 1103-88) e homozigose no genitor feminino (CNPUV 733-34), e o grupo 2, com marcadores em homozigose no genitor masculino (CNPUV 1103-88) e heterozigose no genitor feminino (CNPUV 733-34). Os

marcadores completamente informativos (segregação 1:1:1:1), com três ou quatro alelos diferentes no total, foram incluídos nos dois grupos (grupo 1 e grupo 2) e os marcadores que segregaram conforme uma configuração típica de F2 (segregação 1:2:1) foram excluídos das análises pois, na condição de fase de ligação desconhecida, não é possível identificar a origem parental dos alelos nos descendentes.

A análise de segregação e a construção dos mapas genéticos de cada parental, bem como do mapa integrado da progênie F1, foram gerados pelo software JoinMap v3.0 (Van Ooijen & Voorrips, 2001), conforme estratégia de pseudo-cruzamento teste (Grattapaglia & Sederoff, 1994). Padrões de segregação foram designados para cada marcador na sequência dos dados de entrada do JoinMap: <abxcd>, <efxeg>, <lmxll> e <nnxnp>. Índices de segregação observados e esperados foram comparados diretamente pelo JoinMap usando um teste χ^2 . A ordem dos marcadores foi estabelecida em um LOD *score* mínimo de 4 e frequência de recombinação máxima de 45%, utilizando a função de mapeamento Kosambi.

O agrupamento e ordenamento dos marcadores foram estabelecidos inicialmente pela aplicação do algoritmo de máxima verossimilhança do JoinMap com população tipo CP (população resultante de um cruzamento entre dois pais diplóides heterozigotos, com fases de ligação originalmente desconhecidas). O JoinMap calcula duas probabilidades diferentes de obter um conjunto específico de recombinantes observados em uma família. A primeira probabilidade é calculada com a suposição da distribuição independente, e a segunda é calculada com a suposição de um grau específico de ligação. Então, a proporção das probabilidades é calculada, e o logaritmo desse número é obtido, que é o valor LOD. A evidência de ligação que produz o maior valor de LOD é a mais provável. O LOD fornece uma medida para a probabilidade de ligação entre marcadores e se os dois marcadores estão sendo analisados no mesmo cromossomo.

O ordenamento dos marcadores no JoinMap foi programado para realizar três turnos de simulações de agrupamento (*third round*), ou seja, o programa exclui os locos que contribuía para uma ordem instável nas duas primeiras tentativas de ordenamento para produzir um mapa *framework*, com um suporte estatístico para ordenamento de alta verossimilhança. Marcadores segregantes adicionais foram então incorporados no mapa de ligação com menor rigor em uma terceira e última tentativa do JoinMap, para proporcionar uma posição de mapa a um maior número possível de marcadores segregantes. Todos os mapas foram montados com os mesmos critérios e valores limiares para cada parâmetro. Os marcadores que mostraram segregação distorcida foram excluídos.

Foi realizada uma avaliação e comparação genômica, da ordem dos marcadores nos 19 grupos de ligação, com o mapa de referência (Doligez *et al.*, 2006). Os grupos de ligação (GL) foram numerados de acordo com a recomendação do IGGP (International Grapevine Genome Program). Para desenhar os mapas genéticos e compará-los com a referência, foi utilizado o programa MapChart (Voorrips, 2002).

2.2.9 Detecção de QTLs

O mapeamento de QTLs para a característica fenotípica de resistência ao míldio foi conduzido em cada um dos mapas parentais, de maneira individual, através do método de mapeamento por Marca Simples, Intervalo Simples e Intervalo Composto. Todas as análises foram realizadas com o software para Windows QTL Cartographer versão 2.5 (Wang *et al.*, 2012). Cada marcador foi testado para ligação com QTLs através de uma análise de variância, onde os tratamentos foram os diferentes genótipos dos marcadores, com três níveis de significância (5%, 1% e 0,1%) pelo teste F. Para detecção dos QTLs, foi adotado um nível de

significância de 5%, com base em um teste envolvendo 1.000 permutações, de acordo com o procedimento descrito por Churchill & Doerge (1994), implementado nos software QTL Cartographer. Isto permitiu determinar o LOD *score* limite para detectar significância nas análises. O valor de LOD é uma estatística amplamente utilizada em análises de mapeamento genético, usada como referência para a evidência ou não de ligação entre dois locos considerados. Como os logaritmos são expoentes na base 10, um valor de LOD igual a 3 representa um valor de frequência de recombinação (FR) que é 1.000 vezes (isto é, 10^3) mais provável que a hipótese de não haver ligação.

O mapeamento de intervalos utiliza um par de marcadores como unidade de análise ao invés de um marcador de cada vez (Lander & Botstein 1989). O mapeamento por Intervalo Simples (IS) delimita um intervalo entre dois marcadores onde o programa realiza as análises na busca de um QTL. Valores de LODs são gerados dentro do intervalo a cada 1 cM e comparados com o LOD *score* obtido por meio de permutações. No mapeamento por Intervalo Composto (IC), além do intervalo considerado na análise, são considerados também os outros QTLs presentes, ou seja, a correlação não é independente da existência de outros QTLs.

Na análise de Intervalo Composto a escolha de co-fatores, marcadores supostamente ligados a QTLs a serem incluídos como variáveis independentes no modelo de regressão múltipla, foi feita através de uma regressão *step-wise* (método “forward”) realizada pelo software QTL Cartographer. O número de cofatores variou para cada característica, de acordo com a recomendação de Zeng (1994), de se testar múltiplos modelos para encontrar aquele que possui o melhor balanço entre os erros tipo I e II. Para todas as características foram feitas análises utilizando 5 e 8 cofatores, através do modelo 6 do QTL Cartographer. Com isso, escolheu-se, para cada característica, o modelo cujo valor de cofator proporcionou o maior número de QTLs com maiores significâncias estatísticas (maiores valores de LOD).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Triagem e seleção de microssatélites

Foram selecionados para o presente trabalho um conjunto de 406 marcadores microssatélites de um total de 574 marcadores inicialmente considerados. Estes marcadores atenderam aos critérios iniciais de qualidade, robustez e padrão de amplificação adequado à genotipagem. Dos 406 marcadores analisados observou-se que 280 locos foram heterozigotos para ambos os parentais, 93 locos foram monomórficos, 25 locos apresentaram difícil interpretação e 8 locos não amplificaram ou apresentaram alelos nulos. Portanto, do total de 406 locos microssatélites avaliados, 31% foram descartados por terem falhado ou apresentado segregação não informativa. Assim, 280 marcadores (69%) apresentaram polimorfismo e foram genotipados com sucesso na população segregante. A representação esquemática dos locos com segregação não informativa para este cruzamento é apresentada na Figura 2.6.

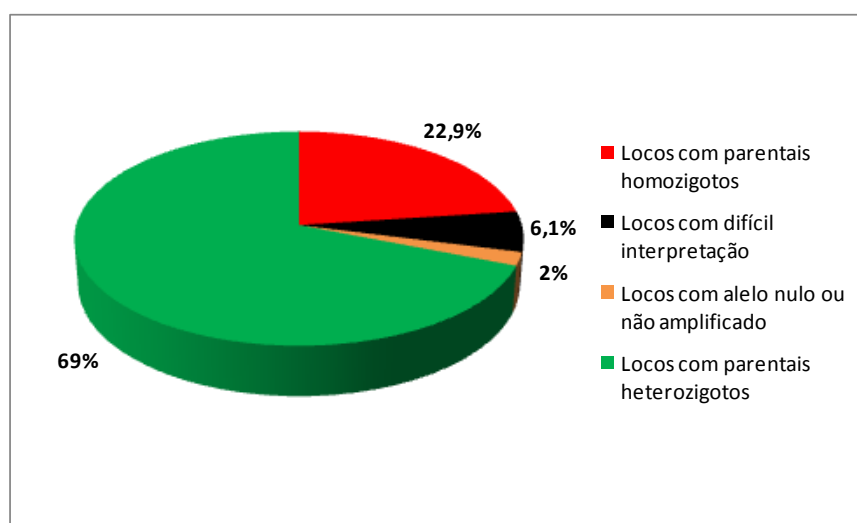


Figura 2.6. Representação gráfica em porcentagem do aproveitamento final dos 406 locos microssatélites usados na genotipagem da progênie

F1 do cruzamento de *Vitis vinifera* (CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88).

Comparando os alelos de todos os locos amplificados entre a progênie e os genitores, somente um indivíduo (F1-92a), provavelmente contaminante, foi declarado não derivado deste cruzamento, sendo retirado das análises. Dos 280 marcadores polimórficos genotipados, 17 locos foram retirados da análise porque apresentavam dados faltantes acima de 20%, 54 locos foram retirados após o teste de desvio de segregação mendeliana esperada, através do teste X^2 (Figura 2.7) e, finalmente, 209 marcadores microssatélite foram selecionados para construção dos mapas genéticos de ambos os genitores (Anexo 2 - Tabela 1).

2.3.2 Genotipagem da população F1 do cruzamento CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88

Do total de 209 marcadores SSR polimórficos utilizados para a construção dos mapas, 52 locos foram heterozigotos em ambos os pais (4 alelos), apresentando segregação 1:1:1:1; 67 locos foram heterozigotos em ambos os pais (3 alelos), segregação 1:1:1:1; 68 locos foram heterozigotos para o genitor feminino (2 alelos), segregação 1:1 e 22 locos foram heterozigotos para o genitor masculino (2 alelos), segregação 1:1 (Figura 2.8). Entre os parentais, o genitor feminino (CNPUV 733-34) apresentou um maior número de locos polimórficos neste cruzamento, mostrando assim um maior nível de heterozigosidade em comparação com o genitor masculino.

2.3.3 Construção de mapa genético pela estratégia de pseudo-cruzamento teste

Dois mapas integrados do cruzamento interespecífico de híbridos de *V. vinifera* CNPUV 733-34 e CNPUV 1103-88 foram construídos com base em uma família de 257 irmãos-completos, utilizando 209 marcadores microssatélites co-dominantes, empregando o software JoinMap v3.0 (Van Ooijen & Voorrips, 2001).

Um mapa de ligação foi construído com suporte de alta verossimilhança, para o ordenamento dos marcadores após a segunda rodada do JoinMap e foi denominado “Mapa *Framework*” (Tabela 2.4 e Figura 2.9). Um total de 187 marcadores foram alinhados ao longo dos 19 grupos de ligação (GL), cobrindo 1.149,51 cM Kosambi, com uma distância média entre os marcadores de 6,28 cM. Um mapa de ligação menos rigoroso, foi obtido após a terceira rodada de ordenamento do JoinMap e foi denominado “*Mapa full*” ou mapa completo. Este mapa é constituído de 209 marcadores e é apresentado como uma referência preliminar de todos os marcadores informativos, incluindo os marcadores distorcidos (Tabela 2.4 e Figura 2.10). O tamanho estimado total do mapa integrado (*full*) foi de 1.262,8 cM Kosambi, cobrindo os 19 grupos de ligação, com uma densidade média de marcadores a cada 6,04 cM.

O mapa *framework* foi apenas 8,97% menor que o mapa *full*, cobrindo, respectivamente, 1.149,51 e 1.262,83 cM (Tabela 2.4). A ordem dos marcadores de ambos os mapas (*framework* e *full*) foi geralmente consistente, apesar de alguns conjuntos de marcadores invertidos terem sido observados nos grupos de ligação 2, 5, 10, 11, 15 e 18 (Figuras 2.9 e 2.10).

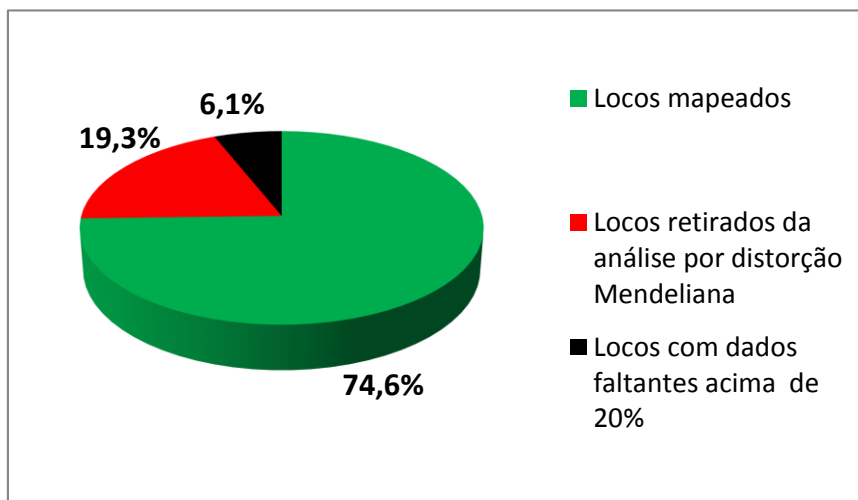


Figura 2.7. Representação gráfica em porcentagem do aproveitamento de 280 marcadores microssatélites efetivamente utilizados para a construção de mapas genéticos da progênie F1 do cruzamento de *Vitis vinifera* CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88.

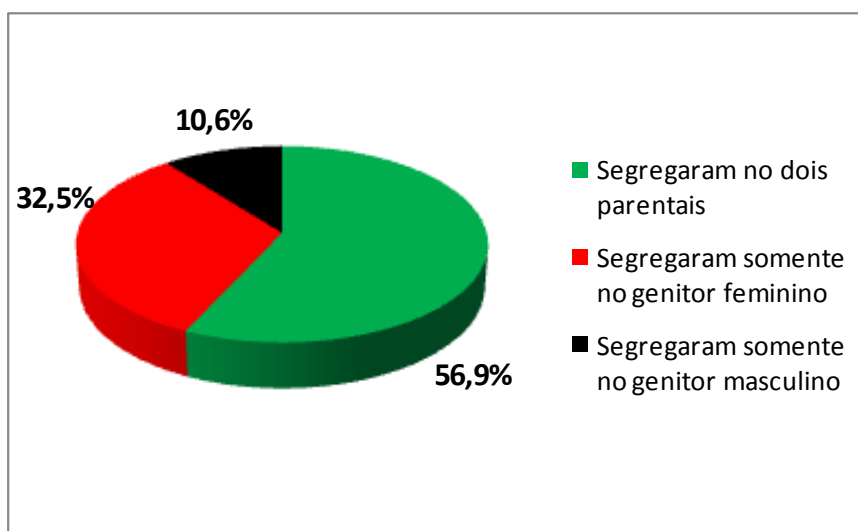


Figura 2.8. Gráfico representando a porcentagem dos 209 locos microssatélites informativos para o cruzamento de *Vitis vinifera* (CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88).

Tabela 2.4. Resumo de informações geradas pela construção dos mapas integrados (*framework* e *full*) dos híbridos de *Vitis vinifera* CNPUV 733-34 e CNPUV 1103-88.

Cromossomo	Mapa Framework			Mapa Full		
	Nr. SSR	Distância (cM)	Distância média (cM)	Nr. SSR	Distância (cM)	Distância média (cM)
1	19	82,79	4,36	19	82,79	4,36
2	8	73,66	9,21	10	93,66	9,37
3	7	65,40	9,34	9	66,82	7,42
4	6	49,35	8,23	7	60,94	8,71
5	10	59,07	5,91	14	85,22	6,09
6	9	50,74	5,64	10	49,78	4,98
7	10	76,22	7,62	11	80,67	7,33
8	12	69,85	5,82	13	74,82	5,76
9	8	51,46	6,43	8	51,46	6,43
10	10	39,93	3,99	11	40,88	3,72
11	7	43,92	6,27	8	48,30	6,04
12	4	24,45	6,11	6	31,99	5,33
13	12	72,69	6,06	13	73,34	5,64
14	17	67,05	3,94	18	67,21	3,73
15	9	51,06	5,67	10	51,12	5,11
16	9	66,66	7,41	9	66,66	7,41
17	5	43,99	8,80	6	67,59	11,26
18	11	89,55	8,14	15	95,65	6,38
19	10	71,68	7,17	12	73,95	6,16
Total	183	1149,51	6,28	209	1262,83	6,04

Os marcadores mapeados foram comparados com o mapa de referência (Doligez *et al.*, 2006). Essa comparação entre mapas permitiu checar que nenhum marcador microssatélite agrupou-se em grupos diferentes, mesmo quando a cobertura em um determinado grupo de ligação era baixa. As inconsistências entre os mapas são apenas diferenças de ordenação, principalmente entre marcadores próximos (o que é difícil de ser harmonizado devido ao tamanho limitado das populações de mapa em ambos os estudos).

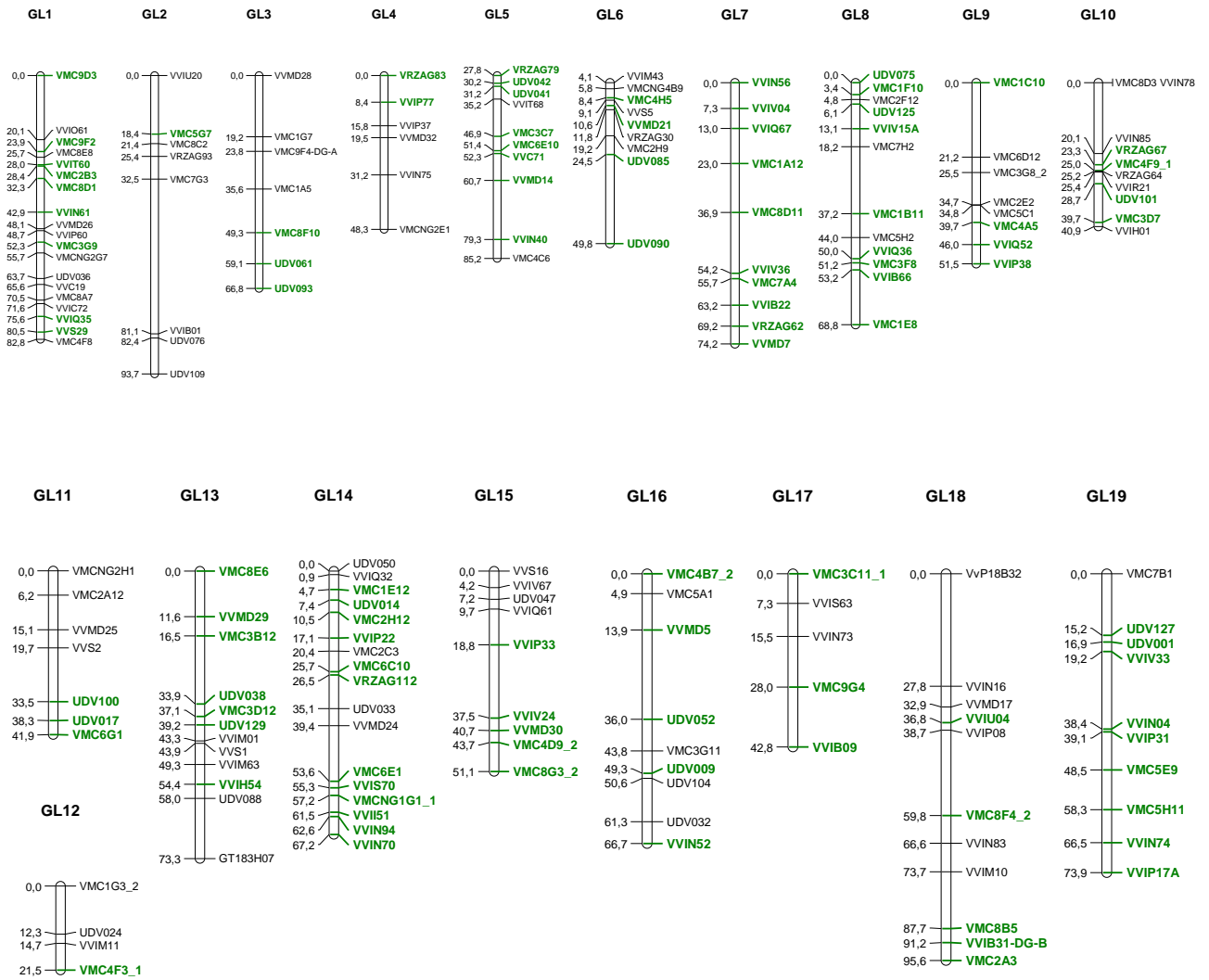


Figura 2.9. Mapa integrado “Framework” construído com base em uma família de 257 irmãos-completos do cruzamento dos híbridos de *Vitis vinifera* CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88. O mapa genético foi construído com 187 marcadores microssatélites, empregando o software JoinMap v3.0, com $\text{LOD} \geq 4$ para análise de ligação, pela estratégia de pseudo-cruzamento teste. A distância cumulativa entre os marcadores em cM, calculada com a função Kosambi, está indicada do lado esquerdo dos grupos de ligação. Os locos microssatélites destacados em verde segregaram para ambos os genitores.

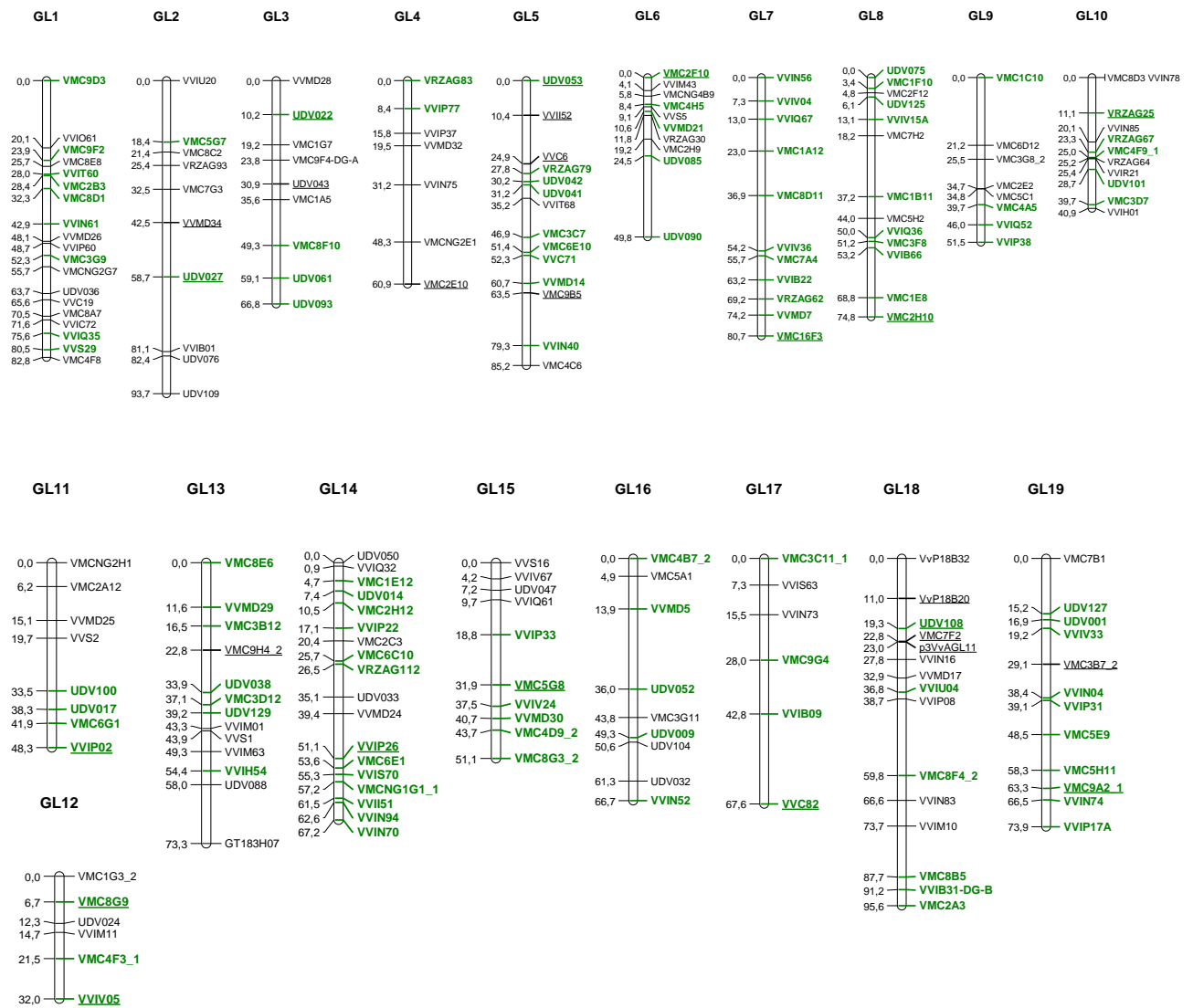


Figura 2.10. Mapa integrado “Full” construído com base em uma família de 257 irmãos-completos, do cruzamento dos híbridos de *Vitis vinifera* CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88. O mapa genético foi construído com 209 marcadores microsatélites, empregando o software JoinMap v3.0, com $LOD \geq 4$ para análise de ligação, pela estratégia de pseudo-cruzamento teste. A distância cumulativa entre os marcadores em cM, calculada com a função Kosambi, está indicada do lado esquerdo dos grupos de ligação. Os locos microsatélites destacados em verde segregaram para ambos os genitores. Marcadores com segregação Mendeliana distorcida estão sublinhados.

2.3.4 Construção de mapas genético dos parentais

O mapa referente ao genitor feminino (GF) CNPUV 733-34, consistiu de 165 marcadores alinhados ao longo dos 19 grupos de ligação, e cobriu 1.104,47 cM, com uma distância média entre os marcadores de 6,69 cM. O mapa do genitor masculino (GM) CNPUV 1103-88 consistiu de 128 marcadores cobrindo 957,81 cM, com uma distância média entre os marcadores de 7,48 cM. Ambos os mapas foram construídos após a segunda rodada do JoinMap, utilizado um LOD *score* para agrupamento igual a 4,5 (Tabela 2.5 e Figura 2.11). O fato de haver um maior número de marcadores segregando no parental materno, em relação ao parental paterno, é um indicativo de uma maior heterozigosidade nesse genitor, resultando em uma maior cobertura genômica. A ordem dos marcadores de ambos os mapas foram geralmente consistentes, apesar de alguns conjuntos de marcadores invertidos terem sido observados nos grupos de ligação 1, 8, 13 e 19 (Figura 2.11).

Ambos os mapas formaram 19 grupos de ligação, que é consistente com o número de cromossomos da espécie e foram comparados e numerados de acordo com o mapa de referência (Doligez *et al.*, 2006). Essa comparação permitiu verificar que nenhum marcador foi agrupado em cromossomos diferentes, mesmo com ocasional baixa cobertura em um determinado grupo de ligação. O que ocorre entre os mapas são apenas diferenças de ordenação, principalmente entre marcadores próximos. A maior distância encontrada entre marcadores nos grupos de ligações de ambos os mapas foi de 17,77 cM (Figura 2.11).

Tabela 2.5. Resumo de informações geradas pela construção do mapa integrado dos genitores de *Vitis vinifera* CNPUV 733-34 e CNPUV 1103-88, utilizando o software JoinMap.

Mapa genitor feminino (GF)				Mapa genitor masculino (GM)		
Cromossomo	Nr. SSR	Distância		Nr. SSR	Distância (cM)	Distância média (cM)
		Distância (cM)	média (cM)			
C1	16	82,04	5,13	12	84,06	7,00
C2	8	73,66	9,21	3	47,32	15,77
C3	7	65,40	9,34	4	49,08	12,27
C4	2	9,37	4,68	6	49,35	8,23
C5	10	59,07	5,91	8	53,24	6,65
C6	9	50,74	5,64	5	52,28	10,46
C7	10	76,22	7,62	10	76,22	7,62
C8	11	70,03	6,37	10	72,62	7,26
C9	8	51,46	6,43	3	12,49	4,16
C10	6	34,17	5,70	7	36,58	5,23
C11	7	43,92	6,27	3	10,59	3,53
C12	4	24,45	6,11	3	25,33	8,44
C13	12	72,69	6,06	7	56,99	8,14
C14	14	67,13	4,79	15	66,25	4,42
C15	9	51,06	5,67	4	16,20	4,05
C16	5	71,50	14,30	9	66,66	7,41
C17	5	43,99	8,80	3	42,94	14,31
C18	12	85,91	7,16	7	82,98	11,85
C19	10	71,68	7,17	9	56,64	6,29
Total	165	1104,47	6,69	128	957,81	7,48

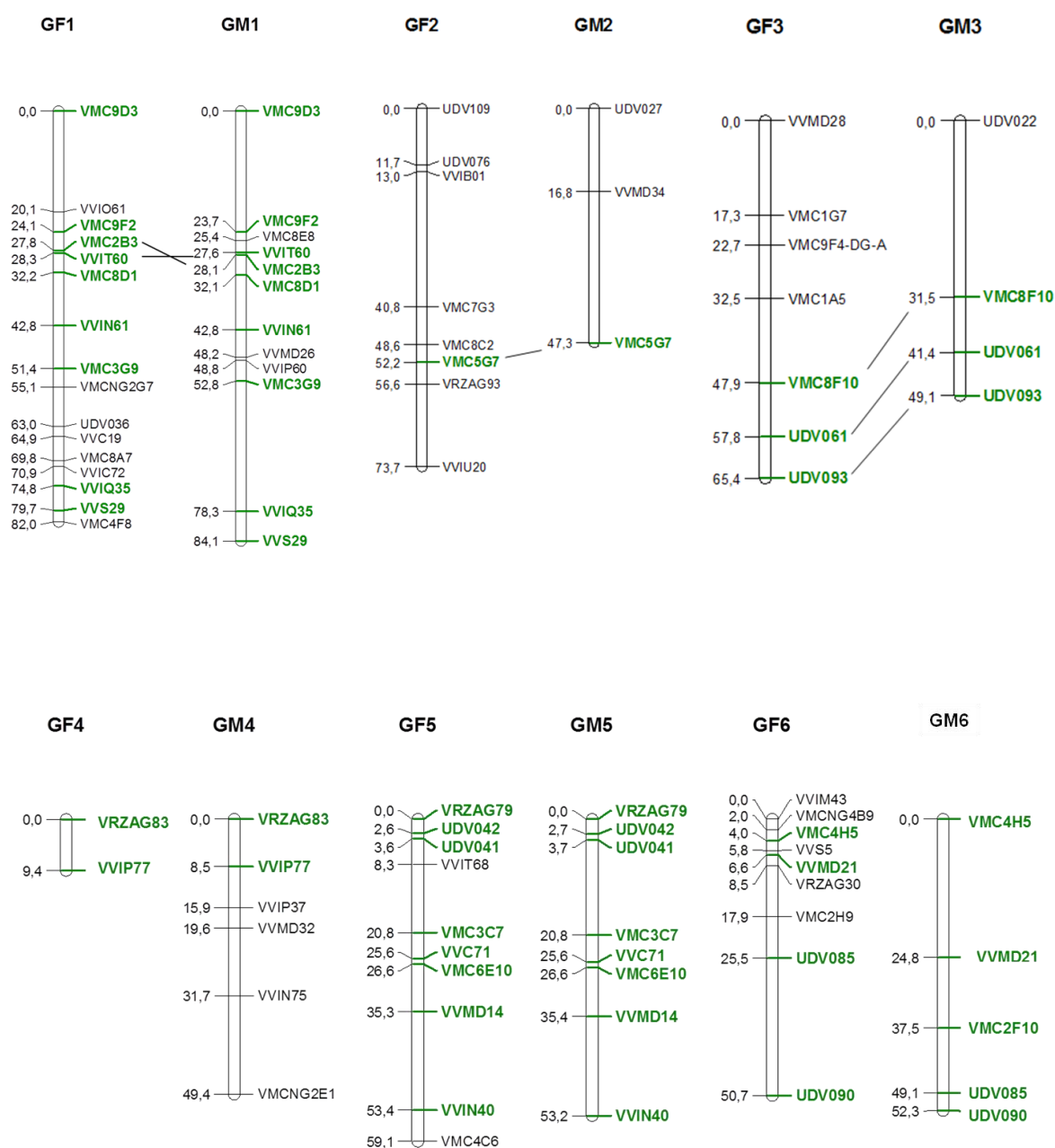


Figura 2.11. Mapa genético dos genitores feminino (GF) CNPUV 733-34 e masculino (GM) CNPUV 1103-88, construídos com base em uma família de 257 irmãos-completos, pela estratégia de pseudo-cruzamento teste. As linhas ligam os marcadores microssatélites completamente informativos mapeados em ambos os parentais, destacados em verde.

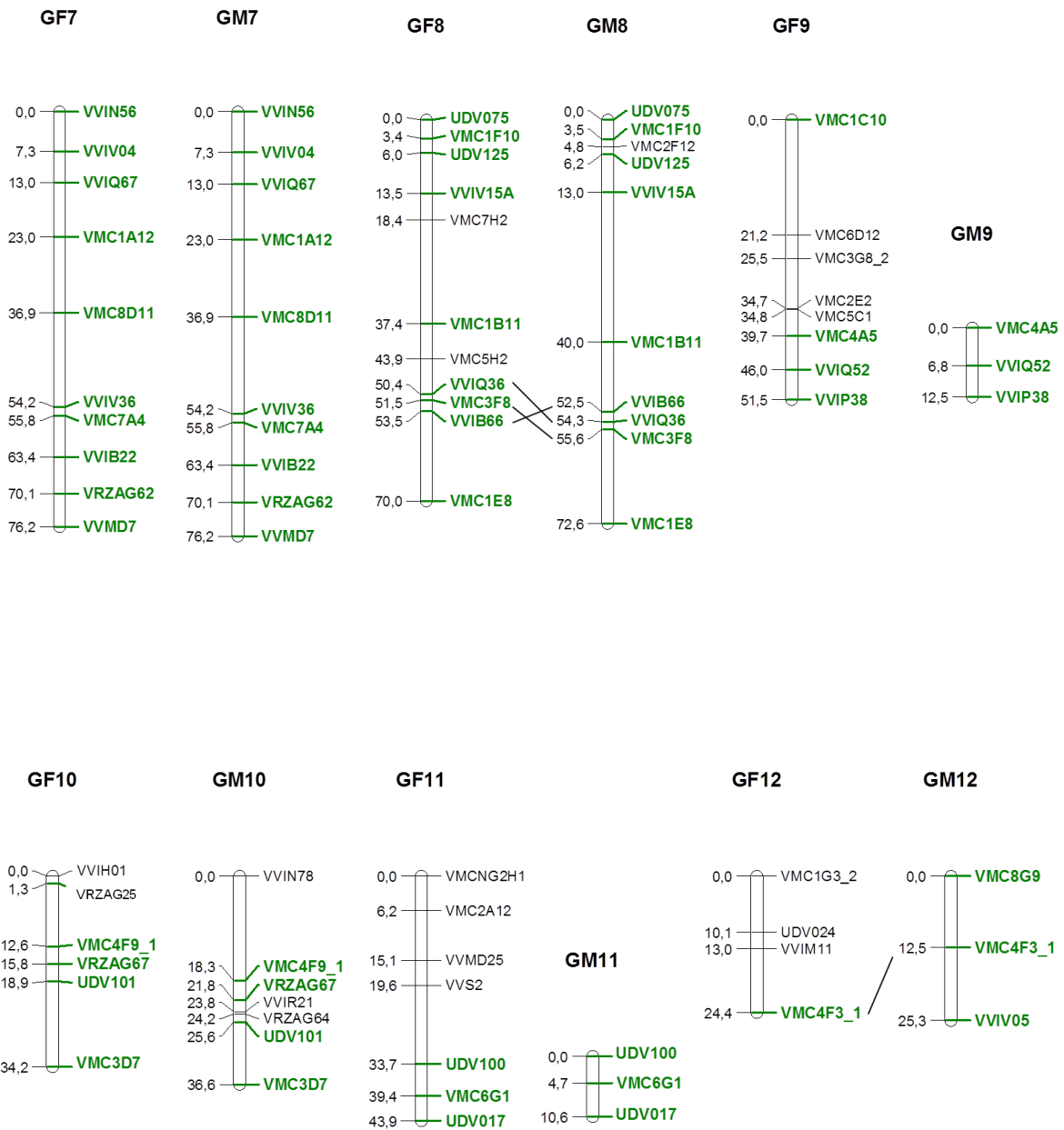


Figura 2.11. Continuação

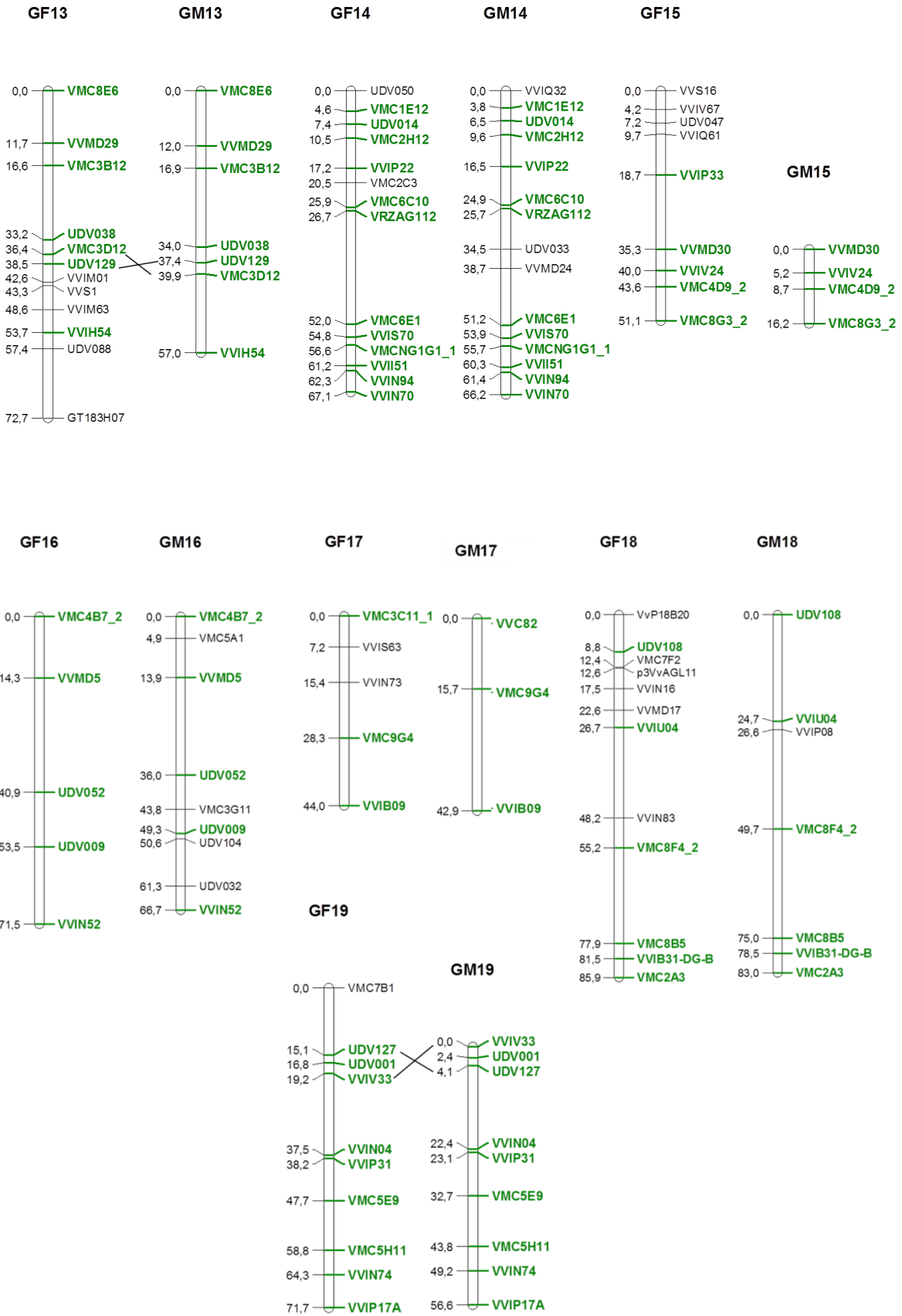


Figura 2.11. Continuação

O estabelecimento de um mapa genético é um procedimento importante para análise e localização de características de interesse dentro do genoma de *Vitis*. Mapas genéticos construídos para espécies de videira variaram em tamanho desde 800 a 1600 cM. Neste estudo, o mapa integrado (*framework*) construído com 187 marcadores, cobriu 1.149,51 cM Kosambi, com uma distância média entre os marcadores de 6,28 cM. O mapa *full*, obtido após a terceira rodada de ordenamento do JoinMap, constituiu de 209 marcadores e cobriu 1.262,8 cM, com uma densidade média de marcadores a cada 6,04 cM. Ambos os mapas (*framework* e *full*) representaram 77,4% e 76,7% da cobertura dos mapas integrados de *V. vinifera* utilizados como referência (Doligez *et al.*, 2006), que apresentaram uma cobertura de 1.485 cM e 1.647 cM e distâncias média entre os locos de 6,2 cM e 3,3 cM, respectivamente. O tamanho final do mapa *framework* foi apenas 8,97% menor que o mapa *full* (Tabela 2.4). Ambos os mapas foram alinhados com os 19 grupos de ligação de videira e mostraram-se consistentes com outros mapas já publicados na literatura (Adam-Blondon *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2004; Riaz *et al.*, 2004; Fanizza *et al.*, 2005; Doligez *et al.*, 2006; Troglio *et al.*, 2007; Costantini *et al.*, 2008; Marguerit *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2011).

O mapa integrado “*full*” visou posicionar um maior número de marcadores e não teve por objetivo a detecção de QTLs. Este mapa possibilitou uma cobertura de aproximadamente 76% do genoma, sendo que os mapas individuais cobriram 1.104,47 cM no parental feminino e 957,81cM no parental masculino (Tabela 2.5). O parental feminino possui um maior número de marcadores segregantes em relação ao parental masculino. Esse fato mostra que o genitor híbrido feminino, derivado do cruzamento entre *Seyve Villard* 18315 x *Fantasy seedless* possui um maior nível de heterozigosidade do que o genitor híbrido masculino, derivado do cruzamento CNPUV 659-4 x *Superior Seedless*. Esse resultado pode ser explicado pela diferenciação genética maior entre os acessos *Seyve Villard* 18315 e *Fantasy*

seedless do que entre *Superior Seedless* e CNPUV 659-4, aumentando as probabilidades de observar genótipos mais heterozigotos no híbrido.

Os marcadores completamente informativos, localizados nos mapas de ambos os parentais, indicam que os mapas gerados explicam adequadamente os dados genotípicos levantados e são consistentes com o mapa de referência utilizado. Apesar da presença de algumas inversões de ordem entre os marcadores posicionados a distâncias curtas, os mapas individuais apresentarem uma consistência da ordem dos marcadores dentro de cada grupo de ligação. Além disso, nenhum marcador foi agrupado em grupo de ligação diferente daquele esperado pelo mapa de referência, indicando que o rigor estatístico utilizado foi adequado.

2.3.5 Fenotipagem da população segregante do cruzamento entre CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 em campo e em bioensaios de laboratório

Inicialmente, testes com folhas destacadas infectadas artificialmente foram realizados para determinar o nível de resistência ao míldio em condições controladas. Avaliações preliminares de reação diferencial dos genitores com 10 isolados de míldio identificaram o isolado DF-PL1 como capaz de induzir reação de hipersensibilidade em CNPUV 733-34 (resistente) e de provocar doença no genitor CNPUV 1103-88 (suscetível) (Figura 2.12).

Folhas destacadas de 191 clones F1 e os seus genitores (CNPUV 733-34 e CNPUV 1103-88) foram inoculadas com o isolado de *P. viticola* DF-PL1 em bioensaio independentes com três repetições. A avaliação do fenótipo da interação patógeno-hospedeiro indicou segregação para resistência ao mildio nesta família de irmãos-completos.

Os resultados indicaram que o fenótipo da interação patógeno-hospedeiro foi eficientemente avaliados nas condições do bioensaio utilizando uma escala de notas variando de 1 a 9 em ordem crescente de suscetibilidade. As notas relativas a incompatibilidade (resistência, notas 1 e 3) foram confirmadas através da detecção de reação de hipersensibilidade (HR) através do microscópio de luz. Os clones de videira usados como controle apresentaram as reações de esperadas. CNPUV 733-34 é resistente ao isolado DF-PL1 de *P. viticola* (nota 3), apresentado uma reação HR típica, enquanto CNPUV 1103-88 apresentou uma reação de compatibilidade (suscetível, nota 9), com desenvolvimento progressivo e intenso da doença.

A reação de hipersensibilidade é o mais importante sintoma a distinguir os genótipos resistentes dos suscetíveis. Esta reação está sempre associada com redução significativa do desenvolvimento da doença. No ponto de inoculação das folhas que apresentaram notas 1 e 3, o ataque do patógeno não progrediu e ficou restrito à área coberta pelo inóculo, com desenvolvimento limitado e disperso de pequenos agrupamentos de esperângio/micélio restrito ao ponto de inóculo.

A distribuição das notas atribuídas à progênie F1 indicou uma prevalência de clones classificados como suscetíveis (notas 5 a 9) em relação a clones resistentes (notas 1 a 3). Testes de normalidade corroboraram esta observação (skewness= -0,4432, p=0,0122; kurtosis= -0,06952, p=0,9477); Kolmogorov-Smirnov= D=0,2791, p<0,0001, normalidade rejeitada). Não há evidência de controle monogênico dominante ($\chi^2= 111,18$, p<0,0001) ou de controle digênico dominante ($\chi^2= 16,59$, p<0,0001) para resistência ao isolado DF-PL1, baseado na segregação de reações compatíveis e incompatíveis da progênie F1. A análise dos dados desta progênie indica que a resistência mília da videira é

quantitativa, conforme previamente discutido em estudos anteriores (Eibach et al., 2007; Moreira et al., 2011).

O bioensaio mostrou-se, portanto, uma metodologia acurada de mensurar o fenótipo da interação entre *P. viticola* e videira, e pode ser recomendado para aplicação na análise genética de resistência ao míldio. Um teste não-paramétrico (Friedman) indicou que não há diferença significativa entre as notas atribuídas a cada clone nas diferentes repetições experimentais ($F = 0,9190$; $p\text{-value}=0,3997$).

A resposta da interação patógeno/hospedeiro, calculada pela média das avaliações dos bioensaios, mostrou que 1,2% das plantas apresentaram elevada resistência (nota 1), 11% apresentaram resistência (nota 3), 30,8% resistência moderada (nota 5), 45% apresentaram reação de susceptibilidade (nota 7) e 12,1% apresentaram elevada susceptibilidade (nota 9). A ilustração dos sintomas de infecção por *Plasmopara viticola* na população F1, durante avaliações de bioensaio é apresentada na Figura 2.14.

As notas médias das avaliações dos clones da progênie F1 em 2010 e 2011 em condições de campo, submetidas a uma análise não-paramétrica pelo Wilcoxon Signed Rank Test, revelaram um valor de W de 759 (1 g.l.), com um valor de p ($p\text{-value}$) igual a 0,02. Isto significa que a diferença de comportamento dos clones da progênie F1 com relação à infecção natural com míldio no campo nos dois anos seguidos foi significativa a 5%, mas não a 1%. A resposta da interação patógeno/hospedeiro, calculada pela média das avaliações de campo, é apresentada na Figura 2.13. Na Tabela 2.6, são apresentadas as estatísticas descritivas das avaliações de resistência ao míldio desta progênie, avaliados no campo e em bioensaios de laboratório. Observa-se que o comportamento da progênie F1 nas avaliações de resistência ao míldio em condições de campo foram muito similares ao observado nas três repetições do bioensaio, realizadas em condições laboratoriais.

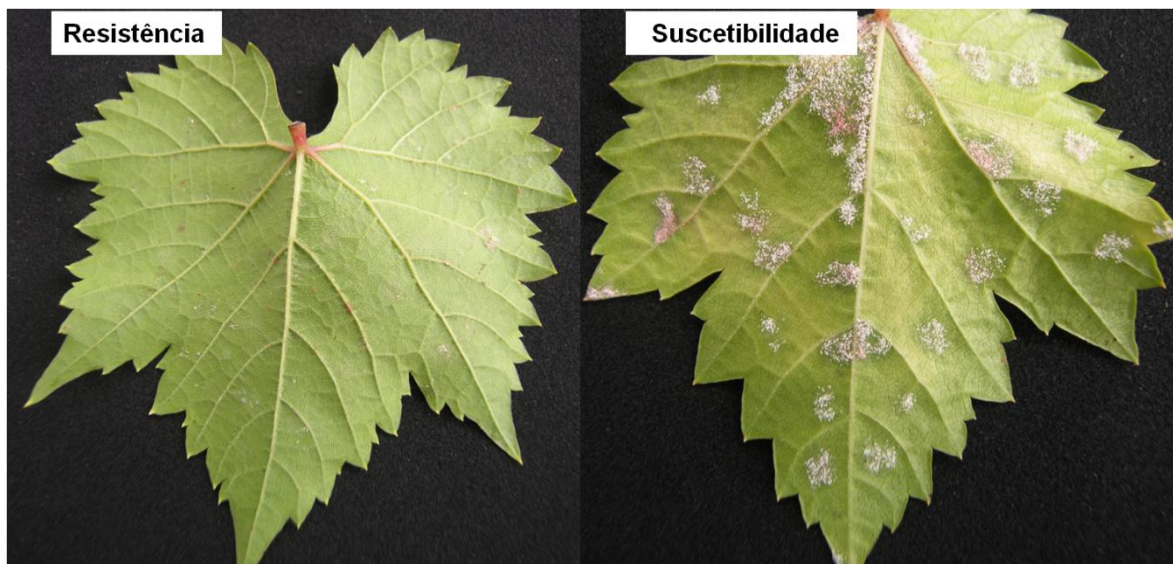


Figura 2.12. Fenótipo da interação patógeno-hospedeiro entre o isolado de *Plasmopara viticola* (DF-PL1), coletado em Planaltina-DF, inoculado nos genitores da progênie F1 do cruzamento de *Vitis vinifera* CNPQU 733-34 (esquerda, resistente) e CNPQU 1103-88 (direita, suscetível). O isolado DF-PL1 foi utilizado no bioensaio de resistência/suscetibilidade da progênie F1.

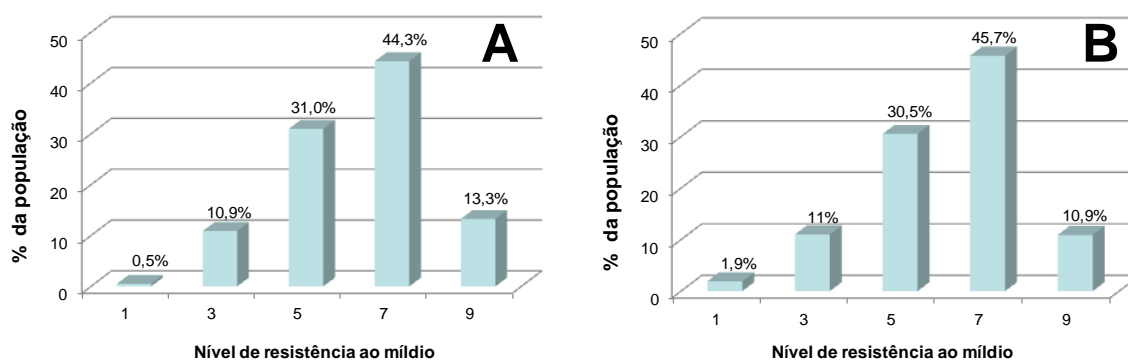


Figura 2.13. Distribuição de frequência (%) para o grau de infecção de *Plasmopara viticola* em uma população derivada do cruzamento de CNPQU 733-34 x CNPQU 1103-88 (N = 257), em condições de campo em 2010 e 2011 (A) e bioensaio em três repetições (B). A avaliação dos sintomas foi classificada de acordo com os descritores das Tabelas 2.2 e 2.3. Foram classificados como resistentes os indivíduos que apresentaram notas 1 a 3 e suscetíveis quando apresentaram notas de 5 a 9.

Tabela 2.6. Estatísticas descritivas das avaliações da progênie F1 do cruzamento de *Vitis vinifera* CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 para resistência ao míldio, em condições de campo e bioensaio de laboratório. Onde: R1= Repetição 1; R2= Repetição 2 e R3= Repetição 3.

Ensaio	Média	Variância	Desvio padrão
Campo 2010	6,12	2,79	1,67
Campo 2011	5,91	3,41	1,85
Bioensaio R1	5,72	4,94	2,22
Bioensaio R2	5,71	5,20	2,29
Bioensaio R3	5,64	5,39	2,32
Média	5,82	4,35	2,07

Os resultados indicam que as avaliações de campo e bioensaio apresentam correlação alta e significativa (p -value $<0,01$) em todas as comparações par-a-par. Indicam ainda que o fenótipo da interação patógeno-hospedeiro, causada pelo isolado DF-PL1 (coletado em Planaltina, DF) é altamente correlacionado com infecções naturais de míldio ocorridas na mesma população em Jales, SP. É possível que o isolado do Distrito Federal tenha se originado dessa região de São Paulo, visto que o plantio de videira no DF é recente e parte das mudas originais foram trazidas de São Paulo.

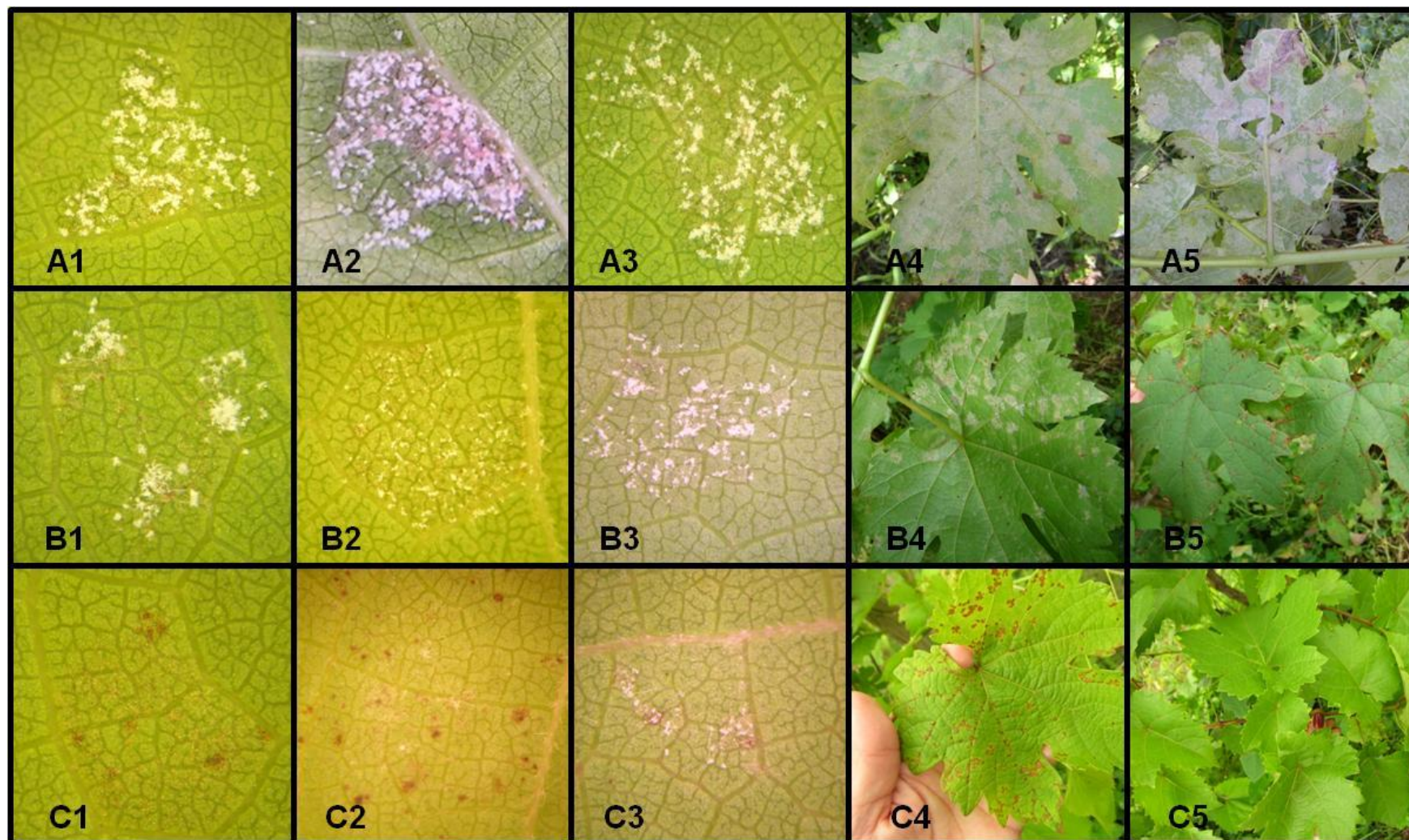


Figura 2.14. Sintomas de *Plasmopara viticola*, mostrando resistência e suscetibilidade da população F1, durante as avaliações do bioensaio em folhas destacadas (A1-A3; B1-B3; C1-C3) e condições de campo (A4-A5; B4-B5; C4-C5). A1-A5: genótipos altamente suscetíveis; B1-B5: genótipos mediantemente suscetíveis e C1-C5: genótipos resistentes.

2.3.6 Mapeamento de QTLs de resistência ao míldio

Os dados fenotípicos das duas avaliações de campo (Campo 2010 e Campo 2011) e dos três bioensaios desenvolvidos em condições controladas (Bioensaio R1, Bioensaio R2 e Bioensaio R3) foram utilizados, juntamente com os dados de genotipagem com marcadores microssatélites da progênie F1, para mapear regiões do genoma de videira associadas ao controle genético de resistência a *P. viticola*. A detecção de QTLs associados ao controle de resistência ao míldio foi realizada usando os mapas de cada genitor separadamente, com alto suporte de verossimilhança ($LOD > 3.0$) para ordenamento dos marcadores dentro dos grupos de ligação, utilizando o programa QTL Cartographer.

Pela Análise de Marca Simples, observou-se que a resistência ao míldio está associada significativamente ($p\text{-value} \leq 0,01$) a marcadores microssatélites no mapa do genitor feminino distribuídos em 4 cromossomos (5, 8, 18, 19). Nestes cromossomos, grupos de marcadores, alguns fortemente ligados, estão associados ao controle de resistência a *P. viticola*: quatro locos no cromossomo 5, um loco no cromossomo 8, sete locos no cromossomo 18 e três locos no cromossomo 19 (Tabela 2.7). No mapa do genitor masculino foram identificados dois marcadores associados ao controle de resistência a *P. viticola*: um no cromossomo 10 e outro no cromossomo 16 (Tabela 2.7). Deve ser observado que os marcadores identificados no mesmo grupo de ligação estão ligados e, portanto, possivelmente estão associados ao mesmo QTL do genoma que controla resistência ao míldio naquele cromossomo. Os valores de R^2 mais significativos foram observados para marcadores situados no cromossomo 18 e cromossomo 5 (em negrito) (Tabela 2.7).

Tabela 2.7. Resultados apresentados pela Análise de Marca Simples utilizando o programa QTL Cartographer. Marcadores associados à característica fenotípica de resistência ao míldio, avaliados na população segregante de *Vitis vinifera*, em condições de campo e bioensaio, para o genitor feminino CNPUV 733-34 e masculino CNPUV 1103-88.

Característica	Genitor	Cromossomo	Marcador	Posição (cM)	R ²
Míldio	733-34	5	VRZAG79	0,0	0,0255 **
Míldio	733-34	5	UDV042	2,6	0,0128 **
Míldio	733-34	5	UDV041	3,6	0,0603 **
Míldio	733-34	5	VVIT68	8,3	0,0184 *
Míldio	733-34	8	VMC1E8	70,0	0,0124 *
Míldio	733-34	18	VvP18B20	0,0	0,0629 **
Míldio	733-34	18	UDV108	8,8	0,0604 **
Míldio	733-34	18	VMC7F2	12,4	0,0116 **
Míldio	733-34	18	p3VvAGL11	12,6	0,1529 **
Míldio	733-34	18	VVIN16	17,5	0,0924 **
Míldio	733-34	18	VVMD17	22,6	0,0343 **
Míldio	733-34	18	VVIU04	26,7	0,0885 **
Míldio	733-34	19	VVIN04	37,5	0,0100 *
Míldio	733-34	19	VMC5E9	47,7	0,0282 *
Míldio	733-34	19	VMC5H11	58,8	0,0201 *
Míldio	1103-88	10	VMC3D7	36,6	0,0232 *
Míldio	1103-88	16	VMC3G11	43,8	0,0129 *

Significativo a 1% (*) e 0,1% (**).

Marcadores significativamente ligados a QTL para resistência ao míldio foram identificados apenas no mapa do genitor feminino CNPUV 733-34, utilizando a metodologia de Intervalo Simples (Tabela 2.8). Dois QTLs (C18-1 e C18-2) foram detectados no GL18 e apresentam picos nos intervalos VMC7F2-VVIN16 (posição 17 cM) e VVIV04-VVIN83 (posição 24 cM). Estes QTLs explicam entre 10,56% a 21,08% da variação fenotípica de resistência ao míldio, observada na progênie F1 (Tabela 2.8). Um pequeno QTL foi detectado no GL 5, apenas na análise de campo em 2011 e explica 7,47% da variação fenotípica (Tabela 2.8).

O QTL C18-1 (intervalo VMC7F2-VVIN16) foi estável, mostrando efeitos significativos nas avaliações de campo durante dois anos e nas três repetições do bioensaio

(Tabela 2.8; Figura 2.15). O intervalo VMC7F2-VVIN16 do QTL C18-1, detectado na avaliação no campo em 2011, explicou a maior variação fenotípica, com R^2 de 14,47% (Tabela 2.8; Figura 2.15).

O QTL C18-2 (intervalo VVIV04-VVIN83) também foi estável, mostrando efeitos significativos nas avaliações de campo durante dois anos e nas três repetições do bioensaio (Tabela 2.8; Figura 2.15). O intervalo VVIU04-VVIN83 do QTL C18-2, detectado na avaliação no campo em 2010, explicou a maior variação fenotípica, com R^2 de 21,08% (Tabela 2.8; Figura 2.15). Os efeitos aditivos da resistência a *P. viticola* em condições de campo e bioensaio foram provenientes do genitor materno (CNPUV 733-34). Para essa característica foi observada segregação transgressiva, ou seja, detectou-se indivíduos que revelaram desempenho superior ao do parental materno, recebendo nota 1 na avaliação de resistência ao míldio em campo e bioensaio.

Tabela 2.8. Informações sobre os QTLs identificados pelo modelo de Mapeamento por Intervalo Simples para características de resistência à *Plasmopara viticola* na população segregante F1 do cruzamento de *Vitis vinifera* CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 (genitor feminino), sob condições de campo e bioensaio.

Característica	Cromossomo	Posição (cM)	LOD	Efeito Aditivo	R^2
Campo 2011	5	3,01	3,48969	0,9163	0,07475
Campo 2010	18	14,01	6,80347	-1,2647	0,14133
Campo 2010	18	31,01	5,21824	-1,5456	0,21083
Campo 2011	18	17,01	7,11835	-1,4128	0,14476
Campo 2011	18	24,01	6,52986	-1,3899	0,14126
Bioensaio R1	18	17,01	5,9392	-1,5662	0,12278
Bioensaio R1	18	29,01	5,08578	-1,813	0,16425
Bioensaio R2	18	16,01	5,49837	-1,5577	0,11514
Bioensaio R2	18	30,01	5,17047	-1,9766	0,18515
Bioensaio R3	18	12,01	5,11618	-1,5224	0,10561
Bioensaio R3	18	30,01	4,2519	-1,8167	0,15111

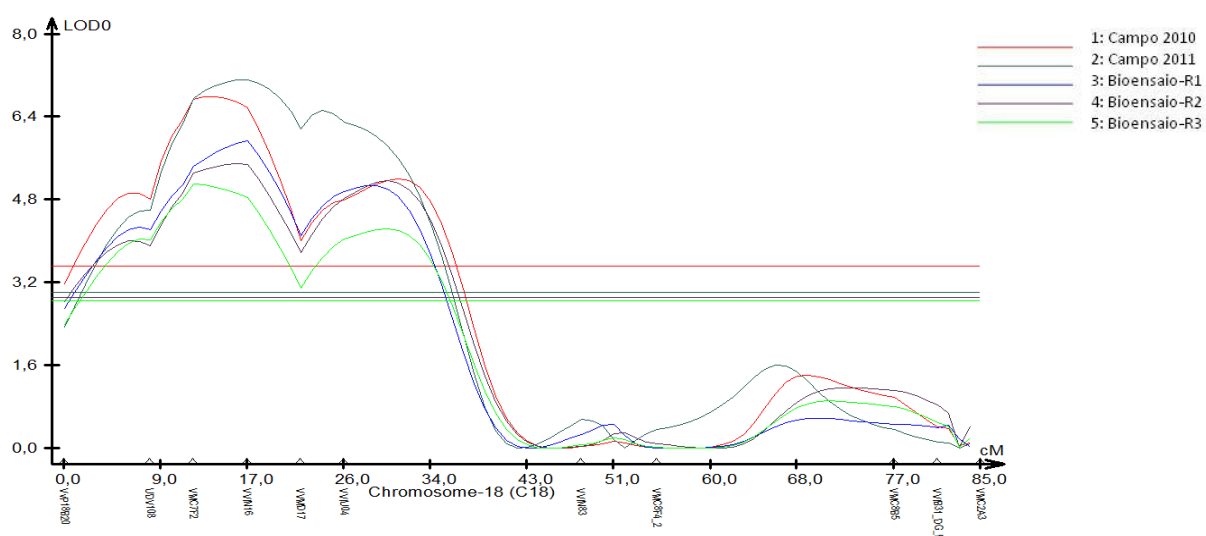


Figura 2.15. Variação de valores de LOD no Grupo de Ligação 18, identificando QTLs para resistência ao míldio detectado com base em cinco avaliações de resistência realizadas em campo (2010, 2011) e em bioensaio de laboratório (R1, R2, R3). A análise foi realizada por mapeamento por Intervalo Simples e estratégia de pseudo-cruzamento teste, no genoma do genitor feminino (CNPUV 733-34). Valor mínimo de LOD de 3,5, representado pela linha horizontal vermelha.

Pela análise de Intervalo Composto, foram mapeados apenas três QTLs significativamente associados à resistência ao míldio, nos grupos de ligação 18 e 5, detectados apenas no mapa do genitor feminino (CNPUV 733-34). Inicialmente, um QTL de pequeno efeito na resistência ao míldio no cromossomo 5, com LOD 2,9 cM, foi detectado com base nos dados de avaliação para resistência ao míldio no campo da população F1, no ano de 2011. Este QTL explica 6% da variação fenotípica (Tabela 2.9; Figura 2.16). O pico do LOD score está mapeado na posição 3,01 cM (intervalo UDV041-UDV042) no cromossomo 5. Os efeitos aditivos negativos destes QTLs são contribuídos pelo parental masculino (Tabela 2.9).

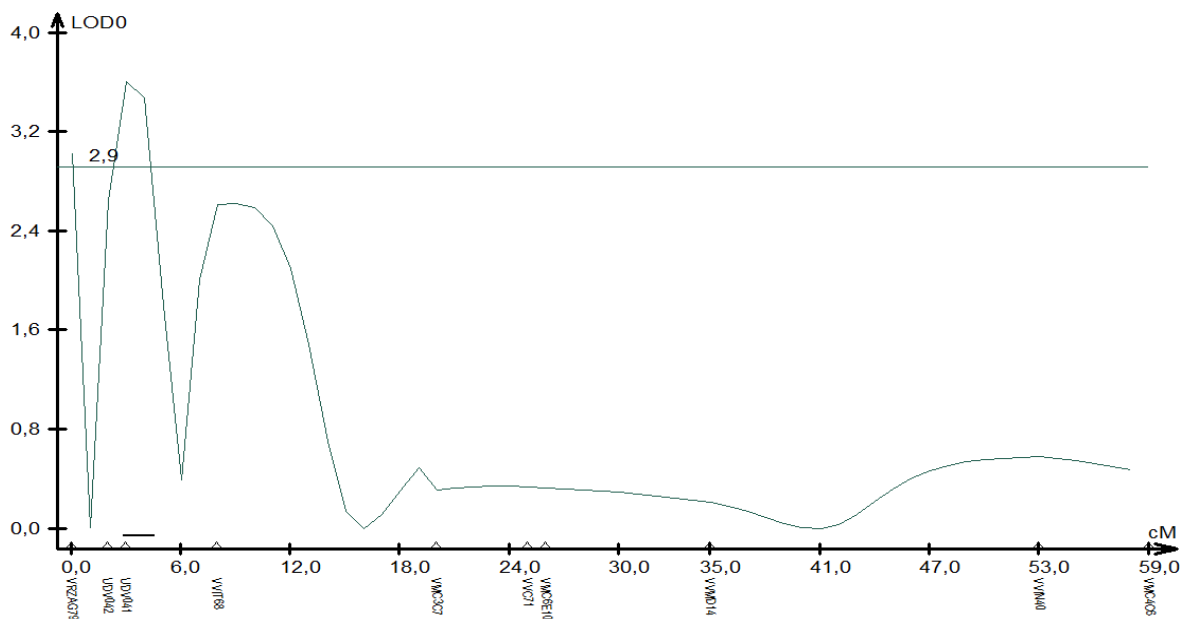


Figura 2.16. Variação de valores de LOD no Grupo de Ligação 5, identificando QTL para resistência ao míldio da videira, em condições de campo no ano de 2011, mapeado por Intervalo Composto no genoma do parental materno (CNPUV 733-34). Eixo Y: valor de LOD; Eixo X: intervalo entre os marcadores do grupo de ligação. O valor crítico de LOD definido pelo teste de 1000 permutações com 5% de significância foi de 2,9.

Dois QTLs foram detectados no GL18 (C18-1 e C18-2) por mapeamento de Intervalo Composto e apresentam picos nos intervalos VMC7F2-VVIN16 (posição 17 cM) e VVIV04-VVIN83 (posição 29 cM). Estes QTLs explicam entre 10,9% a 22,3% da variação fenotípica de resistência ao míldio, observada na população F1 (Tabela 2.9). C18-1 foi estável, mostrando efeitos significativos nas avaliações de campo durante dois anos e nas três repetições do biensaio (Tabela 2.9; Figura 2.17). O intervalo VMC7F2-VVIN16 do QTL C18-1, detectado no biensaio R2, explicou a maior variação fenotípica, com R^2 de 22,3% (Tabela 2.9; Figura 2.17). C18-2 (intervalo VVIV04-VVIN83) foi detectado pela análise de dados de resistência ao míldio nos ensaios de campo de 2011, e pelos bioensaios R1 e R2 (Tabela 2.9; Figura 2.17). Os valores significativos de LOD variaram de 5,7 a 7,6 (Tabela 2.9; Figura 2.17). Os efeitos aditivos da resistência a *P. viticola* em condições de campo e biensaio foram provenientes do genitor materno (CNPUV 733-34).

Tabela 2.9. Informações sobre os QTLs identificados pelo modelo de Mapeamento por Intervalo Composto para características de resistência à *Plasmopara viticola* na população segregante F1 do cruzamento de *Vitis vinifera* CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 (genitor feminino), sob condições de campo e bioensaio.

Característica	Grupo de ligação	Intervalo	Posição cM	LOD	Efeito aditivo	R ² (%)
Campo 2011	5	UDV041-UDV042	3,01	3,9	0,9223	6,0
Campo 2010	18	UDV108-VVMD17	17,01	7,6	-1,2207	13,2
Campo 2011	18	VMC7F2-VVIN83	17,01	7,0	-1,3037	12,2
Bioensaio R1	18	UDV108-VVIN83	29,01	5,7	-1,8395	16,8
Bioensaio R2	18	UDV108-VVIN83	31,01	6,3	-2,1739	22,3
Bioensaio R3	18	UDV108-VVMD17	14,01	5,7	-1,5547	10,9

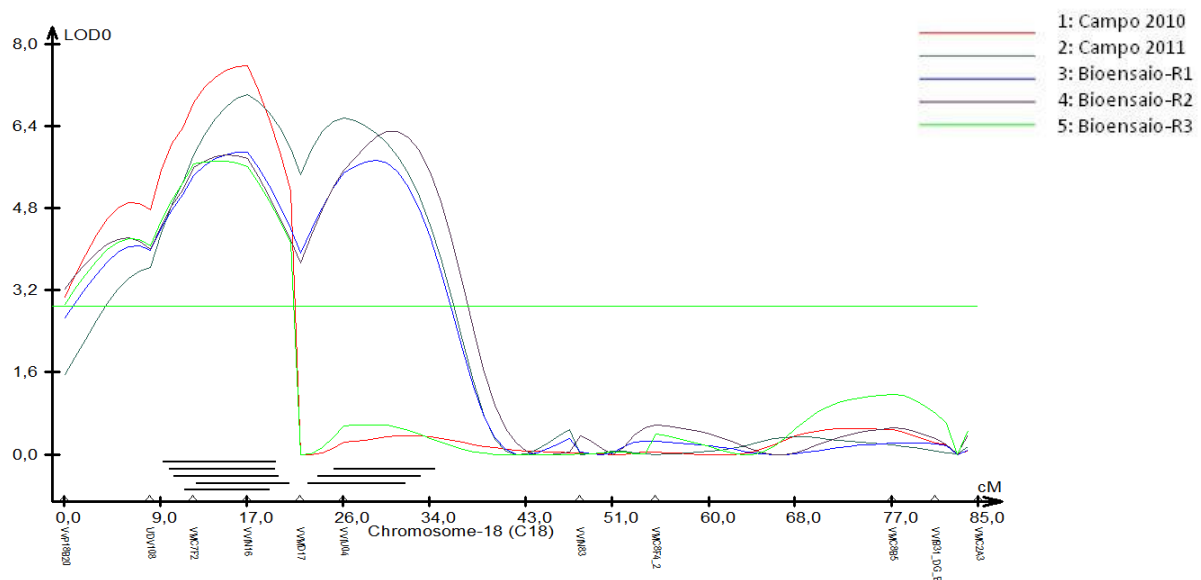


Figura 2.17. Variação de valores de LOD no Grupo de Ligação 18, identificando o QTL para resistência ao míldio da videira, detectado com base em cinco avaliações de resistência realizadas em campo (2010 e 2011) e em bioensaio (R1, R2, R3). Os QTLs foram mapeados por Intervalo Composto e estratégia de pseudo-cruzamento teste, no genoma do genitor feminino (CNPUV 733-34). Valor mínimo de LOD score de 2,9, representada pela linha horizontal verde.

A Tabela 2.10 apresenta os marcadores associados à resistência ao míldio pela análise de Intervalo Composto, detectados nos cromossomos 5 e 18, apresentando o tipo de segregação e identificando os alelos de cada genitor.

Tabela 2.10. Marcadores associados a resistência ao míldio da videira, detectados pela Análise de Intervalo Composto nos cromossomos 5 e 18, mostrando o tipo de segregação e os alelos do genitor feminino (GF) e do genitor masculino (GM).

Característica	Marcador	R ²	Cromossomo	Segregação	Alelos GF	Alelos GM
Míldio	UDV041	6	5	1:1:1:1	140/160	170/182
Míldio	UDV042	6	5	1:1:1:1	108/110	102/108
Míldio	VMC7F2	22.2	18	1:1	196/198	196/196
Míldio	VVIN16	22.2	18	1:1	143/153	153/153
Míldio	VVIU04	22.2	18	1:1:1:1	186/192	178/192
Míldio	VVIN83	22.2	18	1:1	231/235	233/233

Na Figura 2.18 pode ser observada a disposição dos QTLs identificados no mapa do parental feminino (CNPUV 733-34), assim como a localização dos intervalos de mapa nos respectivos cromossomos.

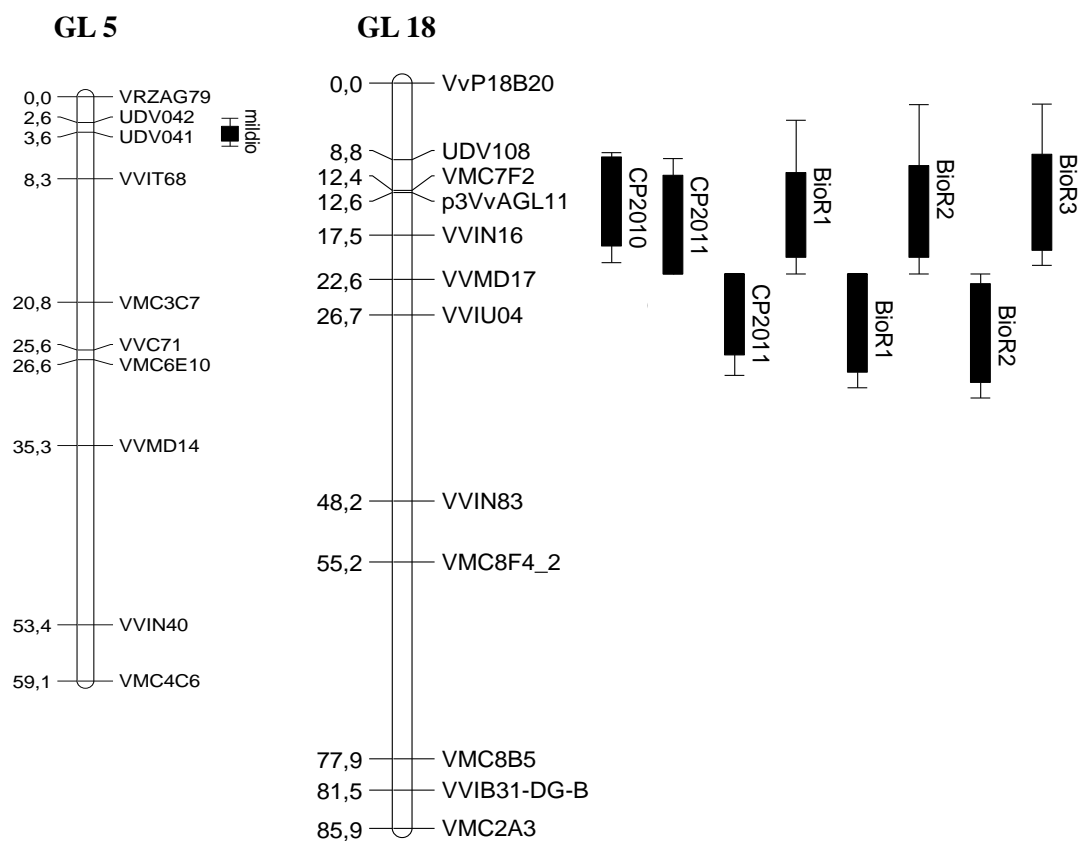


Figura 2.18. Localização dos QTLs de resistência ao míldio da videira, detectados nos grupos de ligação 5 e 18 do parental feminino (CNPUV 733-34), mapeados por método de Intervalo Composto. Onde: CP = avaliação de resistência a *Plasmopara viticola* no campo; Bio = Bioensaio de avaliação de resistência a *Plasmopara viticola* em condições controladas.

2.3.7 Localização dos QTLs de resistência ao míldio em videira

O mapeamento de QTLs de resistência a *P. viticola* para o cruzamento CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 detectou nas análises estatisticamente mais robusta (Mapeamento de Intervalo Simples e Mapeamento de Intervalo Composto) um total de três QTLs, um localizado no cromossomo 5 e dois no cromossomo 18. Os dois QTLs identificados no cromossomo 18 (C18-1 e C18-2) foram identificados pelas três análises estatísticas

realizadas: mapeamento de Marca Simples, Mapeamento de Intervalo Simples e Mapeamento de Intervalo Composto. A Tabela 2.11 fornece um sumário da análise de QTLs pelas três metodologias, os valores de LOD score (Intervalo Composto), porcentagem de variação explicada (Intervalo Composto) e os marcadores que os flanqueiam.

Tabela 2.11. Sumário de QTLs detectados no genoma do genitor feminino (CNPUV 733-34) pelas metodologias de mapeamento por Marcas Simples, Intervalo Simples e Intervalo Composto pela estratégia de pseudo-cruzamento teste. Estão descritos os grupos de ligação onde os QTLs foram detectados, seus valores de LOD, porcentagem de variação explicada e os marcadores que os flanqueiam, de acordo com estimativas de Mapeamento por Intervalo Composto.

GL	Característica	Avaliações	LOD	R ²	Marcadores dos Flancos
5	Míldio	Campo 2011	3,9	6,0	UDV041
18	Míldio	Campo 2010	7,6	13,2	VMC7F2, VVIN16
18	Míldio	Campo 2011	7,0	12,2	VVIN16, VVMD17, VVIU04
18	Míldio	Bioensaio R1	5,7	16,8	VMC7F2, VVIN16, VVMD17, VVIU04
18	Míldio	Bioensaio R2	6,3	22,3	VMC7F2, VVIN16, VVMD17, VVIU04
18	Míldio	Bioensaio R3	5,7	10,9	VMC7F2, VVIN16

A identificação de uma região genômica afetando a resistência a patógenos, através da análise de QTL, é um importante passo para isolar e caracterizar os genes de resistência. A metodologia mais comumente empregada para o isolamento de genes é a clonagem baseada em mapas de ligação. A caracterização de fontes de resistência a *P. viticola* em videira vem sendo intensificada nos últimos anos. Importantes QTLs de resistência ao míldio foram mapeados e denominados de locos de "Resistência a *Plasmopara viticola*" (*Rpv*). Por exemplo, dois QTLs nomeados *Rpv1* e *Rpv2*, localizados nos cromossomos 12 e 18, responsáveis pela resistência ao míldio derivada da espécie *M. rotundifolia*, foram recentemente identificados (Merdinoglu *et al.*, 2003; Wiedemann-Merdinoglu *et al.*, 2006). Em outros estudos, um QTL de grande efeito, denominado *Rpv3*, foi mapeado no cromossomo 18, responsável pela resistência ao

míldio derivada de espécies silvestres de videira Norte-americanas. Esta resistência foi aparentemente introduzida na variedade *Seyve Villard* (Welter *et al.*, 2007; Bellin *et al.*, 2009). Outros dois QTLs de grande efeito, nomeados *Rpv4* e *Rpv7*, foram detectados nos cromossomos 4 e 7, associados à resistência derivada de espécies silvestres de videira norte-americanas (Welter *et al.*, 2007; Bellin *et al.*, 2009). Três QTLs localizados nos cromossomos 9, 12 e 7, estão associados ao controle genético de resistência ao míldio derivado de *Vitis riparia* (Marguerit *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2011) e foram denominados de *Rpv5*, *Rpv6* e *Rpv9*, respectivamente. A resistência genética derivada de *Vitis amurensis* é atribuída a dois QTLs de grande efeito, denominados *Rpv8* e *Rpv12*, localizados no cromossomo 14 de videira (Blasi *et al.*, 2011; Venuti *et al.*, 2013). Finalmente, dois QTLs nos cromossomos 9 e 5 (Schwander *et al.*, 2011), denominados *Rpv10* e *Rpv11*, controlam resistência ao míldio da videira e são derivados da fonte de resistência *V. amurensis* (Tabela 2.12).

A detecção de QTLs de resistência ao míldio no presente trabalho foi realizada usando os mapas genéticos construídos para cada parental separadamente. Os mapas genéticos não cobriram o genoma de forma completa, mas possibilitaram o mapeamento de uma extensão significativa para possibilitar a pesquisa de regiões genômicas associadas ao controle genético de resistência a *P. viticola*. O número de marcadores efetivamente utilizado na confecção final dos mapas é relativamente pequeno (165 para GF e 128 para GM) (Tabela 2.5), apesar de todo o trabalho ter sido iniciado com cerca de 400 marcadores microssatélites. Este número e a densidade de marcadores nos mapas, contudo, é suficiente para detectar os QTLs de efeito significativo com o tamanho da progênie utilizada, considerando o forte desequilíbrio de ligação existente na progênie F1 utilizada no estudo.

Tabela 2.12. QTLs (*Quantitative Trait Loci*) identificados para resistência a *Plasmopara viticola* em diferentes espécies de videira (www.vivc.de/index.php).

Loco	Cromossomo	Fonte de Resistência	Marcadores associados	Referência
<i>Rpv1</i>	12	<i>M. rotundifolia</i>	VMC72, VVIB32	Merdinoglu <i>et al.</i> , 2003
<i>Rpv2</i>	18	<i>M. rotundifolia</i>	VVIU04	Wiedemann-Merdinoglu <i>et al.</i> , 2006
<i>Rpv3</i>	18	American wild species	UDV112, UDV305, VMC7F2	Welter <i>et al.</i> , 2007; Bellin <i>et al.</i> , 2009
<i>Rpv4</i>	4	American wild species	VMC7h3, VMCNg2e1	Welter <i>et al.</i> , 2007
<i>Rpv5</i>	9	<i>V. riparia</i>	VVIO52b	Marguerit <i>et al.</i> , 2009
<i>Rpv6</i>	12	<i>V. riparia</i>	VMC8G9	Marguerit <i>et al.</i> , 2009
<i>Rpv7</i>	7	American wild species	UDV097	Bellin <i>et al.</i> , 2009
<i>Rpv8</i>	14	<i>V. amurensis</i>	Chr14V015	Blasi <i>et al.</i> , 2011
<i>Rpv9</i>	7	<i>V. riparia</i>	VVIP02_R2	Moreira <i>et al.</i> , 2011
<i>Rpv10</i>	9	<i>V. amurensis</i>	GF09-46	Schwander <i>et al.</i> , 2011
<i>Rpv11</i>	5	<i>V. amurensis</i>	VCHR05C	Schwander <i>et al.</i> , 2011
<i>Rpv12</i>	14	<i>V. amurensis</i>	UDV304, rgVvin180	Venuti <i>et al.</i> , 2013
<i>Rpv13</i>	12	<i>V. riparia</i>	VMC1G3.2	Moreira <i>et al.</i> , 2011

Um QTL de pequeno efeito na resistência ao mildio foi identificado no GL 5, e foi significativo apenas em condições de campo, no ano de 2011. A presença de um grande QTL acompanhado por QTLs menores parece ser um fenômeno comum na resistência genética de plantas (Calenge *et al.*, 2005; Welter *et al.*, 2007). Estudos no genoma de *V. vinifera* revelaram que famílias de genes de resistência, envolvidos nos processos de defesa, tendem a ser localizados em maior proporção nos cromossomos 5, 7, 9, 12, 13, 18 e 19 (Di Gaspero & Cipriani, 2003; Di Gaspero *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2007; Moroldo *et al.*, 2008).

Dois QTLs com efeito moderado de resistência a *P. viticola* foram detectados no GL 18 (C18-1 e C18-2), explicando até 22,3% da variação fenotípica (Figura 2.18). Os dois QTLs estão ligados, com picos de detecção separados por 12 cM. Estes QTLs mapeiam na mesma região do genoma que contém QTLs de resistência ao mildio detectados em estudos anteriores com outras populações segregantes e com outros isolados (populações) do patógeno (Fischer *et al.*, 2004; Welter *et al.*, 2007; Bellin *et al.*, 2009). O intervalo do QTL C18-1 está entre os marcadores VMC7F2 e VVIN16, que estão separados por 5 cM. O intervalo do QTL C18-2 está entre os marcadores VVIU04 e VVIN83, separados por 22 cM. Os QTLs são estáveis, isto é, foram detectados nos dois anos em condições de campo e nas repetições do bioensaio em condições controladas de laboratório. Como a população do patógeno no campo é potencialmente complexa, localizada em um local onde foram isolados genótipos do fungo pertencentes a três subpopulações do patógeno (Capítulo 1), é possível que os QTLs mapeados sejam de amplo espectro de resistência, visto que o isolado usado nos bioensaios foi coletado em outra unidade da federação (Distrito Federal).

Uvas da América do Norte têm sido extensivamente cruzadas com *V. vinifera* em vários países, com o objetivo de introduzir genes de resistência. No Brasil, o

melhoramento genético da Embrapa Uva e Vinho vem desenvolvendo híbridos com diferentes fontes de resistência a *P. viticola*. Híbridos das séries “Seibel” e “Seyve Villard” foram importados para a introdução de genes de resistência de espécies norte-americanas no programa de melhoramento brasileiro, incluindo a espécie *V. vinifera*. De acordo com Cadle-Davidson (2008), *Seyve Villard*, também conhecida como *Villard blanc*, transmite para a progênie o mais alto nível de resistência ao míldio.

Neste trabalho observou-se que os alelos de resistência na população F1 nos QTLs mapeados por Intervalo Simples e por Intervalo Composto foram herdados do genitor feminino. O mapeamento de Marcas Simples, contudo, identificou dois marcadores (VMC3D7 e VMC3G11), localizados nos cromossomos 10 e 16, associados ao controle de resistência a *P. viticola* herdado do genitor masculino (CNPUV 1103-88). O *pedigree* de ambos os genitores inclui espécies silvestres norte-americanas utilizadas como fontes de resistência ao míldio, que potencialmente contribuíram para a herança dos genes de resistência.

A resistência transmitida do híbrido interespecífico CNPUV 733-34, utilizado como genitor feminino, pode ser derivada de *Seyve Villard* 18315 (*Villard Noir*). *Seyve Villard* 18315 potencialmente transmite à progênie diferentes níveis de resistência proveniente de espécies de *Vitis* silvestres norte-americanas e tem, no seu *pedigree*, as seguintes proporções: 7,04% de *V. labrusca*, 3,91% de *V. riparia*, 29,69% de *V. rupestris*, 9,38% de *V. aestivalis*, 1,56% de *V. cineria* e 48,42% de *V. vinifera*. Esses níveis de resistência foram recuperados em duas fontes: registros sobre as hibridações realizadas no âmbito do Programa ‘Uvas do Brasil’ e em outras hibridações realizadas anteriormente, recuperadas na base de dados *online* mantida pela instituição alemã “Instituto Julius Kühn” (Maul *et al.*, 2008).

A origem da resistência ao mildio do híbrido interespecífico CNPUV 1103-88, utilizado como genitor masculino, é mais complexa ainda, pois o seu pedigree inclui híbridos das séries “Seibel” e “Seyve Villard”, cuja constituição genética é composta por cinco diferentes espécies silvestres: *V. rupestris*, *V. aestivalis*, *V. cinerea*, *V. labrusca*, *V. lincecumii*, cultivares moscatel (Muscat à *petits grains*, Muscat of Alexandria, Muscat Hamburg e Sultana Moscata), além de variedades apirênicas Sultanina (Thompson seedless) e Ruby Seedless.

Bellin *et al.* (2009) mapearam QTLs de resistência ao mildio em progênie derivada de *Seyve Villard*. Um QTL de grande efeito na resistência a *P. viticola* foi mapeado na região do marcador VMC7F2 e foi chamado de *Rpv3*. Welter *et al.* (2007) demonstraram que entre os três QTL para resistência ao mildio, identificados na cultivar Regent, o maior e mais estável localizado no LG 18, associado com dois marcadores específicos de RGA (*Resistance gene analog*) indicam a presença de genes TIR-NB-LRR. O *pedigree* da fonte de resistência (Regent) utilizada no estudo é muito complexo, mas inclui acessos silvestres norte-americanos. No presente trabalho, o marcador VMC7F2 no cromossomo 18 também está identificado associado à resistência proveniente de *Seyve Villard* e foi localizado no intervalo de confiança do QTL C18-1 mapeado neste cromossomo. Este resultado sugere que a resistência encontrada no cruzamento CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 também refere-se à região genômica *Rpv3*. O marcador VVIU04 ligado ao loco de resistência *Rpv2* (Wiedemann-Merdinoglu *et al.*, 2006) proveniente de *M. rotundifolia*, no GL 18, também foi detectado associado à resistência ao mildio no presente estudo (Figura 2.18). Contudo, a espécie *M. rotundifolia* não é citada na composição do pedigree de *Seyve Villard*.

A seleção de genótipos com combinação de locos de resistência, ou piramidização de genes de diferentes locos de resistência em videira, foi descrita por

Eibach *et al.* (2007). Com base em seleção assistida por marcadores, os pesquisadores analisaram 119 genótipos e selecionaram 4, que carregavam alelos relacionados com a resistência ao míldio (gene *Rpv1*) e oídio (gene *Run1*), indicando que os genes de resistência de ambos os genitores foram efetivamente combinados para obtenção de plantas com maior grau de resistência. O uso de marcadores em seleção para resistência ao míldio flanqueando a região de diferentes genes de resistência pode tornar mais eficiente o processo de desenvolvimento de variedades de videira resistentes a *P. viticola*. O mapeamento genético de QTLs de resistência ao míldio utilizando várias fontes de resistência nos programas de melhoramento genético de videira de diferentes instituições do país é um passo importante nesta direção.

2.4 CONCLUSÕES

- Os mapas genéticos construídos para os dois genitores da progênie F1 do cruzamento CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88 possibilitaram o mapeamento de QTLs associados ao controle genético de resistência a *P. viticola* no genoma da videira.
- Três QTLs foram detectados por mapeamento de Intervalo Simples e Intervalo Composto no mapa genético do genitor feminino CNPUV 733-34. Um dos QTLs está localizado no GL 5, no intervalo entre os marcadores UDV041-UDV042 (LOD= 3,9) e explica 6% da variação fenotípica para resistência a *P. viticola*. Dois outros QTLs (C18-1 e C18-2), apresentando efeito moderado de resistência a *P. viticola*, foram detectados no GL 18, e explicam até 22,3% da variação fenotípica. O intervalo do QTL C18-1 (LOD= 7,6) é flanqueado pelos marcadores VMC7F2 e VVIN16, que estão separados por 5 cM. O intervalo do QTL C18-2 (LOD= 6,3) está entre os marcadores VVIU04 e

VVIN83, separados por 22 cM. Os QTLs são estáveis, isto é, foram detectados nos dois anos em condições de campo e nas repetições do bioensaio em condições controladas de laboratório. Os efeitos aditivos da resistência a *P. viticola* em condições de campo e bioensaio foram provenientes do genitor materno (CNPUV 733-34).

- O mapeamento de Marcas Simples identificou ainda dois marcadores (VMC3D7 e VMC3G11), localizados nos cromossomos 10 e 16, associados ao controle de resistência a *P. viticola* herdado do genitor masculino (CNPUV 1103-88).

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM-BLONDON, A.F.; ROUX, C.; CLAUX, D.; BUTTERLIN, G.; MERDINOGLU, D. & THIS, P. 2004. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. *Theoretical Applied Genetics* 109:1017-1027.
- ALLÈGRE, M.; DAIRE, X.; HÉLOIR, M.C.; TROUVELOT, S.; MERCIER, L.; ADRIAN, M. & PUGIN, A. 2007. Stomatal deregulation in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *New Phytologist* 173:832-840.
- BELLIN, D.; PERESSOTTI, E.; MERDINOGLU, D.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; ADAM-BLONDON, A.F.; CIPRIANI, G.; MORGANTE, M.; TESTOLIN, R. & DI GASPERO, G. 2009. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localized necrosis at the infection site. *Theoretical Applied Genetics* 120:163-176.
- BLASI, P.; BLANC, S.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; PRADO, E.; RÜHL, E.H.; MESTRE, P. & MERDINOGLU, D. 2011. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of *Rpv8*, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *Theoretical Applied Genetics* DOI 10.1007/s00122-011-1565-0.
- BOSO, S. & KASSEMAYER, H.H. 2008. Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew. *Vitis* 47:39-49.
- BOWERS, J.E.; DANGL, G.S.; VIGNANI, R. & MEREDITH, C.P. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* 39:628-633.
- BOWERS, J.E.; DANGL, G.S. & MEREDITH, C.P. 1999. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am. J. Enol. Vit.* 50:243-246.
- BRONDANI, R.P.V.; GRATAPAGLIA, D. 2001. Cost-effective method to synthesise a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. *Biotechniques* 31:793-795.
- CADLE-DAVIDSON, L. 2008. Variation within and between *Vitis* spp. for foliar resistance to the downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. *Plant Disease* 92:1577-1584.
- CALENGE, F.; DROUET, D.; DENANCE, C.; VAN DE WEG, W.E.; BRISSET, M.N.; PAULIN, J.P. & DUREL, C.E. 2005. Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. *Theor Appl Genet.* 111:128-135.
- CHURCHILL, G.A. & DOERGE, R.W. 1994. "Empirical threshold values for quantitative trait mapping." *Genetics* 138(3):963-71.

- COSTANTINI, L.; BATTILANA, J.; LAMAJ, F.; FANIZZA, G. & GRANDO, M.S. 2008. Berry and phenology-related traits in grapevine (*Vitis vinifera* L.): From Quantitative Trait Loci to underlying genes. *BMC Plant Biology* 8:1-17.
- CRUZ, C. D. 1998. Programa GENES-Aplicativo computacional em estatística aplicada à genética. *Genetics and Molecular Biology* 21:135-138.
- DALBÓ, M.A.; YE, G.N.; WEEDEN, N.F.; STEINKELLNER, H.; SEFC, K. & REISCH, B.I. 2000. A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. *Genome* 43: 333-340.
- DECROOCQ, V.; FAVÉ, M.G.; HAGEN, L.; BORDENAVE, L. & DECROOCQ, S. 2003. Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theor Appl Genet* 106:912-922.
- DI GASPERO, G. & CIPRIANI, G. 2003. Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, Pto-like and receptor-like kinases related to disease resistance in grapevine. *Molecular genetics and genomics* 269:612-623.
- DI GASPERO, G.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R.; EDWARDS, K.J. & CIPRIANI, G. 2000. Conservation of microsatellite loci within the genus *Vitis*. *Theor Appl Genet* 101:301-308.
- DI GASPERO, G.; CIPRIANI, G.; MARRAZZO, M.T.; ANDRETTA, D.; CASTRO, M.J.P.; PETERLUNGER, E. & TESTOLIN, R. 2005. Isolation of (AC)n-microsatellites in *Vitis vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection. *Molecular Breeding* 15:11-20.
- DI GASPERO, G.; CIPRIANI, G.; ADAM-BLONDON, A.F. & TESTOLIN, R. 2007. Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for R-gene candidates. *Theoretical and Applied Genetics* 114:1249-1263.
- DIEZ-NAVAJAS, A.M.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; GREIF, C. & MERDINOGLU, D. 2008. Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the tissue level. *Phytopathology* 98:776-780.
- DOLIGEZ, A.; BOUQUET, A.; DANGLLOT, Y.; LAHOGUE, F.; RIAZ, S.; MEREDITH, C.P.; EDWARDS, K.J. & THIS, P. 2002. Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theoretical Applied Genetics* 105:780-795.
- DOLIGEZ, A.; ADAM-BLONDON, A.F.; CIPRIANI, G.; DI GASPERO, G.; LAUCOU, V.; MERDINOGLU, D.; MEREDITH, C.P.; RIAZ, S.; ROUX, C. & THIS, P. 2006. An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. *Theoretical Applied Genetics* 113:369-382.

- DOUCLEFF, M.; JIN, Y.; GAO, F.; RIAZ, S.; KRIVANECK, A.F. & WALKER, M.A. 2004. A genetic linkage map of grape, utilizing *Vitis rupestris* and *Vitis arizonica*. Theoretical Applied Genetics, 109:1178-1187.
- EIBACH, R.; ZYPRIAN, E.; WELTER, L. & TÖPFER, R. 2007 The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis* 46:120-124.
- EIBACH, R.; TÖPFER, R. & HAUSMANN, L. 2010. Use of genetic diversity for grapevine resistance breeding. *Mitteilungen Klosterneuburg* 60:332-337.
- FANIZZA, G.; LAMAJ, F.; COSTANTINI, L.; CHAABANE, R. & GRANDO, M.S. 2005. QTL analysis for fruit yield components in table grapes (*Vitis vinifera*). Theoretical Applied Genetics 111:658-664.
- FERREIRA, M.E. 2003. Melhoramento genético de arroz: impactos da genômica. In: BORÉM, A. Giudice M, Sedyama T (Eds.) Melhoramento Genômico. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. p. 73-129.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília DF. Embrapa-SPI.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 2006. Genética de associação em plantas. In: BORÉM, A. & CAIXETA, E.T. (Eds.). Marcadores Moleculares. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. p. 273-306.
- FISCHER, B.M.; SALAKHUTDINOV, I.; AKKURT, M.; EIBACH, R.; EDWARDS, K.J.; TÖPFER, R. & ZYPRIAN, E.M. 2004. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Trends in Biotechnology* 108:501-515.
- FRIEDMAN, M. 1937 The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance". *Journal of the American Statistical Association* (American Statistical Association) 32 (200): 675–701
- GRANDO, M.S.; BELLIN, D.; EDWARDS, K.J.; POZZI, C.; STEFANINI, M. & VELASCO, R. 2003. Molecular linkage maps of *Vitis vinifera* L. and *V. riparia* Mchx. Theoretical Applied Genetics 106:1213-1224.
- GRATTAPAGLIA, D. & SEDEROFF, R. 1994. Genetic Linkage Maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* Using a Pseudo-Testcross: Mapping Strategy and RAPD Markers. *Genetics* 137:1121-1137.
- IDURY, R.M. & CARDON, L.R. 1997. A Simple Method for automated allele binning in microsatellite markers. *Genome Research* 11:1104-1109.
- JÜRGES, G.; KASSEMAYER, H.H.; DURRENBERGER, M.; DUGGELIN, M. & NICK, P. 2009. The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. *Plant Biology* 11:886-898.

- KORTEKAMP, A. & ZYPRIAN, E. 2003. Characterization of *Plasmopara*-resistance in grapevine using in vitro plants. *Journal of Plant Physiology* 160:1393-1400.
- KORTEKAMP, A.; WIND, R.; ZYPRIAN, E. 1998. Investigation of the interaction of *Plasmopara viticola* with susceptible and resistant grapevine cultivars. *J Plant Dis Protec* 105:475-488.
- KORTEKAMP A. 2006. Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 58-67.
- LANDER, E.S. & BOTSTEIN, D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199.
- LODHI, M.A.; YE, G.N.; WEEDEN, N.F. & REISCH, B.I. 1995. A molecular marker-based linkage map of *Vitis*. *Genome* 38:786-794.
- MARGUERIT, E.; BOURY, C.; MANICKI, A.; DONNART, M.; BUTTERLIN, G.; NÉMORIN, A.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; MERDINOGLU, D.; OLLAT, N. & DECROOCQ, S. 2009. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* 118:1261-1278.
- MAUL, E.; TÖPFER, R.; EIBACH, R. *Vitis* international variety catalogue 2008. Disponível em: <<http://www.vivc.de>>. Acesso em: 14 fev. 2013.
- MEJÍA, N.; SOTO, B.; GUERRERO, M.; CASANUEVA, X.; HOUEL, C.; MICCONO, M.L.A.; RAMOS, R.; CUNFF, L.L.; BOURSQUOT, J.M.; HINRICHSEN, P. & ANNE-FRANÇOISE ADAM-BLONDON, A.F. 2011. Molecular, genetic and transcriptional evidence for a role of VvAGL11 in stenospermocarpic seedlessness in grapevine. *BMC Plant Biology* 11:57.
- MERDINOGLU, D.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; COSTE, P.; DUMAS, V.; HAETTY, A; BUTTERLIN, G. & GREIF, C. 2003. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. *Acta Horticulturae* 603:451-456.
- MERDINOGLU, D.; BUTTERLIN, G.; BEVILACQUA, L.; CHIQUET, V.; ADAM-BLONDON, A.F. & DECROOCQ, S. 2005. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. *Molecular Breeding* 15:349-366.
- MOREIRA, F.M.; MADINI, A.; MARINO, R.; ZULINI, L.; STEFANINI, M.; VELASCO, R.; KOZMA, P. & GRANDO, M.S. 2011. Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (*Vitis* spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. *Tree Genetics & Genomes* 7:153-167.
- MOROLDO, M.; PAILLARD, S.; MARCONI, R.; FABRICE, L.; CANAGUIER, A.; CRUAUD, C.; DE BERARDINIS, V.; GUICHARD, C.; BRUNAUD, V.;

- CLAINCHE, I.L.; SCALABRIN, S.; TESTOLIN, R.; DI GASPERO, G.; MORGANTE, M. & ADAM-BLONDON, A.F. 2008. A physical map of the heterozygous grapevine 'Cabernet Sauvignon' allows mapping candidate genes for disease resistance. *BMC Plant Biology* 8:66.
- PERESSOTTI, E.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; DELMOTTE, F.; BELLIN, D.; DI GASPERO, D.; TESTOLIN, R.; MERDINOGLU, D. & MESTRE, P. 2010. Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *BMC Plant Biology* 10:147.
- RIAZ, S.; DANGL, G.S.; EDWARDS, K.J. & MEREDITH, C.P. 2004. A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. *Theoretical Applied Genetics* 108:864-872.
- RIAZ, S.; KRIVANEK, A.F.; XU, K. & WALKER, M.A. 2006. ReWned mapping of the Pierce's disease resistance locus, PdR1, and Sex on an extended genetic map of *Vitis rupestris* & *V. arizonica*. *Theor Appl Genet* 113:1317-1329.
- SCHWANDER, F.; EIBACH, R.; FECHTER, I.; HAUSMANN, L.; ZYPRIAN, E. & TÖPFER, R. 2011. Rpv10: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theor Appl Genet* DOI 10.1007/s00122-011-1695-4.
- SEFC, K.M.; REGNER, F.; TURETSCEIK, E.; GLOSS, J. & STEINKELLNER, H. 1999. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome* 42:367-373.
- THOMAS, M.R. & SCOTT, N.S. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor Appl Genet* 86:985-990.
- TROGGIO, M.; MALACARNE, G.; COPPOLA, G.; SEGALA, C.; CARTWRIGHT, D.A.; PINDO, M.; STEFANINI, M.; MANK, R.; MOROLDO, M.; MORGANTE, M.; GRANDO, M.S. & VELASCO, R. 2007. A dense single-nucleotide polymorphism-based genetic linkage map of grapevine (*Vitis vinifera* L.) anchoring Pinot Noir bacterial artificial chromosome contigs. *Genetics* 176:2637-2650.
- VAN OOIJEN, J.W. & VOORRIPS, R.E. 2001. JoinMap 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International Wageningen, The Netherlands.
- VELASCO, R.; ZHARKIKH, A.; TROGGIO, M.; CARTWRIGHT, D.A.; CESTARO, A.; PRUSS, D.; PINDO, M.; FITZGERALD, L.M.; VEZZULLI, S.; REID, J.; MALACARNE, G.; ILIEV, D.; COPPOLA, G.; WARDELL, B.; MICHELETTI, D.; MACALMA, T.; FACCI, M.; MITCHELL, J.T.; PERAZZOLLI, M.; ELDREDGE, G.; GATTO, P.; OYZERSKI, R.; MORETTO, M.; GUTIN, N.; STEFANINI, M.; CHEN, Y.; SEGALA, C.; DAVENPORT, C.; DEMATTE, L.; MRAZ, A.; BATTILANA, J.; STORMO, K.; COSTA, F.; TAO, Q.; SI-

- AMMOUR, A.; HARKINS, T.; LACKEY, A.; PERBOST, C.; TAILLON, B.; STELLA, A.; SOLOVYEV, V.; FAWCETT, J.A.; STERCK, L.; VANDEPOELE, K.; GRANDO, M.S.; TOPPO, S.; MOSER, C.; LANCHBURY, J.; BOGDEN, R.; SKOLNICK, M.; SGARAMELLA, V.; BHATNAGAR, S.K.; FONTANA, P.; GUTIN, A.; VAN DE PEER, Y.; SALAMINI, F. & VIOLA, R. 2007. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *Plos One*, 2(12):e1326. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001326>
- VENUTI, S.; COPETTI, D.; FORIA, S.; FALGINELLA, L.; HOFFMANN, S.; BELLIN, D.; CINDRIC, P.; KOZMA, P.; SCALABRIN, S.; MORGANTE, M.; TESTOLIN, R. & DI GASPERO, G. 2013. Historical introgression of the downy mildew resistance gene Rpv12 from the asian species *Vitis amurensis* into Grapevine Varieties. *Plos one* 8 (4):e61228.
- VOORRIPS R.E. 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity* 93:77-78.
- WAN, Y.; HE, P. & WANG, Y. 2007. Inheritance of downy mildew resistance in two interspecific crosses between Chinese wild grapes and European grapes. *Vitis* 46(3):156-157.
- WANG, S., BASTEN, C.J. & ZENG, Z.B. 2012. Windows QTL Cartographer v.2.5, Raleigh, NC: Department of statistics, North Carolina State University. Available at: <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>.
- WELTER, L.J.; GÖKTÜRK-BAYDAR, N.; AKKURT, M.; MAUL, E.; EIBACH, R.; TÖPFER, R. & ZYPRIAN, E.M. 2007. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). *Molecular Breeding* 20:359-374.
- Wiedemann-Merdinoglu, S.; Prado, E.; Coste, P.; Dumas, V.; Butterlin, G. & Merdinoglu, D. 2006. Genetic analysis of resistance to downy mildew derived from *Muscadinia rotundifolia*. Ninth international conference on grape genetics and breeding, Udine, Italy, July 2-6.
- ZENG, Z.B. 1994. "Precision mapping of quantitative trait loci." *Genetics* 136:1457-1468.

ANEXOS

ANEXO 1 – Capítulo 1

Tabela 1. Genotipagem de 92 isolados de *Plasmopara viticola* utilizando 15 marcadores microssatélites que apresentaram maior Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC > 0,3).

Isolado	PvCNG02	PvCNG05	PvCNG08	PvCNG11	PvCNG13	PvCNG14	PvCNG22	PvCNG23	PvCNG28	PvCNG32	BER	BERNew	ISANew	Pv7
DF_LO1	110/110	113/115	108/110	116/116	85/87	127/127	96/96	113/113	109/121	220/244	175/175	128/132	125/127	286/308
DF_LO2	110/110	113/115	108/110	116/116	85/87	127/127	96/96	113/113	121/121	-/-	175/175	128/132	123/127	286/286
DF_PL1	108/110	115/119	108/108	116/116	85/85	115/127	96/104	113/113	109/109	220/226	173/173	132/132	121/129	288/288
DF_PL2	108/110	115/115	108/108	114/114	85/85	115/127	96/96	113/113	109/109	220/226	173/173	132/132	121/129	288/288
ES_ST1	110/112	115/119	108/116	116/116	85/87	115/127	96/104	113/113	107/109	220/220	173/173	132/132	121/129	-/-
ES_ST1b	110/112	115/119	108/116	114/114	85/87	115/127	96/104	113/113	107/109	220/220	175/175	132/132	121/129	-/-
ES_ST2	108/110	111/111	108/108	94/94	85/85	127/127	96/96	113/113	107/107	220/244	173/173	138/138	125/125	288/288
ES_ST3	108/112	117/119	108/116	114/114	85/85	115/127	96/96	111/113	107/109	220/220	173/173	132/132	121/129	-/-
ES_ST4	108/110	115/119	108/108	116/116	85/85	115/127	96/104	111/113	107/109	220/244	173/173	132/132	121/129	288/288
GO_CO1	110/110	115/115	108/108	116/116	85/85	115/127	96/104	113/113	109/109	220/226	173/173	132/132	121/129	288/288
GO_CO2	110/110	115/115	108/108	116/116	85/85	115/127	96/104	113/113	109/109	220/226	175/175	132/132	121/129	288/288
GO_CO3	110/110	115/115	108/108	-/-	85/85	115/127	96/96	113/113	109/109	-/-	173/173	132/132	121/127	288/288
GO_CO4	110/110	115/115	108/108	116/116	85/95	115/127	96/104	113/113	109/109	220/220	175/175	130/132	129/129	288/288
MG_SM1	110/110	115/115	108/108	116/116	85/85	115/127	96/96	111/111	107/109	-/-	-/-	128/128	-/-	-/-
MG_SM1b	110/110	111/111	-/-	-/-	85/85	115/127	-/-	109/109	-/-	-/-	171/171	128/128	-/-	-/-
MG_SB1	110/110	115/115	116/116	116/120	85/85	115/127	96/104	111/113	107/109	218/220	173/175	130/132	125/125	288/288
MG_CA1	108/110	115/115	108/108	114/114	85/85	115/127	96/96	113/113	109/109	-/-	175/175	132/132	121/129	288/288
MG_CA1b	108/110	115/115	108/108	116/116	85/85	115/127	96/104	113/113	109/109	220/226	173/173	132/132	121/129	288/288
MG_CA2	108/110	115/115	108/108	116/116	85/85	115/127	96/104	113/113	109/109	226/244	175/175	132/132	121/129	288/288
MT_NM1	110/110	115/119	108/108	116/120	85/85	115/127	96/106	111/113	107/107	220/220	175/175	132/132	121/129	-/-
MT_NM1c	110/110	115/115	108/108	114/114	85/85	127/127	96/96	111/113	107/107	220/220	173/173	-/-	-/-	-/-
PR_MA1	108/110	115/115	108/108	116/116	85/85	115/127	96/104	113/113	109/109	220/220	173/173	132/132	121/129	288/288
PR_MA1b	108/110	115/115	108/108	116/116	85/85	115/127	96/104	113/113	109/109	220/220	173/173	132/132	121/129	288/288
PR_RO1	110/110	115/115	108/108	114/114	85/85	115/127	96/96	-/-	109/109	220/244	173/173	-/-	-/-	288/288
PR_RO1b	110/110	115/115	108/108	116/116	85/85	-/-	96/96	111/113	109/109	-/-	-/-	-/-	-/-	288/288
RJ_PS1	110/110	115/119	116/116	116/116	85/87	115/127	96/96	111/115	107/109	218/220	173/173	132/132	121/129	286/286
RS_BG1	110/110	115/115	108/108	114/114	85/85	115/127	96/96	111/113	109/109	220/220	171/171	-/-	-/-	288/288
RS_BG2	110/110	115/115	108/108	114/114	85/95	115/127	96/96	111/113	109/109	220/244	171/171	130/132	129/129	288/288

RS_BG3	110/110	115/115	108/116	114/114	85/85	115/127	96/96	111/111	107/109	220/220	173/175	130/132	125/125	288/288
RS_BG4N	108/110	115/119	108/116	116/116	85/85	115/127	96/104	113/113	107/109	220/244	175/175	132/132	129/129	286/286
RS_BG4	110/110	115/119	108/108	114/114	85/85	115/127	96/96	113/113	109/109	220/220	173/173	132/132	121/129	286/286
RS_BG5	110/110	115/119	108/108	116/116	85/85	115/127	96/104	113/115	107/109	222/244	173/173	132/132	121/129	286/288
RS_BG6	110/110	115/119	108/108	114/114	85/85	115/127	96/104	111/113	107/109	218/220	173/173	132/132	121/129	286/286
RS_BG7	110/110	115/115	108/116	116/116	85/85	115/127	96/104	111/113	111/111	220/220	173/173	132/132	121/129	286/288
RS_BG8	110/110	115/115	116/116	114/114	85/85	115/127	96/96	-/-	-/-	-/-	-/-	130/132	123/123	-/-
RS_BG9	-/-	115/115	108/108	116/116	85/85	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
RS_BG12	110/110	115/115	108/116	116/116	85/85	115/127	96/96	111/113	109/109	220/220	175/175	132/132	121/129	286/286
RS_BG13	108/108	115/115	108/116	114/114	85/85	115/127	96/104	113/113	109/109	220/220	175/175	132/132	129/129	286/286
RS_BG14	112/112	115/119	108/108	116/116	85/85	115/127	96/96	113/113	109/109	218/220	175/175	132/132	121/129	286/286
RS_BG15	108/108	113/115	108/116	116/116	85/87	115/127	96/104	111/113	107/109	220/220	175/175	132/132	121/129	286/286
RS_BG16	110/110	115/115	116/116	116/116	85/87	115/127	96/96	113/113	-/-	220/220	173/173	132/132	121/129	286/288
RS_BG17	108/108	115/115	108/116	114/114	85/85	115/127	104/104	113/113	109/109	220/220	173/173	132/132	121/129	286/286
RS_BG18	108/108	115/115	108/116	116/116	85/85	115/127	96/104	111/113	109/109	220/220	173/173	132/132	121/129	286/286
RS_BG19	108/108	115/119	116/116	116/116	85/87	115/127	104/104	111/113	107/109	220/222	173/173	132/132	129/129	286/288
RS_BG20	108/110	115/115	108/108	116/116	85/85	115/127	96/96	113/115	109/109	-/-	173/173	132/132	121/129	288/288
RS_BG21	108/110	115/115	108/116	116/120	-/-	115/127	96/104	113/113	109/109	220/220	173/173	132/132	121/129	286/286
RS_BG22	108/108	119/119	-/-	114/114	85/85	115/127	96/96	111/113	-/-	-/-	173/173	132/132	129/129	-/-
RS_BG23	108/108	115/115	116/118	116/120	85/87	115/127	96/104	111/111	109/109	224/224	175/175	132/132	129/129	286/286
RS_BG24	108/112	115/119	108/116	116/120	85/85	115/127	96/104	113/113	107/109	218/218	175/175	132/132	121/129	286/286
RS_BG25	110/114	115/119	108/116	116/116	85/85	115/127	96/104	111/113	107/109	218/220	175/175	132/132	121/129	286/286
RS_CX1	110/110	115/119	108/108	114/114	85/85	115/127	96/104	111/113	107/109	216/220	175/175	132/132	121/129	288/288
RS_CX2	110/110	115/115	108/108	116/116	85/95	115/127	96/104	111/113	107/109	220/244	173/173	130/130	129/129	288/288
RS_CX3	110/110	115/119	108/116	116/116	85/85	115/127	96/106	111/113	109/109	220/220	173/173	132/132	121/129	288/288
RS_CX4	108/110	115/115	108/116	116/116	85/85	115/127	96/104	111/113	107/109	220/244	173/173	132/132	121/129	286/286
RS_CX5	108/110	115/115	108/108	116/116	85/85	115/127	96/104	111/113	109/115	220/220	175/175	132/132	121/129	286/286
RS_CX6	110/110	115/115	108/108	116/116	85/85	115/127	96/104	113/113	107/109	220/220	175/175	132/132	121/129	286/288

RS_CX7	110/110	117/119	108/116	116/116	85/85	115/127	96/104	113/113	109/109	220/220	175/175	132/132	121/129	286/288
RS_CX8	110/110	115/115	108/108	114/114	85/85	115/127	96/96	113/113	107/109	220/220	175/175	132/132	121/129	286/286
RS_CX9	110/110	115/119	108/116	114/114	85/85	115/127	96/96	111/113	109/109	220/220	173/173	132/132	129/129	286/288
RS_CX10	-/-	115/115	108/108	-/-	85/85	-/-	96/104	113/113	109/109	-/-	175/175	-/-	-/-	-/-
RS_ER1	110/110	115/119	108/108	114/114	85/85	115/127	96/96	113/113	107/109	220/244	175/175	132/132	121/129	286/288
RS_ER2	-/-	115/115	108/108	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	220/244	173/173	132/132	-/-	-/-
RS_FC1	110/110	115/115	108/108	116/116	85/85	115/127	96/96	111/113	107/109	220/244	173/175	130/132	127/127	288/288
RS_FC2	110/110	115/115	108/108	116/116	85/95	115/127	96/96	111/113	109/109	220/220	173/173	130/130	129/129	288/288
RS_FC3	110/110	115/115	108/108	116/116	85/87	115/127	96/104	113/113	107/109	220/220	173/173	132/132	121/129	286/286
RS_FC4	110/110	115/115	108/108	114/114	85/85	115/127	96/96	111/111	109/109	220/220	173/173	132/132	-/-	288/288
RS_FC5	110/110	115/115	108/108	116/116	85/95	115/127	96/96	111/113	109/109	220/244	171/171	130/130	129/129	288/288
RS_MB1	110/110	115/115	108/116	116/116	85/95	115/127	96/96	111/113	109/109	220/244	171/171	130/130	129/129	288/288
RS_SV1	110/110	115/115	108/108	116/116	85/85	115/127	96/104	113/113	107/109	220/244	173/175	132/132	-/-	288/288
RS_SV2	110/110	115/115	108/108	116/116	85/85	115/127	96/96	111/113	107/109	220/244	173/175	132/132	-/-	288/288
RS_SV3	110/110	111/115	108/108	114/114	85/87	115/127	96/104	113/113	109/109	220/222	175/175	132/132	121/129	288/288
SC_VI1	110/110	115/119	108/108	116/116	85/85	115/127	96/104	113/115	109/109	220/244	175/175	132/132	121/129	288/288
SC_VI2	110/110	115/115	108/116	-/-	85/85	115/127	96/104	113/113	109/109	220/220	175/175	132/132	-/-	-/-
SC_VI3	110/110	115/115	108/108	116/116	85/85	115/127	96/104	113/113	109/109	-/-	173/173	132/132	-/-	-/-
SP_IN1	110/110	115/115	108/108	116/116	85/87	127/127	96/96	113/113	-/-	-/-	173/173	-/-	125/127	286/308
SP_IN2	110/110	113/115	108/110	116/116	85/87	127/127	96/96	113/113	107/109	220/244	173/173	128/132	125/127	286/308
SP_IN3	-/-	113/115	108/108	114/114	85/85	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
SP_JA1	110/110	115/115	108/116	116/116	95/95	115/127	96/104	111/113	107/109	220/220	171/171	130/130	129/129	288/288
SP_JA2	110/110	115/115	108/116	116/116	95/95	115/127	96/104	111/113	109/109	220/220	171/171	130/130	129/129	288/288
SP_JA3	110/110	115/115	108/108	114/114	95/95	115/127	96/104	111/113	109/109	220/220	173/173	130/130	129/129	288/288
SP_JA3b	110/110	115/115	108/108	114/114	95/95	115/127	96/104	111/113	109/109	220/220	173/173	130/130	129/129	288/288
SP_JA4	110/110	115/115	108/108	114/114	95/95	115/127	96/104	111/113	109/109	220/220	173/173	130/130	129/129	288/288
SP_JA4b	110/110	115/115	108/108	114/114	95/95	115/127	96/104	111/113	109/109	220/220	173/173	130/130	129/129	288/288
SP_JA5	110/110	115/115	108/108	116/116	85/95	115/127	96/104	111/113	109/109	220/220	173/175	130/132	129/129	288/288

SP_LO1	108/110	115/119	108/108	116/116	85/85	115/127	96/104	113/113	107/109	220/244	175/175	132/132	121/129	288/288
SP_LO2	110/110	113/115	108/110	116/116	85/87	127/127	96/96	113/113	107/109	220/220	175/175	128/132	125/127	286/308
SP_LO3	110/110	115/115	108/110	116/116	85/87	127/127	96/96	113/113	107/109	-/-	175/175	128/132	125/127	286/308
SP_LO4	108/110	115/119	108/108	116/116	85/85	115/127	96/104	113/113	107/109	-/-	173/173	132/132	121/129	288/288
SP_PO1	110/110	115/115	108/108	114/114	95/95	115/127	96/96	111/113	109/109	220/220	173/173	130/130	129/129	288/288
SP_PO2	110/110	115/115	108/108	114/114	95/95	115/127	96/104	111/113	109/109	220/220	173/173	130/130	129/129	288/288
SP_TP1	108/110	115/119	108/108	116/116	85/85	115/127	96/104	113/113	109/109	-/-	175/175	132/132	121/129	288/288
SP_TP2	108/110	115/115	108/108	116/116	85/85	115/127	96/96	113/113	109/109	224/244	173/173	132/132	121/129	288/288

ANEXO 2 – Capítulo 2

Tabela 1. 209 marcadores microssatélites utilizados para a construção de mapas genéticos de ambos os genitores pela estratégia de pseudo-cruzamento teste.

Primer	Forward primer	Reverse primer	Motivo	TE	TA	Fluor.
UDV001	TCATTTTCTTGATCGAAGTCCA	TGAGCATCAAAACAGGAAGC	(TG)7 (TG)8	148	56	HEX
UDV009	CTCTCTAGTAATCCATAACAATGGTG	GGGTTTAATCCTCCATTTTCC	(CA)33	176	59	HEX
UDV014	TGAAAGTCGATGGAATGTGC	TTGCATCTCCCTTCTCAATG	(T)12 (TG)17	156	58	HEX
UDV017	TTTTGTGGAACTTCATGGAAA	AATGGCATTAAAGCTTTTTTCG	(TG)17 (A)10 (A)10	138	56	NED
UDV022	CCCTAGTCCAAAGAGATCATGT	CGGAGATTTCATAGATACATACACACA	(TG)10 (TGGA)9	200	58	NED
UDV024	AGGGGAGGTTAAGCGACATT	TGCTCTGTTTCTTGTATATTTGGTTC	(TG)17 (A)10	191	56	FAM
UDV027	TGGCAACAACCACAGAAATG	CACGAAGTGTCTTTTCCTCCTC	(GT)15 (AG)12	157	61	HEX
UDV032	CATGCGTATGTGTTAGAGAGCA	CATGGCATGTGCTTTGTTAT	(AC)19	182	58	NED
UDV033	TTGTCCGTTTTTAGCTCAATG	TCTGCATAAGGGGTGATTAAGA	(CA)23	165	57	NED
UDV036	TGTTGTGGTCTTGTACAGACTCTT	TATCCGCTTTTGCCTATCAA	(TG)12	186	56	HEX
UDV038	CCCAAGATGAAAACCAAGAGA	GAAATAAGGCCTTGTACCACTTG	(TG)17	189	58	NED
UDV041	AAGATCCCTCCACCCAAAAA	TGGGATCTCTTTCCACATCA	(TG)15 (GA)7	161	56	FAM
UDV042	TCTCCATGGATGATGCCTTC	AACTTTAGAGGTTGAGAGCATGG	(TG)12 (GT)8	149	56	NED
UDV043	GAAAGGTTATTTGGCCACCT	TTTCTGCTTCTGTGGGTTTTT	(AG)7 (CA)8	182	61	NED
UDV047	TGTATGATAATCCATAATGTGC	TAGGCATGCTTGACTTATTC	(CA)21 (AT)6	151	56	NED
UDV050	TAATGGCCCCTTACAACACC	AGCTTCACTGCCAAAGGATG	(TG)10 (GA)7	162	56	NED
UDV052	CCTCATTGAGATGCCTCCAG	CCTGGCAAATCCAGAAAGTT	(TC)15 (CA)14 (AC)6	183	56	HEX
UDV053	GTTGGTGGCTTTCTTTTTGC	GGGAGAAAAAGGCATGGATA	(AC)16	138	59	HEX
UDV061	GCTCCAAAACAGACAACTT	TTCTAATAGTTTCTTTGTGTACTGC	(AC)16 (AG)9	203	58	NED
UDV075	CTTGGTAAGGCCAAACATGC	CCCAAAGGTTGTGACCTGAT	(GT)9	160	56	HEX
UDV076	GGTTATTTGCCCGTGATCTG	TGCATCAAGAAAGCACAACA	(AC)9 (AC)7	157	58	HEX

UDV085	CTCCCCAGTAACCATGGAAG	CACTGGATGAGATGGCAGAA	(AC)14 (GA)10	140	62	HEX
UDV088	CCATGCACACACGCACAT	CCACCAAACAAGTGGAGGTT	(CA)8 (CA)10	178	58	HEX
UDV090	TCAATGAGGATTGCATGGAC	GTCCAACACCAAATCCAGGT	(TG)9	145	59	FAM
UDV093	CCATGCATTGTTTTCTTTTTCTT	TCCATTGAAAGGCTTTTTGG	(TC)13 (CA)21	168	58	NED
UDV100	TTAATGGTTTGGGGACCTTG	CCCCAAAATAGAGGCTAACTT	(GT)8	213	56	HEX
UDV101	GCTCTCCCTCTCTCCACAT	CAAAAAGTGAAATAGTTTCTGCCATA	(CA)9 (TC)7 (CA)6	199	58	NED
UDV104	AATTTCTAGTGCAAACCACA	AAGCGCCATTGTTCTAAAA	(CA)9 (CA)16	198	56	NED
UDV108	TGTAGGGTTCCAAAGTTCAGG	CCTTTTTATATGTGGTGGAGCA	(CT)6 (GT)6	218	61	HEX
UDV109	AAAAGTAATATCACTAAGATATAGAACA	TTTAAGAAAAGCAGGTGATG	(TG)16	148	53	FAM
UDV125	GGCACTCCTAGATGATTTGTCC	TTCAGCTATGCACCGAGGTA	(CA)24 (CA)6 (CT)7 (AC)6	136	56	FAM
UDV127	CGTCAATCGCTTGTAATCTGC	TGAGCATTTTGCTCCTTCATT	(AC)18	179	58	FAM
UDV129	AAGCTAAGGTCTTATGGCATCTG	TTTCTAGATGCTGACTTCTCAAGTG	(TG)17	150	56	HEX
VMC16F3	CCAATAAATGCAAAACATCTT	ATATTAATGTTGCTCCTCCAC	(GA)15	187	58	FAM
VMC1A12	ATGTAATTACCGGTCATGAGTT	TTCTTGTTTTGCCTATCTATCC	(AG)15	140	58	HEX
VMC1A5	GGCTACAACAACCTATTACCT	AATATTCTATTTTTCCCTC	(AG)20	203	56	HEX
VMC1B11	CTTTTGAAAATTCCTTCCGGGTT	TATTCAAAGCCACCCGTTCTCT	(AG)17	188	56	FAM
VMC1C10	CACAGCTGTTCCAAGTCCCA	ACAAGCCTTCCGCCACTCTC	(TGC)6	152	56	FAM
VMC1E12	GTGTGACCTTATGCAACACCAA	GCTACCACATGCAGACAGGTTAGT	(T)16 (GA)21	258	58	FAM
VMC1E8	CAGCGAGCTCTTGATTTATTGT	GATCATAGCTTCAACGGCTTTT	(GA)21	230	60	FAM
VMC1F10	CATACAAGGAATTTACCCCA	ACCTCTTGCTGTCTAACCA	(AG)18	210	56	FAM
VMC1G3.2	GATAGTTACCATACTTAGTCGGA	ACTTAGCTTCAGAAGAAAATAGA	(AC)7 (GA)17	131	58	NED
VMC1G7	GGGTCCACATAGGTAGGAGATT	AGCCCATAAAGGCCTTAAAAAC	(TG)15 (GA)19	259	58	HEX
VMC2A12	CTGAAGAGGAAGAAAATGAAG	TTGGAACTATTTGATCAGAACA	(AG)18	124	57	HEX
VMC2A3	ATTGAAACTCCGGAAGCTTAGG	CTTCGTGTAGAAGCTTCACAGGT	(GA)17	166	58	NED
VMC2B3	TCTGTGAATTTGCAGAGACGC	GGCTCAGACACAAACATGACCT	(AG)8 (AG)9	184	56	FAM
VMC2C3	TGCAATCCCATTATTATCTCTT	AATATTTGTAGAATGGTGCTTTT	(AGA)16	193	58	FAM
VMC2E10	AGAGGATGATCAGCTGGAGA	TGAAGCCAACCTCCGGTGC	(GA)18 (T)20 (T)13	73	61	NED

VMC2E2	CTTGTACACCCAAGATCTTCCA	TTAGTTAGTCATCTTCCACCCTCA	(CT)26	168	56	NED
VMC2F10	AGATTCTTCTGATGGTGTGGG	ATCAGAGCTCCTCTTCCCTTCC	(AG)15	101	56	NED
VMC2F12	GGATTGGGCTCAGAAATAGGCT	TTCCAGAACACAGGCCACATAC	(AG)32	227	58	NED
VMC2H10	TTCACCTTCTCAGTTTCTCGG	TGCCACCTACACTGTGAGATTC	(AG)21	132	61	FAM
VMC2H12	ATGCAACGAATTTTCAGAAGGG	GAAGTGCTGAACCTTTTTTGGAG	(AG)17	110	60	NED
VMC2H9	AAGCAAAGCAGACCACAACG	CCCAGCTCCTTAGCTCCTCA	(GA)28	158	58	NED
VMC3B12	ATAAGGCAGGTTGATTCAAGGA	CATCACAGGTTGATTTCGACACT	(AG)24	136	58	FAM
VMC3B7.2	TGCTTTGATACCCAATCGAACT	ATTCCTCCTGGTTTTGAACTCT	(AG)16	105	58	FAM
VMC3C11.1	GATGGATGCAACTCGAAAAAGA	CAAAGCGTTTAGCCAAAACTCA	(AG)16	111	58	FAM
VMC3C7	AATTTGGCTAAGAAAGGA	AATATTCAGAAAATTTGTGTC	(GA)16	123	56	NED
VMC3D12	TGTCACTGTGGACATAGGGAG	ATCACCAAAGGGAAGCAAAAG	(TC)21	215	60	FAM
VMC3D7	GCACCATTCTGCCATTATGATT	TATTTTCAGTGACCCACTCTTAC	(TC)14 (T)13	172	58	NED
VMC3F8	GCAATATGGACACTAGGATCAAA	AGAAATCAGCATATCCAACAACA	(TC)17 (T)11	258	58	NED
VMC3G11	TTCCAGAATTTTCAGAGAGTC	TAGAGGCAAAGAAAAGCTACAA	(CT)23	206	56	FAM
VMC3G8.2	GAGCGCAGCTGATAAATGAAAA	CGCTACGAATATCTGCGCTAAA	(AG)18	177	56	HEX
VMC3G9	GATCCTTTTTGGGAATCTCA	CAAGCCACTAGTAGTCATCCCTTT	(AG)25	154	58	HEX
VMC4A5	ATTTTCCACAGGCAAACCACAT	TGTGGTTGTTGTAGCCTATCGG	(GA)14	203	56	FAM
VMC4B7.2	ATATTATTGGGAGACTTGAGAA	ATAGATAAGCCTGCACTACACT	(CT)8 (CT)9 (CT)11	271	58	FAM
VMC4C6	CTCCATCCCTATCTCATCAG	CTCTAACACCCAATCTCACA	(CTG)12	175	58	HEX
VMC4D9.2	CTCAATGCCAATGGCTTTCTTC	GTTCAAATGTCATGGCCCCGTAG	(CT)16	231	58	FAM
VMC4F3.1	AAAGCACTATGGTGGGTGTA AAA	TAACCAATACATGCATCAAGGA	(TC)20 (TC)9	202	59	NED
VMC4F8	CATTTTCATAGGGTTTTACAGC	CTGCCAGTATACTGATTCTCTC	(AG)15	123	56	HEX
VMC4F9.1	CCCATTTCTCCAGAAATCTCGT	ACAGGCTATACCACCATGTCCA	(TTG)10	154	58	NED
VMC4H5	GATTTGTGACACTTGTGTAGCG	CAAGTGGAAGCAATCTAGGAA	(GA)33	166	58	HEX
VMC5A1	AGTGAAACGTTGACGACAGTGG	GCGTGAGTTGAGTCACCGTAAG	(GA)13	168	56	HEX
VMC5C1	TTCCCTTATGGGTTAGGTTTC	AGATCTTCCACCCAATGACTT	(AG)28	189	58	FAM
VMC5E9	ATCCAGAGCCATAACAGATTCA	TCACAGCTTCTCATTACCCTT	(AG)22 (CAC)6	219	61	FAM

VMC5G7	CATTCGCTGGTGACTTTC	ACTACCCTCTCTTTCTCGC	(CAC)6 (AG)21	210	56	HEX
VMC5G8	CATGCACATCTTGTTTCACTCT	CATCATTGCTTCCAAAAGTCTC	(CTG)7 (AG)11	171	56	HEX
VMC5H11	AACCCCTCATGTGCCATACTAA	TGCTCAACAGCTTTCTTGATTC	(TC)17	199	61	FAM
VMC5H2	ACTCATTCCAACACGGAAAGG	CATTGCACCACTGCTTTTAGACT	(CT)17	206	56	HEX
VMC6C10	TTCCTGCGAATTCTAACCCCTT	CCACTTCCATTCCCTCTCCTGT	(AG)17	128	56	NED
VMC6D12	CTCTCTTTTCCGAAATTGGGGT	ATTTTCCCTGGAAACAAAAGTGG	(CT)19	170	60	NED
VMC6E1	CACTGGCCTGTTGGGAGATAAT	CCTTCAACTGGAAAAGCCTGTC	(CT)22 (TC)14	165	58	FAM
VMC6E10	CTAGGTGTGCCAAGAGATCAGA	CATTTGTGGGTAGTTGTGAGGA	(GA)13	107	58	HEX
VMC6G1	TGCATAGTGCTGTAGGCCATTG	TCTGTCAATTGCTGTCCCTTTCA	(AG)16	191	56	FAM
VMC7A4	TAAGGTGGATTAGTTTTGGGTC	AAACTCCAAAGCATCTGATTCT	(CT)30	162	56	FAM
VMC7B1	CACGCAATCTCTCATTTACAAA	TGGTTTAGGTGACCCAACCTTTA	(TC)22	238	56	FAM
VMC7F2	AAGAAAGTTTTGCAGTTTATGGTG	AAGATGACAATAGCGAGAGAGAA	(CT)9	198	58	HEX
VMC7G3	TTACTAGTGCTGTCCTGCTCCA	TGCTTCCTCTCTTCAACTTTCA	(TC)16	129	58	HEX
VMC7H2	AAGGGGAAAGGTAGGGTGAGAG	GTCCAATCAGGACCGATGAGAA	(TTC)12	129	58	NED
VMC8A7	GCAGCAACTCTCTTACACACCG	GTGGGAGCACTGGTTGCTTTAG	(CT)17	163	58	FAM
VMC8B5	AAAGGAGACATCTGCATCAT	GCCTTGATCTTCCTTCTAAT	(GT)13	151	58	HEX
VMC8C2	AAGGAATTTGGATACTGAAGGT	TGAAGACATCTACGTAGGTGAA	(GA)17	149	59	NED
VMC8D1	AAAGCGCGTAGCTCAGACACA	GGCGGTTGAGCTCTGCTTATC	(CT)15	212	58	HEX
VMC8D11	TGTTGAAGCTAGCATTGTCTCC	ATTCGTCTTTATGCCCATTTGTT	(AG)11 (GA)7	143	57	NED
VMC8D3	TGGCAAGACACAATAAAACAGA	ATAGAGTCCTGCAAAATCCAAGA	(A)12 (AG)16	172	60	HEX
VMC8E6	AAGGGGTTCAATTTGATTGAGAG	CTTCATCCATCCTTACAGCTTAGA	(GA)15	226	58	HEX
VMC8E8	CCAAAAAGAGCCAAGAGGGAAA	GGGAGGAGATGGGCAAAAAGTA	(AG)13	130	58	NED
VMC8F10	TATGAAAGATGAATGGCTGCTC	AAGGGTGCTTGAAGGTTTATGT	(TC)19	228	59	NED
VMC8F4.2	GCGTAAAGCATATTCAAGCATT	GAAGTTAGCGCAGATGAAAGAT	(GA)14	113	56	HEX
VMC8G3.2	TAGGGCGGAGATTTAACAGTCA	TCAACCAAACTCATTAAAGGGG	(T)13 (TG)10	292	58	NED
VMC8G9	AACATTATCAACAACATGGTTTTA	ATATTCATCCTTCCCATCACTA	(AG)21	187	57	NED

VMC9A2.1	AGCTCGGCTAGCTGCAAAATC	ACCCTTCCCTCTTCAAAACCC	(AG)15	166	58	FAM
VMC9B5	ATGCCCCGAGAAGAGTCGAGAA	CTGCCGTTTGGGTAAGATGCT	(GA)12	248	56	FAM
VMC9D3	GATTTGAAAGTCGAAAGCCAGG	TGCAAAGACTGTGAGATGAGGG	(TC)23	208	61	HEX
VMC9F2	AAACATGATCTGATGCAGGTGA	CAACCTGTTGATGAAAGGGAAA	(TC)18	208	60	NED
VMC9F4	GAATTTCTATACGACGTAGCCC	CCAAAAACAATAACCAGAACAC	(GA)14	153	58	NED
VMC9G4	AAATGTGCAAGTTGAAGAGGGA	AGACCGTTCAAACAAGCAAATG	(CT)17	171	60	FAM
VMC9H4.2	GCAGTTGATGCAAAACAACAGT	CACATCATTGATGAGGCT	(CAG)10 (GCA)7 (CAG)8	290	61	NED
VMCNG1G1.1	ATGTTACATTTCCCACCACTTT	TTTTCTCAATTCCAGAGGTCAC	(TC)6 (CT)29	216	58	HEX
VMCNG2E1	TTTGTGCTTCACTGTTCTGTTCTG	TATGGAGGGAGACCGTTGTTTC	(TC)13	113	58	FAM
VMCNG2G7	CAACAGAATTCAAATGAAATGGA	CAAACAGCATAAATACACAAGGA	(CT)18 (CT)8	132	57	HEX
VMCNG2H1	ACTGCAACAATTGCGACA	TTGAGGAAACACCACCAT	(CAG)7	218	57	FAM
VMCNG4B9	CTGGGGAGCATATACACATACCAG	CTCTCTCTTCCCAGATAGCCACC	(GA)13 (AG)6	160	56	HEX
VRZAG25	CTCCACTTCACATCACATGGCATGC	CGGCCAACATTTACTCATCTCTCCC	(GA)9	237	58	HEX
VRZAG30	TGGTAAACCTAGAAAAATTCATCAA	CATATGACCATGTCACTAAATTAAT	(GA)8	152	56	NED
VRZAG62	GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC	CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC	(TC)19	200	56	NED
VRZAG64	TATGAAAGAAACCCAACGCGGCACG	TGCAATGTGGTCAGCCTTTGATGGG	(TC)27	176	58	FAM
VRZAG67	ACCTGGCCCCGACTCCTCTTGTATGC	TCCTGCCGGCGATAACCAAGCTATG	(CT)7 (AT)10	172	58	NED
VRZAG79	AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG	TGCCCCCATTTTCAAACCTCCCTTCC	(GA)9	254	56	FAM
VRZAG83	GGCGGAGGCGGTAGATGAGAGGGCG	ACGCAACGGCTAGTAAATACAACGG	(TC)6 (T)15	158	56	FAM
VRZAG93	TATGGAGGGACCGAGGTGGGCTAGG	GCACTCTTCGACGTTAAACAAAGCC	(AG)14 (GA)6	212	56	NED
VRZAG112	CGTTTAAAGCCAGCTGAATCTTGGG	TGGCTCCATACTGCTTACGTAGGC	(CT)16	243	56	HEX
VVC6	GGTTGAGGACTGACCATTGA	CACAATCCAAGAAGCATCCTAT	(TC)14	112	60	NED
VVC19	TCAGAATCAGTCTCTTTAATCCTTT	GCGGCTGTTTAAAGGCTTT	(T)10 (AG)7	97	58	NED
VVC71	GAGATGTTGTGCTTCTGTGAGTT	GGCATGCAAAGCAGACAT	(GA)9	95	62	NED
VVC82	TGCTGTATGGCAGAATTGAA	CCCAACAAGACTCTCAATGTT	(GA)14	204	59	FAM
VVIB01	TGACCCTCGACCTTAAATCTT	TGGTGAGTGCAATGATAGTAGA	(CT)12	292	58	NED

VVIB09	ATGTTTTGATTCCTTAGGTGAC	CCTAAGAGCCATTCAAGATTAA	(TG)10 (TC)11	276	58	HEX
VVIB22	CCCTCCAATCTACATCCATGAA	CAGTGTGTTTCTTGATGGTCCA	(CT)8 (AC)6 (AC)6 (TC)6 (CA)9	160	58	FAM
VVIB31-DG-B	GGTTGGTACCAATGAAATCAAT	ACGTTCTCACAGTATTTCTCAA	(AG)10 (GAG)4.6	373	56	NED
VVIB66	CCACTAGTGGTCAGAAAAGAAG	TTGTATTGTGTGCCTCTTCTCA	(GA)12	102	59	NED
VVIC72	GTATTGTGTAAGCATTGTGTGG	GGACAAGGAGTTAGATATGAAC	(AG)8	257	58	HEX
VVIH01	GGGCTTTGCTGCGATATTTATT	ACACAGAATACGCAACTTTGCA	(CT)20	254	58	HEX
VVIH54	CCGCACTTGTGTTGAATTTAG	CAAACCGTTTTTACACCAGCAG	(GA)18	166	58	FAM
VVII51	ATCCCAAGAGAACCAAGAAACT	GCTGATCTCAGTGCATATGTTG	(AG)17	262	60	FAM
VVII52	AGATTTAGAGACGAAAAAGGGT	CTTGATCTTTAGTTGCAGTCTG	(TG)12 (TG)8	96	58	NED
VVIM01	GAAGAATTTTAGGAGTTGGTCA	GAAGAGAAGCAAGAAGTGATAA	(AC)9	183	56	NED
VVIM10	AGGTGAACTCTGTAAATATACG	GCTCAAAGTTGAAGATTTATCC	(GT)8	364	57	FAM
VVIM11	AAAAGCCCATTAAGTGCCAATG	CCTATGAACTTATTGGGCTCTT	(CT)8	287	56	HEX
VVIM43	GGTGTGTTTTCTTGTGTTTGT	AGGATACATGCTGAAGAATATG	(TC)17 (A)13	96	60	HEX
VVIM63	AAGCCTTCTACTTGTGTTGATGA	ATTTGTTCTCAAACAGGCACAT	(A)18 (TG)10	307	56	NED
VVIN04	GTGAAGGTGGTGTGTTGTAGATT	CCTAATTGGCTGAATGTGATCT	(AG)21	362	61	HEX
VVIN16	ACCTCTATAAGATCCTAACCTG	AAGGGAGTGTGACTGATATTC	(CA)6	155	58	NED
VVIN40	GCTGATTTGACTCATGGATATT	TTCCTTGTCTCCTCTGTTTCT	(CT)11 (T)10 (A)10	243	58	FAM
VVIN52	TTTTTGTCGACAACCAAGAAGG	CCATACACCTCACTAAATTCAG	(AG)11 (T)10	86	57	NED
VVIN56	GCCAAGTAGCCAAATTATAGAA	TTTATGCTCCGTGGTTTGAAAT	(AC)9 (A)11	175	58	HEX
VVIN61	ATAATAGATGACGCCAAAAGCAA	ATGAGCTACCTTCAAAAATGACA	(GA)17	361	61	NED
VVIN70	AATACCATAGAGGAGAAAAGCAA	TTCTCTCCTAGCCATTTTCT	(T)16 (GA)21	367	56	NED
VVIN73	TACTTCACCTAACAATACAGCT	AATACATAAGGTGAAGATGCCT	(AC)10	266	58	HEX
VVIN74	TTGGTTGAGGGAAAAAGGAAAG	AAGAAATATGAGGTTGGGTGAG	(AG)7 (AG)11	280	62	FAM
VVIN75	TGTTAAGTGAGATGCAAGAGAA	AGACAGACACAGTAAATATTGC	(TC)13 (TG)9	185	57	HEX
VVIN78	TAAAGGACCCATCTCAATGTTT	ACTGAGTATGGTGAATATTGAT	(TG)6	161	59	HEX
VVIN83	ACAATATTGTCCATGGCTTGAA	ACCCAAAAGTCTAATGCTACATT	(CA)6	235	61	FAM

VVIN85	ACAATGGGTAAAATAAGGGGAG	TAGTCTTAAATGGAGTGGGAGA	(AC)9 (GA)10	361	56	FAM
VVIN94	CTGATCTCAGTGCATATGTTGA	TCTTTAGTAGTGCTTCAACTCG	(TC)17	290	57	FAM
VVIO61	TTTGGACAAAGAGAGGAAATGG	GCCATGTAAAGCAGAAACTATC	(TG)6 (GA)5 (GA)8	231	58	HEX
VVIP02	CATTAAGTTAAGGCAACCACA	TCGAGTTGAAAGAAAATTGCCA	(AG)14 (GA)6	273	60	HEX
VVIP08	GAATAAGAGAGGGGCAATACTA	AGGAACAAGAAGCTTGAAGACT	(TG)9	74	59	HEX
VVIP17A	TTGGATCCATCACTCTTGTTTC	TTGGTTGAGGGAAAAAGGAAAG	(CT)15 (TC)12 (T)12	89	61	FAM
VVIP22	TTATCTGCTTAGGGAAAACGTA	AACACACCTTGAGAAAATAGCA	(TC)21 (T)14	362	60	FAM
VVIP26	CTTGCATGAGGATTTTTGTTGG	CCTCTTTAATTGCACAACCTTG	(CT)14	164	58	HEX
VVIP31	TATCCAAGAGACAAATCCCAC	TTCTCTTGTTTCCTGCAAATGG	(AG)20	190	59	FAM
VVIP33	AAACAATGCTGTAACTGGAT	AGGGGGTGTTAGTAATTTCAA	(TC)9 (CA)5 (CT)6	397	58	FAM
VVIP37	AGGACCAAGTGAAAAGCTTATA	GTATGTTTCATATGCTCCTAAGC	(A)13 (AG)6 (GATA)9 (AG)13	156	56	HEX
VVIP38	TTGTCCCTCCATTCTCCAGTT	CTTTACACCTACCTTTCAGGAG	(TC)10	106	58	HEX
VVIP60	GGGGAATAACTAAATTGAGGAT	GTATGAATGCGGATAGTTTGTG	(AC)8 (GT)10	310	56	NED
VVIP77	GGGTACGAATTCTCATGTTATC	CCATCTTCAATGAATCAATCCC	(CT)11	179	58	FAM
VVIQ32	CTCAAATTTACCAAGAAAGGT	ATTACCCTTGATTTTCCAAACG	(TG)10	105	57	FAM
VVIQ35	AGAGTTTACTAGGAGAACAGTG	CCTTCTCTATACGTCACAACCT	(AC)9 (AC)6	386	56	HEX
VVIQ36	AAACTGTATTGGTCCGAGATAT	TATGTGATCATAGCTTCAACG	(T)17 (GA)12	167	58	HEX
VVIQ52	TAAAAGGATGGTAGATGACAGA	ACAGGAAAGTGTTCAATGGTTA	(TC)11	85	60	HEX
VVIQ61	TGTAAGTCTAATCTTTCTGGG	GGAACAATGCTGGATAAGATGA	(TC)9 (CA)5 (CT)6	365	56	FAM
VVIQ67	TTGCTTTCAAATCTCTGGT	ATATGGGAATCAAGTTCAGAGT	(C)11 (CA)7	272	60	HEX
VVIR21	TTTCCCTTCTCACTCAATGATG	GAAAAGAAAACAGTGTATCCCC	(AG)11	170	59	FAM
VVIS63	GGCCTATAGGATTTTTCATGAA	GTATATCGGCCTCTTAATTGTT	(GT)7	184	58	NED
VVIS70	CAAGCAAGGGAAATCAAGAATC	AGCTCAGCATTGAATTCTTTCT	(TC)14	189	58	HEX
VVIT60	AACTTGATTGAACAAAGGCCA	TATTATGCCTATCCAGTTTCGA	(GA)25	280	56	FAM
VVIT68	GTGAATGAACAAAGTGGGAAAG	GGGTTGTTTCGTGTATTGTATG	(TC)9	261	56	NED
VVIU04	ACAAAAGCGGAAACGATCGAAT	AGAAGACCTATTTTCTGTGG	(CT)19	184	56	NED
VVIU20	ACAACCTTAATGCTTCTACCAA	TCACCATGGAGATTTTCTGTAG	(TG)10 (GA)15	387	58	FAM

VVIV04	TTTCTCCGAGAGCACAAAAAAC	CGGATTTTCTCCCTCTTCATTT	(AG)12	263	60	FAM
VVIV05	GGCAGCTGTGGAAAAAATATAT	AAAAGAACAAAAAGAGGGCACA	(CT)11	362	57	FAM
VVIV15A	ATTAGATTGCGTATGACATAGC	GGATGACCTATGGTTTAAAAAGT	(AT)7 (TC)12	104	59	FAM
VVIV24	GACTAAAAACCAAAGCTACTGT	AGCACGCATTTTCATCTGAATTT	(GA)7 (GA)7	363	58	FAM
VVIV33	AAAGAAAACGAGTTTGGAAAGGC	TGGGTGTTCTTGCTACTATAAT	(AG)18	361	60	HEX
VVIV36	AGCAAGAGCTCAATCCATAAAA	TAGTTAGTTGGCATAGTAGGTT	(AG)10	161	57	NED
VVIV67	TATAACTTCTCATAGGGTTTCC	TTGGAGTCCATCAAATTCATCT	3CA-AT-2CA-4GA-TT	367	56	FAM
VVMD14	CATGAAAAAATCAACATAAAAGGGC	TTGTTACCCAAACACTTCACTAATGC	(AC)9 (AC)6	245	56	HEX
VVMD17	TGACTCGCCAAAATCTGACG	CACACATATCATCACCACACGG	(AG)7 (A)10 (T)17 (A)15	211	56	NED
VVMD21	GGTTGTCTATGGAGTTGATGTTGC	GCTTCAGTAAAAAGGGATTGCG	(A)13 (A)21 (T)18 (C)9 (T22) (AT)6	246	56	FAM
VVMD24	GTGGATGATGGAGTAGTCACGC	GATTTTAGGTTTCATGTTGGTGAAGG	(CT)11 (T)10 (A)10	214	56	FAM
VVMD25	TTCCGTTAAAGCAAAGAAAAAGG	TTGGATTTGAAATTTATTGAGGGG	(AG)11 (T)10	241	58	FAM
VVMD26	GAGACGACTGGTGACATTGAGC	CCATCACCACCATTTCTACTGC	(AC)9 (A)11	250	56	FAM
VVMD28	AACAATCAATGAAAAGAGAGAGAGA	TCATCAATTTTCGTATCTCTATTGCTG	(AG)11 (GA)7	237	61	FAM
VVMD29	CCTTTGAACTTTGAAGTCTATGAGTCTG	AGCTAGAAACAGAACTCTCTCTCTCTC	(A)12 (AG)16	208	58	NED
VVMD30	CGAAAGAATTCCAAAGGGC	TCTAGGCACTCTTTTCGGTACTCC	(TC)20 (TC)9	104	58	NED
VVMD32	TATGATTTTTTAGGGGGTGAGG	GGAAAGATGGGATGACTCGC	(AG)15	271	56	HEX
VVMD34	GGTACATCAGTACTTGAAATGGTTGC	TTCTCCGTAGAAGCGTAAACAGC	(CT)11 (T)10 (A)10	237	58	NED
VVMD5	CTAGAGCTACGCCAATCCAA	TATACCAAAAATCATATTCCTAAA	(AG)14	227	56	NED
VVMD7	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT	CGAACCTTACACGCTTGAT	(CA)6	246	56	NED
VVS1	ACAATTGGAAACCGCGTGGAG	CTTCTCAATGATATCTAAAACCATG	(AG)15	181	58	HEX
VVS16	TCAAATATTATTCAAACCAAAGTACG	TCGATTTCAACAAATTTAGAAATATG	(GA)12	286	56	HEX
VVS2	CAGCCCGTAAATGTATCCATC	AAATTCAAAATTCTAATTCAACTGG	(TC)22	151	56	NED
VVS29	CCCCAAGGCTCTGAAAACAAT	TGCAAAGCAAATAAAGCTTCCA	(GT)9	174	58	FAM
VVS5	ATTGATTTATCAAACACCTTCTACAT	TAGAAAGATGGAAGGAATGGTGAT	(TG)21	118	60	NED
VvP18B20	TTGTATCCGACTTTGGGTAATAA	AGGGAGAGGGGAGAGGGAAAG		237	56	FAM

VvP18B32	ATCCACCATTGCCACACA	GCAGAAAGGGAGTGAAATGAAA		254	56	FAM
GT183H07	TTGCCAGTATAAATCTCATTG	TGCGGGTTCTATAAACATAAG	(T)19 (TGC)6	249	58	NED
p3_VvAGL11	GCAGAAGTTGCCCTCATCGT	AAGCCAAGGAATCACCCATT	(GAGA)n	193	56	FAM

Tabela 2. Genotipagem de 257 progênie F1 do cruzamento entre os híbridos CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88.

Isolado	VMC16F3	VMC1A12	VMC9G4	VVIH54	UDV009	VVIV04	VMC8B5	VVIB66	VVIP77	VMC3C11.1	VVMD5	VMC8D11	VMC4F3.1	VVIN74	VMC2H10	VMC4B7.2	VMC9D3	VVIN70	VMC5G7
733-34	171/199	119/135	150/180	155/175	110/144	259/265	142/156	83/101	172/190	92/100	229/233	114/122	178/186	286/288	104/110	259/293	187/197	364/372	174/180
1103-88	173/183	143/149	174/184	161/163	108/132	251/269	144/154	91/103	180/208	104/114	227/231	130/140	180/188	278/282	112/122	269/277	191/201	354/358	192/210
1	173/199	119/149	180/184	155/161	110/132	265/269	142/144	101/103	172/180	100/114	231/233	114/130	178/180	278/286	110/112	269/293	191/197	358/372	-/-
2	171/173	119/143	180/184	155/163	110/132	251/265	144/156	83/91	172/180	100/104	229/231	122/140	178/180	278/288	104/122	259/269	187/191	358/364	174/210
3	173/199	135/143	150/184	155/161	-/-	251/259	142/154	101/103	172/208	92/114	231/233	114/140	178/188	278/286	110/112	269/293	187/201	358/364	180/192
5	173/199	135/149	174/180	155/161	110/132	-/-	142/144	91/101	-/-	100/114	231/233	114/140	180/186	282/288	110/112	269/293	187/191	354/372	174/192
6	173/199	135/143	174/180	161/175	-/-	259/269	144/156	83/103	180/190	100/114	229/231	114/140	180/186	282/286	104/112	259/269	187/191	358/364	174/192
7	171/173	119/143	174/180	163/175	108/144	251/265	142/154	83/103	172/180	100/104	231/233	122/140	178/188	282/286	104/112	269/293	187/191	354/372	180/210
8	171/173	135/143	150/184	155/161	108/110	251/259	142/144	91/101	190/208	92/114	227/233	-/-	178/188	278/286	110/122	-/-	197/201	354/364	180/192
9	171/173	119/143	150/184	161/175	108/110	251/265	144/156	83/91	190/208	92/104	227/233	122/140	178/188	278/288	104/122	269/293	191/197	358/364	180/192
10	171/173	119/149	-/-	155/163	132/144	265/269	142/144	83/103	180/190	92/114	229/231	122/140	180/186	278/288	104/112	277/293	187/191	358/364	174/210
11	173/199	135/149	-/-	161/175	108/110	251/259	142/154	101/103	180/190	92/114	227/233	114/140	186/188	282/286	110/112	277/293	197/201	358/372	174/210
13	171/183	119/149	150/174	161/175	132/144	265/269	144/156	101/103	-/-	100/114	229/231	122/130	178/188	282/286	110/112	259/269	187/201	354/364	-/-
15	171/173	119/143	150/174	161/175	110/132	251/265	156/154	101/103	172/180	100/104	227/233	122/140	178/180	278/286	104/112	277/293	187/201	354/372	174/210
16	183/199	-/-	174/180	161/175	108/144	251/265	144/156	101/103	172/208	100/114	227/233	114/130	178/188	278/288	110/122	269/293	191/197	358/372	174/210
17	171/173	119/149	150/184	155/163	132/144	265/269	142/144	83/103	180/190	92/114	229/231	122/140	180/186	278/288	104/112	277/293	187/191	358/364	174/210
18	173/199	135/149	150/174	161/175	108/110	259/269	144/156	83/103	190/208	100/104	227/233	114/130	180/186	278/286	104/112	277/293	187/201	358/372	180/210
19	171/173	119/143	174/180	155/163	132/144	251/265	144/156	83/91	-/-	92/114	229/231	122/140	186/188	282/286	104/122	259/269	187/191	358/372	180/210
20	173/199	119/143	174/180	155/163	108/110	265/269	144/156	101/103	172/208	92/114	231/233	122/140	178/188	278/286	110/112	269/293	187/201	354/364	180/210
21	171/183	-/-	150/174	155/163	108/144	265/269	154/156	91/101	172/180	100/104	229/231	114/130	180/186	278/286	110/122	269/293	187/201	358/372	174/192
22	171/173	135/143	150/174	161/175	110/132	251/259	142/144	91/101	172/180	100/114	229/231	114/140	180/186	282/288	110/122	259/269	187/191	354/364	174/192
23	171/173	119/149	150/184	161/175	108/144	265/269	142/154	83/91	-/-	92/104	227/229	122/130	178/180	278/288	110/122	259/277	187/191	358/364	180/192
25	183/199	135/143	180/184	155/161	110/132	251/259	156/156	91/101	172/208	100/104	231/233	114/140	178/180	282/286	110/122	269/293	191/197	358/364	180/192
26	171/183	119/149	150/184	163/175	110/132	265/269	142/154	101/103	190/208	92/114	227/233	122/130	178/180	282/288	110/112	277/293	191/197	354/372	174/192
27	171/173	119/143	150/184	155/161	132/144	251/265	154/156	83/103	190/208	92/104	231/233	122/140	180/186	282/288	110/122	269/293	197/201	354/364	174/210
28	171/183	119/143	174/180	-/-	110/132	251/259	154/156	101/103	-/-	100/104	231/233	122/130	178/188	282/288	104/112	277/293	191/197	358/364	174/210
29	183/199	135/149	150/174	161/175	132/144	259/269	144/156	83/91	180/190	92/114	227/229	114/130	180/186	282/286	104/122	259/277	191/197	354/372	174/192
30	171/183	135/149	150/174	163/175	132/144	259/269	142/154	83/103	-/-	92/114	227/229	114/140	180/186	278/288	104/112	277/293	187/191	354/364	180/192
31	171/173	119/143	150/184	161/175	108/144	265/269	154/156	91/101	190/208	92/104	231/233	122/140	178/188	282/286	110/122	269/293	191/197	354/372	174/210
32	171/173	119/143	180/184	163/175	108/144	251/259	-/-	83/103	172/180	92/114	229/231	122/140	186/188	282/286	104/112	259/269	187/201	354/364	180/192
33	173/199	119/143	150/184	155/163	110/132	251/265	154/156	91/101	-/-	92/104	231/233	122/140	186/188	282/288	110/122	269/293	197/201	358/372	174/210
34	183/199	135/149	150/174	155/161	110/132	265/269	142/144	83/103	-/-	100/104	229/231	114/130	178/180	282/288	110/112	259/269	187/191	354/372	174/192
35	173/199	135/143	150/174	161/175	132/144	251/259	142/154	83/103	172/208	92/114	227/229	114/130	186/188	278/286	104/112	259/277	187/201	354/364	180/210
36	183/199	135/143	174/180	155/161	110/132	251/265	154/156	91/101	180/190	100/114	227/229	114/130	180/186	278/286	110/112	259/277	187/201	-/-	180/210
37	171/183	119/143	180/184	163/175	108/144	-/-	142/154	91/101	-/-	92/104	229/231	-/-	180/186	282/286	110/122	259/269	187/191	354/364	174/210
38a	171/173	119/143	150/184	155/161	110/132	251/265	142/154	101/103	180/190	100/104	231/233	122/140	180/186	282/286	110/122	269/293	197/201	354/372	180/210
38b	-/-	-/-	150/174	155/163	108/110	251/265	144/156	83/91	190/208	92/114	227/233	122/130	178/180	282/288	104/122	259/277	191/197	354/372	174/192
39	183/199	135/143	180/184	155/163	108/144	251/259	144/156	101/103	190/208	92/104	227/233	114/140	178/188	282/286	110/112	277/293	197/201	358/372	174/210
40	171/173	-/-	174/180	163/175	132/144	259/269	142/144	83/103	180/190	100/114	231/233	122/140	178/180	282/286	104/122	269/293	197/201	358/364	174/210
41	171/183	119/149	-/-	163/175	108/144	265/269	142/154	83/91	172/208	92/104	227/229	122/130	178/180	282/288	104/122	259/277	187/201	354/364	174/192
42	183/199	135/149	-/-	155/163	132/144	259/269	144/156	83/103	-/-	-/-	227/229	114/130	178/180	282/288	104/122	259/277	197/201	354/364	180/210
43	171/173	135/143	-/-	155/163	108/110	-/-	142/144	91/101	-/-	100/104	227/233	114/140	178/188	278/286	104/122	277/293	191/197	354/364	174/192

269	171/183	135/143	174/180	-/-	108/144	251/259	142/154	-/-	172/208	-/-	227/229	122/140	180/186	278/288	104/122	259/277	197/201	358/364	180/210
270	183/199	119/143	150/184	161/175	108/144	251/265	142/154	-/-	172/208	-/-	229/231	122/140	180/186	278/286	104/112	269/293	187/191	358/364	180/210
271	183/199	-/-	174/180	155/163	108/144	-/-	144/156	83/103	172/180	100/114	227/233	114/130	186/188	278/288	104/112	277/293	191/197	354/372	180/210
272	171/183	-/-	174/180	161/175	110/132	251/265	142/144	83/103	190/208	100/114	231/233	122/140	178/188	282/288	104/112	269/293	187/201	358/364	174/210
273	183/199	119/143	180/184	161/175	110/132	251/265	142/154	91/101	190/208	92/104	231/233	122/140	178/188	278/286	104/122	269/293	187/201	354/372	174/192
274	173/199	-/-	150/174	161/175	132/144	251/259	144/156	91/101	172/208	92/114	229/231	114/140	180/186	-/-	110/122	259/269	187/191	358/372	174/210
276	183/199	135/149	150/184	155/161	132/144	259/269	144/156	101/103	172/180	92/114	227/229	114/130	178/188	278/286	110/112	277/293	191/197	354/364	180/210
277	183/199	119/149	150/174	161/175	108/144	265/269	144/156	91/101	180/190	92/114	227/229	122/140	178/188	278/286	110/122	259/277	187/201	354/372	174/192
278	-/-	-/-	180/184	-/-	110/132	259/269	142/154	83/103	180/190	92/104	231/233	114/130	180/186	-/-	104/112	259/269	187/201	358/364	180/192
281	173/199	119/143	150/184	-/-	108/110	251/265	142/154	91/101	172/180	92/114	227/233	114/140	186/188	-/-	110/122	259/277	187/191	358/372	174/210
282	171/173	119/143	150/184	-/-	110/132	265/269	142/144	101/103	172/180	92/104	229/231	122/130	178/180	-/-	104/112	259/269	187/191	354/372	180/192
284	183/199	-/-	174/180	155/163	132/144	259/269	142/144	83/103	180/190	100/114	227/229	114/130	186/188	282/288	104/112	259/277	187/191	358/372	180/192
285	-/-	-/-	174/180	-/-	132/144	251/259	142/154	101/103	190/208	-/-	227/229	122/130	178/180	278/288	104/112	259/277	197/201	354/372	174/192
286	183/199	-/-	-/-	-/-	108/110	251/265	144/156	91/101	190/208	100/104	227/233	122/130	186/188	-/-	110/122	277/293	187/191	354/372	180/192
287	173/199	135/143	-/-	155/163	108/110	251/259	154/156	101/103	190/208	92/114	227/233	114/140	186/188	278/288	110/112	269/293	197/201	358/372	174/210
288	171/173	119/149	-/-	155/163	108/110	265/269	154/156	83/103	190/208	92/114	227/233	122/130	178/186	282/288	104/112	277/293	191/197	354/364	174/192
289	171/173	-/-	174/180	161/175	108/144	265/269	142/154	101/103	190/208	100/114	227/229	114/140	178/180	278/288	110/112	259/277	187/201	358/372	180/192
291	-/-	-/-	180/184	163/175	110/132	259/269	142/144	91/101	172/208	100/104	231/233	114/140	178/180	282/288	110/122	277/293	187/191	354/372	180/192
292	171/183	119/149	174/180	155/161	110/132	265/269	142/144	91/101	180/190	100/104	227/229	122/130	178/180	278/286	110/122	259/277	191/197	358/364	180/210
SP	-/-	-/-	150/184	161/175	132/144	259/269	144/156	101/103	190/208	92/104	229/231	122/140	178/188	278/286	110/112	259/269	-/-	354/364	174/210
93b	-/-	-/-	150/174	-/-	132/144	251/265	142/154	101/103	172/180	92/104	227/229	122/130	180/186	-/-	110/112	259/277	187/201	358/372	174/210
98	171/173	119/143	150/184	-/-	110/132	251/259	142/154	83/103	172/180	92/114	227/229	114/140	180/186	282/288	104/112	259/277	187/191	358/372	180/192
115	-/-	135/143	180/184	-/-	132/144	265/269	154/156	83/91	190/208	100/114	229/231	122/130	178/180	282/288	104/122	269/293	187/201	358/372	180/210
121	171/183	135/143	150/174	163/175	132/144	251/259	142/154	101/103	190/208	92/114	227/229	114/140	178/180	278/288	110/112	259/277	187/201	358/372	180/192
143	-/-	-/-	150/174	163/175	110/132	259/269	144/156	101/103	172/180	-/-	229/231	114/130	186/188	278/288	110/112	259/269	191/197	354/364	-/-
99	183/199	-/-	150/174	155/161	110/132	251/265	144/156	83/91	172/180	92/114	231/233	114/130	180/186	282/288	104/122	269/293	187/191	354/372	180/192
100	173/199	-/-	150/174	155/161	108/144	259/269	154/156	83/91	172/208	92/104	227/233	114/130	178/180	282/286	104/122	277/293	197/201	354/364	180/192
211	183/199	119/149	150/184	155/163	110/132	265/269	142/144	83/103	172/208	92/104	227/233	114/140	178/180	282/288	110/112	259/277	191/197	354/364	180/192
198	183/199	119/149	150/184	155/163	110/132	265/269	142/144	83/103	172/208	92/104	227/233	122/130	178/180	282/286	104/112	277/293	187/191	358/372	174/210

Tabela 2. Continuação

Isolado	UDV125	UDV017	VRZAG62	VMC1E8	VMC1F10	VMC6C10	VVIT60	VVIP17A	VMC3B12	VMC4D9.2	VMC4F9.1	VMC6G1	VVMD30	VVS29	VMC7A4	VMC3F8	VMC4A5	VVIQ36	VMC1E12
733-34	91/129	116/130	183/199	211/221	193/201	121/131	248/280	85/87	93/105	230/264	157/163	175/189	95/105	169/175	125/135	254/258	211/215	157/161	238/240
1103-88	105/117	112/118	185/191	225/227	205/227	109/135	260/266	77/81	107/117	236/250	145/154	185/195	99/113	165/177	113/119	252/262	195/223	171/173	234/246
1	91/117	-/-	191/199	211/225	193/205	109/131	248/260	77/85	105/117	230/250	154/157	175/195	95/99	165/169	119/125	254/262	195/211	161/171	234/240
2	91/105	116/118	183/191	211/227	201/227	109/131	260/280	77/87	93/117	230/250	154/157	175/185	95/113	169/177	113/135	252/258	215/223	-/-	240/246
3	117/129	-/-	191/199	221/225	201/205	109/121	248/266	77/85	105/107	250/264	154/163	189/195	99/105	165/175	113/125	254/262	195/215	161/171	238/246
5	91/117	-/-	191/199	221/227	193/205	109/131	260/280	81/85	93/107	230/236	154/163	189/195	95/99	165/175	113/125	252/254	211/223	-/-	234/240
6	-/-	-/-	191/199	221/225	201/205	109/121	260/280	81/85	105/107	230/250	145/157	189/195	95/113	165/169	113/125	258/262	215/223	157/171	238/246
7	-/-	116/118	183/185	211/225	201/227	131/135	260/280	77/85	93/117	230/236	145/163	175/185	95/99	165/175	119/135	258/262	215/223	-/-	234/240
8	105/129	112/116	183/191	221/225	201/227	121/135	248/266	77/85	93/117	236/264	145/163	175/185	99/105	165/169	113/125	252/254	195/215	-/-	234/238
9	91/117	118/130	183/191	221/227	193/205	121/135	248/260	77/85	105/117	230/236	145/163	185/189	95/99	165/175	113/135	252/258	195/211	157/173	238/246
10	117/129	112/130	183/191	221/225	201/205	109/131	260/280	77/87	105/117	230/236	145/157	189/195	95/99	175/177	113/135	258/262	215/223	157/171	240/246
11	91/105	112/130	191/199	221/225	193/227	131/135	248/266	81/85	105/107	236/264	145/157	189/195	99/105	165/169	113/125	254/262	211/223	161/171	234/240
13	91/117	116/118	191/199	221/225	-/-	-/-	266/280	81/85	105/107	230/236	154/163	175/185	95/99	169/177	113/135	254/262	215/223	161/171	234/238
15	91/117	112/130	183/185	-/-	-/-	-/-	266/280	77/85	105/107	236/264	154/163	189/195	99/105	165/169	113/135	254/262	215/223	161/171	234/238
16	91/105	112/116	185/199	221/225	193/227	109/121	260/280	77/87	93/107	236/264	145/163	189/195	99/105	165/169	119/125	254/262	195/215	161/171	240/246
17	-/-	112/116	183/191	221/225	201/205	109/131	260/280	81/85	93/117	230/236	145/157	189/195	95/99	175/177	113/135	258/262	215/223	157/171	240/246
18	117/129	112/130	185/199	221/225	201/205	109/121	266/280	77/85	105/117	230/236	154/157	189/195	95/99	165/169	119/125	258/262	215/223	157/171	238/246
19	-/-	-/-	183/191	211/227	193/227	109/131	260/280	77/85	93/107	250/264	145/157	175/185	105/113	165/169	113/135	252/258	215/223	-/-	240/246
20	91/117	116/118	183/191	211/227	201/205	109/131	266/280	77/85	93/107	250/264	154/163	175/195	-/-	165/175	113/135	254/262	195/215	-/-	238/246
21	91/105	116/118	185/199	221/227	193/227	109/121	266/280	77/85	105/117	250/264	145/163	185/189	99/105	175/177	119/125	252/254	195/215	161/173	240/246
22	117/129	112/116	183/185	211/227	201/205	131/135	260/280	81/87	105/107	250/264	154/163	175/195	105/113	169/177	113/125	252/254	215/223	161/173	240/246
23	91/105	112/116	183/191	211/227	193/227	109/121	260/280	77/87	105/107	250/264	145/157	175/195	105/113	165/175	119/135	252/258	211/223	157/173	238/246
25	91/117	-/-	185/199	221/227	193/205	131/135	248/260	81/85	105/107	250/264	145/163	189/195	105/113	169/177	119/125	252/254	211/223	-/-	234/240
26	117/129	-/-	183/185	211/225	201/205	121/135	248/260	81/87	93/107	230/236	145/163	175/195	99/105	175/177	119/135	254/262	211/223	-/-	234/240
27	105/129	-/-	183/191	221/225	-/-	-/-	248/266	77/85	93/117	250/264	154/163	185/189	105/113	165/169	113/135	258/262	195/215	157/171	234/240
28	91/105	-/-	183/185	211/225	193/227	109/131	260/280	81/87	105/107	250/264	154/157	175/195	105/113	175/177	119/135	254/262	195/215	161/171	240/246
29	117/129	118/130	191/199	-/-	201/205	109/121	248/260	81/85	105/117	250/264	145/157	185/189	105/113	175/177	113/125	252/258	215/223	157/173	240/246
30	105/129	118/130	183/185	221/225	201/227	109/131	260/280	77/87	93/107	230/250	154/163	-/-	95/113	165/169	113/125	258/262	211/223	157/171	238/246
31	91/117	118/130	183/191	221/227	201/205	131/135	248/260	81/85	93/117	236/264	154/163	185/189	99/105	175/177	113/135	252/254	211/223	-/-	234/240
32	117/129	112/116	183/191	211/225	201/205	131/135	266/280	77/87	105/107	236/264	154/157	175/195	99/105	169/177	113/135	258/262	195/211	157/171	234/240
33	117/129	116/118	191/199	221/227	201/205	109/121	248/266	81/85	105/107	250/264	145/157	175/185	105/113	165/169	113/135	252/254	215/223	161/173	240/246
34	-/-	-/-	185/199	221/227	201/205	121/135	260/280	81/87	93/107	230/236	145/157	175/195	95/99	175/177	119/125	252/258	195/215	-/-	234/238
35	117/129	116/118	191/199	211/225	201/205	121/135	266/280	77/85	93/107	250/264	145/163	175/185	105/113	175/177	119/125	258/262	195/211	157/171	238/246
36	117/129	116/118	185/199	221/227	201/205	109/131	266/280	77/87	105/107	236/264	154/163	175/195	99/105	175/177	119/125	252/254	195/215	161/173	240/246
37	91/117	112/130	183/185	221/227	193/205	109/131	260/280	81/85	105/117	250/264	145/157	189/195	105/113	175/177	119/135	252/254	195/211	161/173	238/246
38a	91/105	116/118	183/191	221/225	-/-	-/-	248/266	81/85	93/117	230/250	154/163	175/185	95/113	165/169	113/135	254/262	215/223	-/-	238/246
38b	91/117	112/116	183/191	211/227	-/-	-/-	248/266	81/87	93/117	236/264	154/163	175/185	95/99	165/175	113/135	252/258	195/215	157/173	238/246
39	105/129	112/130	185/199	221/225	-/-	-/-	248/266	81/85	93/117	230/250	154/163	189/195	95/113	169/177	119/125	254/262	211/223	-/-	234/240
40	105/129	-/-	183/191	221/225	201/227	109/121	248/266	77/85	105/117	230/250	154/157	189/195	105/113	165/169	113/135	258/262	215/223	157/171	238/246
41	105/129	112/130	183/185	221/227	201/227	109/131	266/280	81/87	105/107	230/250	145/163	189/195	95/113	175/177	119/135	252/258	215/223	157/173	240/246
42	105/129	112/116	185/199	211/225	201/227	109/121	248/266	81/87	93/107	230/250	154/157	175/195	-/-	-/-	119/125	258/262	195/211	157/171	238/246
43	91/105	112/130	183/191	221/227	193/227	109/131	260/280	81/85	93/117	230/236	145/163	189/195	95/99	165/169	113/125	252/254	195/215	161/173	238/246

95	91/105	118/130	185/199	221/225	193/205	131/135	266/280	81/85	105/107	236/264	145/157	185/189	99/105	165/175	-/-	254/262	195/211	161/171	234/238
96	91/105	116/118	183/191	-/-	193/227	131/135	260/280	77/87	105/117	230/236	145/157	175/185	95/99	169/177	-/-	252/258	195/215	-/-	234/240
97	91/105	112/130	183/191	211/227	193/227	131/135	260/280	81/85	105/107	230/236	145/157	189/195	99/105	169/177	-/-	252/258	211/223	157/173	234/240
101	91/105	116/118	191/199	211/227	193/227	109/131	260/280	77/87	105/117	250/264	154/157	175/185	95/113	175/177	113/125	252/254	195/211	161/173	234/238
103	105/129	118/130	185/199	221/227	201/205	109/121	266/280	81/87	93/117	236/264	154/157	185/189	95/99	175/177	119/125	252/254	211/223	157/173	238/246
104	105/129	116/118	191/199	211/227	201/227	109/131	266/280	81/85	93/107	236/264	145/157	175/185	99/105	169/177	119/125	252/254	211/223	161/173	234/240
105	105/129	118/130	183/191	211/225	201/227	109/121	248/266	81/85	93/117	230/250	154/157	185/189	95/113	165/175	113/135	258/262	-/-	-/-	240/246
106	117/129	112/130	191/199	221/225	201/205	121/135	248/260	77/85	93/117	236/264	145/163	185/189	99/105	165/169	113/125	258/262	195/211	157/171	238/246
107	117/129	112/130	183/191	221/227	201/205	109/131	248/266	77/85	105/117	230/250	145/163	189/195	95/113	175/177	113/135	252/254	195/215	161/173	240/246
108	91/117	118/130	191/199	-/-	193/205	109/121	266/280	81/85	-/-	-/-	-/-	185/189	105/113	169/177	113/125	254/262	195/215	161/171	234/238
109	91/105	112/116	185/199	211/225	193/227	121/135	266/280	77/85	93/107	250/264	145/163	175/195	105/113	169/177	119/135	254/262	195/211	161/171	238/246
110	91/117	-/-	191/199	-/-	193/205	109/121	248/260	77/87	-/-	-/-	-/-	189/195	99/105	165/175	113/125	258/262	211/223	157/171	238/246
111	91/105	118/130	185/199	-/-	193/227	131/135	248/266	81/85	105/107	236/264	145/163	185/189	99/105	165/169	119/125	252/254	195/211	161/173	234/238
112	117/129	-/-	183/191	211/225	193/205	131/135	260/280	81/87	93/117	250/264	145/163	175/195	95/113	165/169	113/135	258/262	215/223	157/171	240/246
113	105/129	116/118	183/191	211/227	201/227	109/121	266/280	77/85	105/117	250/264	154/157	175/185	105/113	169/177	113/135	252/258	215/223	157/173	238/246
114	105/129	118/130	185/199	221/225	201/227	131/135	266/280	81/87	105/107	250/264	145/157	185/189	105/113	165/175	119/125	258/262	215/223	157/171	234/240
116	117/129	112/130	183/191	221/227	-/-	-/-	260/280	81/85	-/-	-/-	-/-	185/189	95/113	165/175	113/135	252/254	215/223	161/173	240/246
117	91/105	112/130	183/185	221/225	193/227	109/131	266/280	77/85	93/107	-/-	154/157	189/195	95/99	165/169	119/135	258/262	215/223	157/171	240/246
118	105/129	116/118	183/191	211/227	193/227	121/135	266/280	77/87	-/-	-/-	-/-	175/185	105/113	165/169	113/125	252/258	215/223	157/173	234/240
119	91/117	112/116	183/185	211/227	193/205	109/121	266/280	77/85	93/107	250/264	154/157	175/185	105/113	169/177	119/135	252/254	-/-	-/-	238/246
120	117/129	112/116	191/199	211/227	201/205	109/121	260/280	77/87	93/107	236/264	145/163	175/195	105/113	165/169	119/125	252/258	211/223	157/173	234/238
123	91/117	116/118	191/199	221/227	193/205	109/121	260/280	77/85	105/117	236/264	145/163	185/189	99/105	169/177	113/125	252/254	215/223	161/173	238/246
124	105/129	116/118	183/185	211/227	201/227	109/121	248/260	77/87	93/107	230/236	154/163	175/185	95/99	165/175	119/135	252/254	211/223	161/173	238/246
126	91/105	112/116	183/185	211/227	193/227	109/131	260/280	81/85	105/117	230/236	154/157	175/195	95/99	165/175	113/135	252/258	211/223	161/173	234/240
127	91/117	112/130	185/199	221/227	201/205	121/135	248/260	77/87	105/117	230/250	154/157	189/195	95/113	175/177	119/125	252/254	195/211	161/173	234/238
128	91/105	112/130	183/185	221/227	193/227	109/121	260/280	77/85	105/117	230/236	145/163	189/195	95/99	165/169	119/135	252/254	215/223	161/173	238/246
129	91/105	112/116	183/185	221/225	-/-	-/-	260/280	81/87	105/117	230/250	154/157	175/195	95/113	169/177	113/135	254/262	211/223	161/171	240/246
130	105/129	112/116	183/185	211/227	201/227	109/131	260/280	77/85	93/107	230/250	145/163	175/185	95/113	165/169	119/135	252/258	215/223	157/173	240/246
131	117/129	112/116	191/199	211/225	201/205	131/135	266/280	-/-	93/107	236/264	145/163	175/195	99/105	165/169	113/125	258/262	215/223	157/171	234/238
132	105/129	112/116	191/199	211/225	201/227	121/135	248/260	81/85	93/107	230/236	154/157	175/185	95/99	175/177	113/125	258/262	195/211	157/171	234/238
133	105/129	112/116	185/199	211/225	201/227	109/121	248/266	77/87	93/107	236/264	154/163	175/195	99/105	169/177	119/125	258/262	211/223	157/171	238/246
134	117/129	116/118	183/191	-/-	201/205	121/135	266/280	81/85	105/117	250/264	154/163	175/195	105/113	165/175	113/135	252/258	211/223	157/173	234/238
135	91/117	116/118	185/199	221/227	193/205	121/135	266/280	77/85	105/107	230/236	154/157	175/185	-/-	165/169	113/125	252/254	195/211	161/173	234/240
136	91/117	118/130	191/199	221/225	193/205	131/135	248/260	77/85	93/117	250/264	145/163	185/189	105/113	175/177	113/125	254/262	211/223	161/171	234/240
137	91/105	112/130	191/199	221/225	193/227	131/135	-/-	81/87	93/107	230/236	145/157	-/-	-/-	-/-	113/125	-/-	195/211	161/171	234/240
138	105/129	112/130	191/199	221/227	201/227	121/135	260/280	77/87	105/107	250/264	145/157	189/195	95/113	169/177	113/135	252/254	211/223	161/173	238/246
139	105/129	-/-	185/199	221/225	201/205	109/121	266/280	81/85	93/117	230/250	145/163	189/195	95/113	165/169	119/125	254/262	211/223	161/171	238/246
140a	91/117	112/130	183/191	221/225	-/-	-/-	260/280	77/87	105/107	230/250	154/163	185/189	95/113	175/177	113/125	258/262	195/215	157/171	240/246
140b	91/105	112/116	191/199	211/225	-/-	-/-	266/280	77/87	93/107	230/250	154/163	175/195	95/113	165/175	113/125	254/262	195/215	161/171	238/246
141	105/129	-/-	183/185	-/-	201/227	109/121	-/-	77/85	93/117	-/-	145/157	-/-	-/-	169/177	113/135	254/262	195/211	161/173	240/246
142	105/129	118/130	191/199	221/227	201/205	109/121	248/266	81/87	105/117	236/264	145/157	185/189	95/99	175/177	113/125	252/258	211/223	157/173	234/238
144	-/-	112/130	185/199	-/-	193/227	121/135	260/280	81/87	105/107	230/236	154/163	189/195	95/99	169/177	119/135	258/262	195/215	157/171	234/238
145	105/129	112/130	185/199	221/225	201/227	109/131	260/280	81/85	93/117	250/264	145/163	189/195	105/113	175/177	119/125	254/262	211/223	161/171	240/246
146	91/117	112/130	191/199	221/225	193/205	109/121	266/280	77/85	93/117	230/250	145/163	-/-	95/113	165/169	113/125	258/262	211/223	157/171	234/238
147	117/129	116/118	191/199	-/-	201/205	121/135	266/280	81/87	105/117	230/250	154/163	175/185	95/113	169/177	113/135	252/254	195/211	161/173	234/238
148	91/117	112/130	185/199	221/227	193/205	109/121	260/280	77/85	105/107	230/236	145/163	189/195	95/99	165/175	119/125	252/258	215/223	157/173	238/246
149	91/105	112/116	191/199	-/-	193/227	109/121	266/280	77/87	93/107	230/236	154/163	175/195	95/99	165/169	113/125	258/262	195/211	157/171	238/246

150	91/105	112/130	185/199	211/225	201/227	109/121	-/-	77/85	93/117	230/250	145/157	-/-	95/99	165/169	119/135	258/262	195/211	157/171	234/238
151	91/117	118/130	191/199	221/225	193/205	131/135	266/280	81/87	93/107	230/250	145/163	-/-	95/99	175/177	113/125	254/262	195/211	161/171	234/240
152	91/117	112/116	183/191	211/225	201/205	131/135	260/280	77/85	93/117	236/264	145/157	175/195	99/105	169/177	113/135	252/254	211/223	161/171	234/238
153	91/105	112/130	183/185	221/225	193/227	109/131	260/280	77/87	105/107	230/250	154/163	-/-	95/113	169/177	119/135	258/262	215/223	157/171	234/240
154	105/129	112/130	191/199	211/225	201/227	121/135	248/260	81/87	93/117	230/250	154/163	175/185	95/113	165/169	113/125	254/262	215/223	161/171	234/238
155	91/117	118/130	185/199	221/225	193/205	109/121	248/260	77/85	93/107	250/264	154/157	185/189	105/113	165/175	113/125	254/262	195/211	161/171	238/246
156	-/-	112/130	183/185	-/-	201/227	121/135	260/280	77/87	93/107	230/236	154/163	189/195	95/113	175/177	119/135	258/262	195/215	157/171	234/238
157	91/105	118/130	185/199	-/-	-/-	-/-	260/280	81/85	93/107	236/264	154/163	185/189	99/105	165/169	119/125	258/262	211/223	157/171	234/238
160	117/129	112/130	183/185	211/225	201/205	109/121	-/-	81/87	105/107	236/264	154/157	185/189	99/105	165/175	113/125	258/262	195/215	157/171	238/246
163	105/129	118/130	183/191	211/227	201/227	131/135	248/266	77/85	93/107	230/250	145/157	185/189	105/113	165/169	-/-	252/258	-/-	-/-	240/246
164	105/129	112/130	183/191	221/227	201/227	109/121	266/280	81/85	105/117	250/264	145/157	189/195	99/105	169/177	113/135	252/258	195/215	157/173	238/246
165	91/105	-/-	185/199	221/225	193/205	109/121	260/280	77/87	93/117	230/236	154/157	189/195	95/99	169/177	113/125	258/262	195/211	157/171	238/246
166	91/117	118/130	183/185	221/227	193/205	131/135	266/280	81/87	93/107	230/236	145/157	185/189	99/105	169/177	119/135	252/254	211/223	161/173	234/240
168	117/129	112/130	185/199	221/227	-/-	-/-	248/266	77/87	-/-	-/-	-/-	189/195	95/113	165/169	119/135	252/258	215/223	157/173	234/240
169	117/129	112/130	183/191	-/-	-/-	-/-	248/260	77/85	105/117	236/264	154/157	189/195	99/105	165/175	113/135	252/258	195/215	157/173	240/246
170	91/105	112/116	183/185	221/227	201/227	109/131	248/266	81/85	93/107	230/236	145/157	175/195	95/99	175/177	113/135	252/258	195/215	157/173	240/246
171	105/129	116/118	183/185	221/227	-/-	-/-	248/260	77/87	93/107	230/236	154/163	175/185	95/99	165/175	119/135	252/254	211/223	161/173	238/246
172	91/117	112/130	191/199	221/227	193/205	131/135	260/280	77/87	105/117	250/264	145/157	189/195	105/113	165/175	113/125	252/254	215/223	161/173	234/240
173	91/105	118/130	185/199	221/225	193/227	131/135	248/266	81/85	93/107	230/236	145/157	175/185	-/-	175/177	119/125	254/262	211/223	161/171	234/238
174	91/105	112/130	191/199	221/227	193/205	109/121	266/280	77/85	105/107	250/264	154/157	189/195	95/99	165/175	113/125	252/254	195/215	161/173	234/238
175	91/105	112/130	183/185	221/225	193/227	109/131	248/266	81/85	105/117	-/-	154/157	189/195	95/99	165/175	119/135	254/262	215/223	161/171	240/246
176	117/129	118/130	185/199	221/225	201/205	121/135	260/280	77/85	93/117	250/264	145/157	185/189	95/113	165/175	119/125	258/262	211/223	157/171	234/240
177	91/117	116/118	191/199	211/225	193/205	121/135	-/-	77/85	105/117	-/-	154/157	175/185	95/113	169/177	113/125	254/262	195/211	161/171	-/-
178	117/129	112/116	191/199	211/225	201/205	109/131	266/280	77/87	105/107	236/264	154/157	175/195	99/105	165/169	113/125	258/262	215/223	157/171	240/246
179	91/105	112/116	191/199	211/227	-/-	-/-	248/260	81/85	105/107	236/264	154/163	175/195	99/105	165/175	113/135	252/258	195/211	157/173	234/238
180	91/117	112/116	183/191	211/225	193/205	109/121	266/280	77/87	105/117	230/236	145/163	175/195	95/99	165/175	113/135	254/262	195/211	161/171	238/246
181	91/117	-/-	191/199	221/225	193/205	109/131	260/280	81/87	105/107	250/264	145/163	-/-	95/113	165/175	113/125	254/262	215/223	161/171	240/246
182a	105/129	112/130	191/199	-/-	201/227	121/135	248/260	81/85	93/117	250/264	145/157	189/195	95/113	165/169	113/125	258/262	215/223	157/171	234/238
182b	105/129	118/130	183/191	221/227	201/227	109/121	266/280	77/85	93/107	-/-	154/157	185/189	99/105	165/175	119/125	252/254	195/215	161/173	238/246
184	91/105	112/116	183/191	-/-	-/-	-/-	266/280	77/87	93/107	250/264	145/157	175/195	105/113	169/177	113/135	258/262	195/215	157/171	234/240
185	105/129	112/130	191/199	221/225	201/227	109/121	248/266	81/85	105/107	250/264	154/157	189/195	105/113	165/169	113/125	258/262	195/211	157/171	238/246
186	91/117	112/116	183/185	211/225	193/205	109/121	248/260	81/85	93/107	230/250	145/157	-/-	99/105	175/177	119/125	254/262	195/211	161/171	234/238
187	91/105	112/116	191/199	-/-	193/227	121/135	248/260	81/85	93/117	230/250	145/163	175/195	95/113	165/169	113/125	254/262	195/215	161/171	234/238
188	91/117	116/118	183/191	211/227	193/205	109/121	248/266	81/87	93/117	236/264	154/163	175/185	95/99	165/175	113/135	252/258	195/215	157/173	238/246
189	105/129	116/118	183/191	221/225	-/-	-/-	248/266	81/87	-/-	-/-	-/-	175/185	95/113	175/177	113/135	254/262	195/211	161/171	238/246
191	117/129	112/116	183/191	211/227	201/205	109/121	260/280	77/87	105/107	230/250	154/163	175/195	95/113	169/177	113/135	252/254	195/211	161/173	240/246
192	91/105	112/116	191/199	-/-	193/227	131/135	260/280	77/87	93/107	-/-	154/157	175/195	95/113	165/175	113/125	258/262	195/215	157/171	234/240
193	105/129	112/130	183/185	211/225	201/227	121/135	248/266	77/87	93/107	250/264	145/163	189/195	95/113	169/177	119/125	252/258	211/223	157/171	234/238
201	91/105	112/130	191/199	-/-	193/227	121/135	248/260	77/85	105/107	250/264	145/163	189/195	95/113	169/177	113/125	252/254	215/223	161/173	234/238
202	117/129	112/116	185/199	-/-	-/-	-/-	248/260	81/87	-/-	-/-	-/-	175/195	95/99	169/175	-/-	258/262	-/-	-/-	238/246
204	91/105	118/130	183/185	-/-	193/227	131/135	266/280	77/87	-/-	-/-	-/-	185/189	95/113	165/169	119/135	254/262	-/-	-/-	234/240
206	117/129	112/116	191/199	-/-	201/205	131/135	248/266	81/85	93/117	230/250	154/163	175/195	95/113	175/177	113/125	258/262	195/215	157/171	234/238
208	91/105	112/130	185/199	221/225	193/227	109/121	248/266	77/87	105/107	230/250	145/157	189/195	95/113	175/177	119/125	258/262	195/211	157/171	234/238
210	117/129	112/116	191/199	211/225	-/-	-/-	266/280	77/85	-/-	-/-	-/-	175/195	95/99	169/175	113/125	258/262	211/223	157/171	240/246
212	-/-	118/130	183/191	211/227	193/227	109/131	-/-	77/87	105/107	250/264	145/157	185/189	105/113	165/169	119/135	252/258	195/211	157/173	240/246
213	-/-	112/130	183/185	211/227	201/205	109/121	248/260	81/85	105/117	250/264	154/157	189/195	105/113	169/177	119/135	252/258	215/223	161/173	240/246
214	91/105	112/116	185/199	211/225	193/227	131/135	260/280	77/85	93/117	236/264	145/157	175/195	99/105	175/177	119/125	258/262	215/223	157/171	234/240

215	-/-	116/118	185/199	211/227	-/-	-/-	260/280	81/87	93/107	230/250	154/163	175/185	95/113	165/169	-/-	252/254	-/-	-/-	240/246
216	117/129	118/130	-/-	211/227	201/205	131/135	260/280	81/87	105/117	236/264	145/157	185/189	99/105	169/177	113/135	252/258	215/223	157/173	240/246
218	-/-	116/118	183/191	211/227	201/205	109/131	248/266	81/87	93/107	230/236	145/157	175/185	95/99	165/175	113/125	252/258	-/-	-/-	240/246
219	91/117	112/130	183/191	221/227	-/-	-/-	248/260	77/85	105/117	236/264	154/163	189/195	99/105	169/177	113/135	252/254	-/-	-/-	234/240
220	117/129	112/116	191/199	221/225	-/-	-/-	260/280	77/87	93/117	236/264	154/163	175/195	99/105	169/177	113/125	254/262	-/-	-/-	234/238
221	-/-	112/130	185/199	221/225	201/227	131/135	248/260	81/87	93/107	236/264	154/157	189/195	99/105	165/169	119/125	258/262	215/223	157/171	234/238
222	117/129	116/118	183/191	211/227	201/205	121/135	266/280	81/85	105/107	236/264	154/157	175/185	99/105	165/169	113/125	252/258	195/215	157/173	238/246
224	117/129	112/116	183/185	221/227	-/-	-/-	248/266	77/87	93/107	230/250	154/163	175/195	95/113	165/169	-/-	252/258	-/-	-/-	234/240
225	-/-	116/118	185/199	211/227	193/205	109/121	248/266	81/87	105/117	236/264	145/163	175/185	99/105	169/177	113/125	252/254	195/215	161/173	238/246
226	91/105	116/118	183/191	211/227	-/-	-/-	260/280	81/85	105/117	230/236	154/163	175/185	95/99	165/169	113/135	252/258	211/223	157/173	234/240
227	117/129	112/116	191/199	-/-	201/205	121/135	260/280	77/85	105/107	236/264	154/157	175/195	99/105	165/169	113/125	252/254	-/-	-/-	234/238
228	-/-	118/130	-/-	-/-	201/205	121/135	248/266	81/87	93/107	250/264	145/163	185/189	105/113	165/169	113/125	258/262	-/-	-/-	234/238
229	117/129	112/116	185/199	-/-	201/205	109/131	266/280	81/87	105/107	236/264	145/163	175/195	99/105	165/169	119/125	252/258	215/223	157/173	238/246
230	117/129	112/130	183/191	221/227	-/-	-/-	248/260	77/85	105/117	250/264	154/163	189/195	105/113	165/169	113/125	252/254	211/223	161/173	234/240
231	-/-	112/116	-/-	-/-	193/227	131/135	260/280	77/87	93/107	230/250	145/163	175/195	95/113	169/177	113/135	254/262	-/-	-/-	234/240
232	-/-	118/130	183/185	211/227	-/-	-/-	248/260	81/87	105/107	230/236	154/163	185/189	95/99	175/177	119/135	252/258	211/223	157/173	238/246
233	-/-	112/130	185/199	-/-	-/-	-/-	248/266	81/85	93/107	230/250	154/163	189/195	95/113	165/175	-/-	254/262	215/223	161/171	234/238
234	117/129	112/130	183/185	211/227	201/205	109/121	260/280	77/87	105/107	250/264	145/163	189/195	105/113	169/177	119/135	252/258	195/211	157/173	240/246
235	91/105	112/116	183/185	211/225	-/-	-/-	266/280	77/85	105/107	230/250	154/163	175/195	95/113	165/175	119/135	254/262	211/223	161/171	234/240
236	105/129	112/116	183/185	211/227	-/-	-/-	260/280	81/85	105/117	230/236	154/157	175/195	95/99	165/169	119/125	252/258	211/223	157/173	240/246
237	91/117	112/130	183/191	221/227	193/205	109/131	260/280	81/87	105/117	230/236	154/157	189/195	95/99	165/169	113/135	252/254	211/223	161/173	238/246
239	117/129	118/130	183/191	211/227	-/-	-/-	248/266	77/85	105/117	230/236	154/163	185/189	95/99	175/177	113/135	252/258	211/223	157/173	234/238
240	105/129	112/116	185/199	211/227	201/227	131/135	248/260	77/85	93/117	230/236	154/157	175/195	99/105	175/177	119/125	252/254	-/-	-/-	234/238
242	105/129	118/130	185/199	211/225	201/227	131/135	266/280	81/85	93/117	250/264	154/163	185/189	105/113	165/169	119/125	258/262	211/223	157/173	234/240
243	-/-	112/130	183/185	211/225	-/-	-/-	248/266	81/85	105/117	230/250	154/163	-/-	95/113	169/177	119/125	258/262	215/223	157/171	234/238
245	105/129	116/118	185/199	221/225	201/227	121/135	260/280	81/87	93/107	250/264	145/163	175/185	105/113	165/169	119/125	254/262	195/211	161/171	234/238
246	105/129	112/116	183/185	211/227	201/227	109/131	266/280	77/85	105/107	236/264	154/157	175/195	99/105	165/169	119/135	252/258	211/223	157/173	240/246
247	-/-	112/130	191/199	221/227	201/227	109/131	266/280	81/87	105/107	230/236	154/157	189/195	95/99	169/177	113/125	252/258	195/211	157/173	238/246
248	91/117	118/130	183/185	221/227	-/-	-/-	266/280	77/87	105/107	236/264	154/163	185/189	99/105	165/175	119/135	252/254	215/223	161/173	238/246
249	91/105	118/130	183/185	-/-	-/-	-/-	248/260	81/87	93/117	230/250	154/163	185/189	95/99	175/177	-/-	252/258	195/215	157/173	238/246
250	91/105	112/116	185/199	-/-	193/227	121/135	260/280	77/85	105/107	250/264	154/157	175/195	105/113	169/177	119/125	254/262	215/223	161/171	238/246
251	91/105	112/116	185/199	211/227	-/-	-/-	266/280	77/85	93/107	230/236	154/163	175/195	95/99	169/177	119/125	252/258	195/211	157/173	234/238
252	105/129	118/130	-/-	221/225	-/-	-/-	266/280	77/85	105/107	250/264	154/163	185/189	105/113	175/177	113/135	254/262	195/215	161/171	238/246
253	-/-	116/118	191/199	211/227	193/227	109/121	248/266	77/87	93/107	250/264	154/157	175/185	105/113	165/169	113/125	252/258	-/-	-/-	238/246
255	117/129	112/116	185/199	211/225	201/205	131/135	266/280	77/87	105/117	230/250	154/157	175/195	95/113	165/169	119/125	258/262	215/223	157/171	234/240
256	91/117	118/130	185/199	211/225	193/205	131/135	248/260	77/87	93/117	236/264	154/157	185/189	99/105	169/177	119/125	258/262	-/-	-/-	240/246
257	117/129	112/130	185/199	221/225	201/205	131/135	260/280	77/85	105/117	250/264	154/157	189/195	105/113	165/175	119/125	258/262	211/223	157/171	234/238
258	-/-	112/130	185/199	211/227	201/205	109/121	248/266	81/87	93/117	230/250	145/163	189/195	95/113	169/177	119/135	252/258	195/215	157/173	238/246
259	91/105	112/116	-/-	-/-	-/-	-/-	248/260	77/85	93/117	236/264	154/157	175/195	99/105	175/177	113/135	252/254	-/-	-/-	240/246
260	-/-	116/118	183/185	211/225	-/-	-/-	248/260	77/85	93/107	230/236	154/163	175/185	95/99	175/177	119/135	254/262	195/215	161/171	234/238
261	105/129	112/116	183/191	211/227	201/227	109/121	266/280	77/87	105/117	236/264	154/157	175/195	99/105	175/177	113/135	252/258	195/215	157/173	234/238
262	91/105	112/116	183/191	-/-	201/227	131/135	248/266	77/87	93/107	230/236	154/157	175/195	95/99	165/175	113/125	252/254	215/223	161/173	234/240
263	91/105	112/130	185/199	211/227	193/227	109/131	266/280	77/85	105/107	236/264	145/163	189/195	95/99	165/169	119/135	252/258	211/223	157/173	238/246
265	91/105	112/130	183/185	221/225	193/227	131/135	248/266	77/85	93/107	250/264	154/157	189/195	105/113	165/175	119/125	254/262	-/-	-/-	234/240
266	105/129	118/130	183/185	211/225	201/227	121/135	266/280	77/85	105/107	230/236	154/157	185/189	95/99	165/175	119/135	258/262	195/211	157/171	234/238
267	91/105	116/118	183/185	221/225	-/-	-/-	260/280	77/87	93/107	230/236	154/163	175/185	95/99	169/177	119/135	252/258	211/223	157/173	234/240
268	91/117	112/116	191/199	-/-	193/227	109/131	248/260	81/87	93/107	230/236	154/163	175/195	95/99	175/177	113/125	254/262	-/-	-/-	238/246

269	91/105	112/130	183/185	211/225	193/227	109/131	248/266	77/87	105/117	230/250	145/163	189/195	95/113	165/169	113/135	252/258	195/215	157/171	240/246
270	91/117	118/130	185/199	211/225	193/205	109/131	260/280	77/85	105/107	250/264	154/163	185/189	105/113	175/177	119/125	254/262	211/223	161/171	234/240
271	91/117	112/116	185/199	211/225	193/227	109/131	-/-	77/87	93/117	236/264	154/163	175/195	99/105	169/177	119/125	258/262	195/215	157/171	234/238
272	-/-	112/130	183/191	211/225	-/-	-/-	266/280	81/87	105/107	230/250	154/163	189/195	95/113	165/175	113/135	258/262	211/223	157/171	234/238
273	-/-	116/118	185/199	221/227	-/-	-/-	266/280	77/85	105/117	230/236	154/163	175/185	95/99	169/177	119/135	252/254	195/211	161/173	234/238
274	-/-	112/116	-/-	211/227	193/205	109/131	260/280	81/85	105/117	230/250	145/163	175/195	95/113	175/177	113/125	252/254	215/223	161/173	240/246
276	117/129	112/116	185/199	-/-	201/205	109/121	248/260	77/85	105/107	250/264	154/163	175/195	105/113	175/177	119/125	254/262	-/-	-/-	238/246
277	91/117	116/118	185/199	-/-	193/205	121/135	266/280	77/85	105/107	230/236	154/157	175/185	95/99	165/169	113/125	252/254	195/211	161/173	234/240
278	117/129	112/116	185/199	211/225	201/205	121/135	248/266	81/85	105/107	236/264	154/157	189/195	99/105	165/175	119/125	258/262	211/223	157/171	234/238
281	91/117	112/116	191/199	-/-	-/-	-/-	260/280	77/85	105/117	230/236	154/163	175/195	95/99	165/169	113/125	252/254	215/223	161/173	234/240
282	91/105	112/116	183/191	211/225	193/227	131/135	260/280	77/85	105/107	230/236	154/157	175/195	95/99	165/175	113/135	254/262	195/211	161/171	234/240
284	117/129	112/116	185/199	211/225	201/205	109/121	266/280	77/87	105/117	250/264	154/157	175/195	105/113	165/175	119/125	258/262	211/223	157/171	238/246
285	91/117	118/130	185/199	221/225	193/205	121/135	248/266	77/87	105/117	230/250	145/163	185/189	95/113	175/177	119/135	254/262	211/223	161/171	238/246
286	91/105	112/116	185/199	-/-	193/227	121/135	266/280	81/85	93/117	250/264	154/157	175/195	95/113	165/169	119/125	252/254	215/223	161/173	234/238
287	91/117	118/130	191/199	221/225	193/205	109/121	248/266	77/87	93/117	250/264	154/157	185/189	105/113	169/177	113/125	254/262	211/223	161/171	238/246
288	-/-	112/116	183/191	211/225	193/227	109/131	260/280	81/87	93/107	230/250	145/163	175/195	95/113	165/169	119/135	258/262	-/-	-/-	240/246
289	-/-	-/-	183/191	221/225	201/227	109/121	266/280	77/87	105/117	230/250	145/157	189/195	95/113	165/175	113/125	254/262	211/223	161/171	238/246
291	117/129	112/130	183/191	221/227	-/-	-/-	260/280	81/87	105/107	230/250	154/163	189/195	95/113	169/177	113/135	252/254	195/215	161/173	234/240
292	117/129	116/118	183/185	-/-	201/205	109/121	248/266	77/85	93/117	230/250	154/157	175/185	95/113	169/177	119/135	252/254	195/215	161/173	238/246
SP	91/105	112/116	183/185	-/-	193/227	131/135	266/280	77/85	105/107	250/264	154/163	175/195	105/113	165/175	119/135	254/262	195/215	161/171	234/240
93b	-/-	118/130	183/185	221/225	-/-	-/-	260/280	77/87	93/107	230/250	154/163	185/189	95/113	165/175	-/-	254/262	215/223	161/171	238/246
98	-/-	112/116	-/-	211/225	201/205	121/135	260/280	81/87	105/107	250/264	154/157	175/195	105/113	175/177	113/135	258/262	195/211	157/171	234/238
115	91/105	112/130	183/185	211/227	193/227	109/121	248/266	81/87	105/117	250/264	145/163	189/195	105/113	175/177	119/135	252/258	195/215	157/173	240/246
121	105/129	118/130	183/185	221/225	201/227	109/121	266/280	77/87	105/117	230/236	145/157	185/189	95/99	165/175	119/125	254/262	195/215	161/171	238/246
143	-/-	118/130	191/199	221/225	-/-	-/-	248/260	77/87	105/107	250/264	154/163	185/189	105/113	169/177	119/125	254/262	215/223	161/171	234/238
99	91/117	118/130	185/199	211/227	-/-	-/-	260/280	81/87	105/117	236/264	154/157	185/189	99/105	165/169	119/125	252/258	195/211	157/173	238/246
100	117/129	116/118	191/199	211/227	193/205	109/131	248/266	81/85	93/107	230/236	154/157	175/185	99/105	175/177	113/125	252/258	195/211	157/173	240/246
211	-/-	112/116	185/199	221/225	-/-	-/-	248/260	81/87	105/117	230/236	154/163	175/195	95/99	175/177	119/125	254/262	211/223	161/171	238/246
198	91/117	112/130	185/199	211/225	193/205	109/121	260/280	81/85	105/117	230/236	154/157	189/195	95/99	165/175	119/125	258/262	-/-	-/-	238/246

Tabela 2. Continuação

Isolado	UDV041	UDV129	VVIB31-DG-B	VRZAG112	VRZAG79	VRZAG83	VVIN52	VVIN40	VVMD7	VVIV36	VVIN56	VVIU04	VVII51	VVIP02	VVIQ52	VMC8G9	VMC8F10	VMC2H12	VVIV33	UDV053
733-34	140/160	142/146	345/373	226/242	244/254	186/192	95/99	227/231	233/245	149/161	166/170	186/192	241/243	261/271	75/77	167/181	196/230	108/112	343/351	115/119
1103-88	170/182	148/150	361/379	230/236	252/256	188/198	87/93	243/245	235/247	153/171	158/168	178/192	243/245	265/271	75/79	161/167	196/218	102/112	337/343	111/119
1	140/170	142/148	345/361	236/242	244/252	188/192	93/95	231/245	233/247	153/161	168/170	178/192	-/-	-/-	75/79	167/181	218/230	112/112	343/343	119/119
2	140/170	142/150	361/373	236/242	244/252	188/192	93/99	227/245	245/247	149/171	158/170	178/192	243/245	261/271	75/79	167/181	196/230	112/112	343/343	119/119
3	140/182	146/148	345/379	226/236	244/256	192/198	87/95	227/243	233/247	161/171	-/-	178/186	243/245	265/271	75/77	167/181	-/-	108/112	337/351	111/115
5	160/170	142/148	345/361	230/242	244/252	188/192	93/95	227/243	233/247	161/171	166/168	178/192	241/243	265/271	77/79	167/167	196/230	102/112	337/351	111/115
6	160/182	146/148	361/373	226/236	254/256	186/188	87/95	227/245	233/247	161/171	166/168	192/192	-/-	-/-	75/79	167/167	-/-	108/112	337/351	111/115
7	140/170	142/148	345/379	230/242	244/252	188/192	87/99	227/245	235/245	149/153	158/170	192/192	241/243	261/271	75/79	161/181	218/230	102/112	343/343	119/119
8	160/170	142/148	345/361	226/230	252/254	186/198	87/95	227/245	245/247	161/171	158/166	178/192	243/243	261/271	75/75	161/181	196/196	102/108	337/351	115/119
9	160/182	146/150	361/373	226/230	254/256	192/198	87/95	227/243	-/-	149/171	158/170	178/192	-/-	-/-	75/77	161/181	-/-	108/112	343/343	111/115
10	140/170	146/150	345/361	236/242	244/252	186/188	93/99	227/245	235/245	149/171	168/170	178/186	243/245	265/271	-/-	167/167	196/218	112/112	337/343	115/119
11	140/182	146/148	-/-	230/242	244/256	186/188	87/95	227/243	233/247	161/171	158/166	192/192	241/245	265/271	-/-	167/167	218/230	102/112	343/351	111/115
13	160/170	146/148	361/373	226/230	252/254	186/198	93/95	227/245	233/235	149/171	168/170	178/192	243/243	261/271	75/79	161/181	196/230	102/108	337/351	119/119
15	140/170	146/150	373/379	226/230	244/252	188/192	93/99	227/245	245/247	149/171	158/170	192/192	241/243	265/271	77/79	167/181	196/230	102/108	343/351	119/119
16	140/170	146/148	361/373	226/236	244/252	192/198	87/99	227/243	233/235	153/161	158/170	178/186	241/245	265/271	75/75	161/181	196/218	112/112	337/343	119/119
17	140/170	146/150	345/361	236/242	244/252	186/188	93/99	227/245	235/245	149/171	-/-	178/186	243/245	265/271	75/79	167/167	196/218	112/112	337/343	111/119
18	140/170	146/150	361/373	226/236	244/252	186/198	87/99	231/245	233/235	153/161	-/-	192/192	241/245	265/271	75/75	167/167	196/230	108/112	337/351	111/119
19	160/170	142/148	361/373	236/242	252/254	186/198	93/99	227/245	235/245	149/171	-/-	178/186	241/245	261/271	75/79	161/167	196/218	112/112	343/351	115/119
20	140/182	142/150	361/373	236/242	244/256	192/198	87/99	231/243	235/245	149/171	168/170	186/192	243/243	261/265	75/75	161/167	196/196	108/112	337/343	111/115
21	140/170	146/150	373/379	226/236	244/252	188/192	87/99	227/243	235/245	153/161	168/170	192/192	241/245	271/271	75/75	167/167	196/196	108/112	343/351	115/119
22	160/182	146/148	345/361	230/242	254/256	188/192	93/95	227/243	245/247	161/171	158/166	178/192	243/243	261/265	75/79	167/167	196/196	112/112	337/351	111/115
23	160/182	146/148	345/379	226/236	254/256	188/192	87/99	231/243	245/247	149/153	168/170	186/192	243/245	-/-	77/79	167/181	196/196	108/112	337/343	111/115
25	140/182	142/148	373/379	230/242	244/256	192/198	93/99	227/245	233/235	153/161	158/166	186/192	243/243	265/271	77/79	167/181	196/196	102/112	337/351	119/119
26	140/170	142/150	345/379	226/230	244/252	186/188	87/95	231/243	235/245	149/153	168/170	178/186	241/243	261/265	77/79	167/181	196/218	102/108	337/343	115/119
27	160/170	142/148	373/379	230/242	252/254	192/198	93/99	231/243	245/247	149/171	158/170	178/192	243/243	271/271	75/75	161/167	196/196	102/112	337/351	119/119
28	140/182	146/148	373/379	236/242	244/256	188/192	93/95	231/243	235/245	149/153	158/166	178/186	243/245	-/-	75/77	161/181	196/218	112/112	337/343	111/115
29	160/182	146/148	361/373	226/236	254/256	186/188	93/99	227/245	233/235	161/171	166/168	192/192	241/243	265/271	75/79	167/167	218/230	108/112	337/351	-/-
30	140/182	146/150	345/379	236/242	244/256	192/198	93/99	231/245	235/245	161/171	-/-	192/192	243/243	271/271	77/79	167/167	218/230	112/112	337/351	111/115
31	160/170	142/150	373/379	230/242	252/254	186/198	87/99	231/243	235/245	149/171	168/170	192/192	241/243	271/271	77/79	161/181	196/196	102/112	337/351	115/119
32	160/182	146/150	373/379	230/242	254/256	188/192	87/99	231/243	235/245	149/171	158/166	192/192	243/243	261/265	75/77	161/167	196/218	102/112	337/351	111/115
33	160/170	146/150	373/379	226/236	254/256	186/198	93/95	231/243	233/247	149/171	168/170	178/186	241/245	-/-	75/79	161/167	196/218	112/112	337/351	119/119
34	140/182	142/148	345/361	226/230	244/256	186/198	87/99	231/243	235/245	153/161	168/170	178/186	241/243	265/271	75/75	167/167	196/218	102/108	337/343	111/115
35	140/182	146/150	345/379	226/230	244/256	188/192	93/99	-/-	233/247	153/161	158/166	186/192	243/243	261/265	75/77	161/167	196/218	102/108	337/343	111/115
36	160/170	146/148	373/379	236/242	252/254	186/188	93/95	231/245	233/235	153/161	158/170	178/192	243/243	261/265	75/75	167/167	196/196	112/112	343/343	119/119
37	160/170	146/150	345/379	236/242	252/254	186/188	93/95	231/245	235/245	149/153	158/166	178/186	243/243	265/271	75/77	167/167	196/218	108/112	337/343	119/119
38a	160/170	142/148	345/379	226/230	252/254	186/188	93/95	227/245	235/245	149/171	158/170	178/192	-/-	-/-	75/79	167/167	196/230	108/112	337/343	119/119
38b	140/182	146/150	361/373	226/236	244/256	186/198	87/99	231/243	235/245	149/171	-/-	192/192	241/243	261/271	75/75	167/181	196/196	108/112	343/343	111/115
39	160/170	142/150	361/373	226/230	252/254	186/198	87/99	227/245	233/235	153/161	158/166	192/192	241/245	265/271	77/79	161/181	218/230	102/112	343/351	119/119
40	140/170	146/150	345/361	226/236	244/252	186/188	93/99	231/245	245/247	149/171	-/-	192/192	-/-	-/-	75/79	167/181	218/230	108/112	343/343	119/119
41	140/170	146/148	345/379	236/242	244/252	192/198	87/99	231/243	235/245	149/153	-/-	178/192	243/243	271/271	-/-	167/181	196/218	112/112	337/343	115/119
42	160/182	142/150	361/373	226/236	252/256	188/192	93/99	227/245	233/235	153/161	-/-	192/192	243/243	261/265	-/-	167/181	196/230	108/112	343/343	-/-
43	140/170	142/150	345/361	236/242	244/252	186/188	93/99	227/245	245/247	161/171	168/170	178/186	243/245	265/271	-/-	161/181	196/196	112/112	343/351	-/-

269	140/170	146/150	345/379	236/242	244/252	192/198	93/99	231/245	-/-	149/171	158/166	186/192	243/245	265/271	75/79	167/167	196/218	112/112	343/343	-/-
270	160/182	146/148	345/379	236/242	254/256	192/198	87/99	227/243	233/235	153/161	158/170	186/192	243/245	271/271	75/79	-/-	196/196	102/112	343/351	-/-
271	140/170	142/150	373/379	226/230	244/252	188/192	93/99	227/245	233/235	153/161	166/168	178/186	-/-	-/-	75/75	161/167	196/196	102/108	337/351	111/119
272	140/170	146/148	345/361	230/242	244/252	186/198	93/95	227/245	235/245	149/171	158/170	178/186	243/245	265/271	77/79	161/181	196/196	102/108	343/351	119/119
273	160/170	146/150	345/379	226/230	252/254	186/198	87/95	227/243	-/-	149/153	158/170	178/186	-/-	-/-	75/77	-/-	218/230	102/108	337/351	119/119
274	140/170	146/150	361/373	236/242	244/252	192/198	93/99	231/245	-/-	161/171	158/166	178/186	-/-	-/-	75/79	167/167	196/230	112/112	343/343	119/119
276	160/170	142/148	361/373	226/236	252/254	188/192	87/99	227/243	-/-	153/161	166/168	178/186	243/245	261/265	77/79	-/-	196/218	108/112	337/351	119/119
277	160/182	146/148	361/373	226/230	254/256	186/188	93/99	227/243	233/235	161/171	158/170	178/186	-/-	-/-	75/77	161/181	196/230	102/108	343/351	111/115
278	160/170	146/148	345/379	-/-	252/254	186/188	93/95	227/245	233/235	153/161	158/166	186/192	243/245	265/271	-/-	167/181	196/196	108/112	337/351	111/119
281	160/182	146/150	345/379	226/230	254/256	188/192	93/95	227/243	-/-	161/171	158/170	178/192	-/-	-/-	75/79	-/-	196/196	102/112	337/351	111/119
282	140/182	146/148	345/361	230/242	244/256	188/192	93/99	231/245	245/247	149/171	168/170	186/192	243/243	261/265	75/77	167/181	218/230	108/112	343/351	111/119
284	140/170	142/150	345/361	226/236	244/252	186/188	87/99	227/245	233/235	153/161	166/168	178/186	241/245	261/265	77/79	161/167	196/218	108/112	343/351	115/119
285	140/182	146/150	345/379	226/230	244/256	186/198	93/95	227/243	233/235	149/153	158/166	192/192	-/-	-/-	77/79	167/181	218/230	102/108	337/351	111/119
286	160/170	142/150	361/373	226/230	252/254	192/198	87/99	231/243	233/235	149/153	158/170	178/192	241/243	261/265	-/-	161/167	196/230	102/108	343/351	111/119
287	140/182	142/150	373/379	226/236	244/256	186/198	87/95	227/245	-/-	161/171	158/166	178/192	241/245	271/271	-/-	161/167	218/230	108/112	343/343	119/119
288	140/170	142/148	373/379	236/242	244/252	186/198	93/95	231/245	245/247	149/153	168/170	178/192	-/-	265/271	-/-	161/181	196/230	112/112	337/343	119/119
289	160/170	146/150	345/379	226/236	252/254	186/198	87/99	231/245	245/247	161/171	168/170	186/192	-/-	261/271	77/79	167/181	196/230	108/112	337/343	115/119
291	160/182	146/150	345/361	230/242	254/256	192/198	93/99	231/243	-/-	149/171	166/168	186/192	-/-	-/-	75/77	167/181	218/230	102/112	343/343	111/115
292	160/170	142/150	345/361	226/236	252/254	186/188	93/95	227/245	-/-	149/153	168/170	186/192	-/-	-/-	75/79	167/181	196/218	108/112	343/343	119/119
SP	160/170	146/148	361/373	230/242	252/254	186/198	93/99	227/245	-/-	149/153	166/168	-/-	243/243	261/265	75/75	161/181	196/218	102/112	337/351	119/119
93b	140/182	142/148	345/379	226/236	244/256	188/192	93/99	227/245	-/-	149/153	158/170	192/192	-/-	-/-	75/79	-/-	196/196	108/112	343/343	111/119
98	140/170	146/148	345/379	226/230	244/252	188/192	93/95	231/245	245/247	149/171	-/-	186/192	-/-	265/271	75/77	167/167	196/230	102/108	343/351	111/119
115	160/182	146/150	373/379	226/236	254/256	186/198	93/99	227/243	-/-	149/153	-/-	192/192	-/-	261/271	75/75	-/-	196/230	108/112	337/343	111/119
121	140/182	146/150	345/379	226/236	244/256	186/198	93/99	227/243	-/-	153/161	158/166	178/192	-/-	-/-	75/75	167/181	218/230	108/112	337/343	111/115
143	140/182	146/148	361/373	226/230	244/256	188/192	87/95	231/245	-/-	153/161	158/166	178/192	-/-	-/-	75/75	161/167	196/196	102/108	337/351	-/-
99	140/182	146/148	361/373	226/230	244/256	188/192	93/99	231/243	-/-	153/161	158/170	192/192	-/-	-/-	75/77	167/167	196/230	108/112	343/343	-/-
100	140/170	142/148	373/379	236/242	244/252	192/198	93/99	227/243	-/-	161/171	166/168	192/192	243/243	261/271	75/77	-/-	218/230	112/112	343/343	119/119
211	140/170	142/150	345/361	236/242	244/252	192/198	87/95	227/245	233/235	153/161	168/170	178/192	-/-	-/-	75/77	167/181	218/230	108/112	337/343	111/119
198	140/182	142/150	345/361	226/236	244/256	192/198	93/95	231/243	-/-	-/-	168/170	178/192	-/-	-/-	75/75	167/181	-/-	108/112	343/343	111/119

269	-/-	203/219	182/196	361/361	211/237	196/196	343/343	98/110	123/147	148/148	229/229	354/354	250/256	245/249	183/189	375/379	208/300	160/160	283/287	223/255
270	-/-	199/219	180/182	339/361	211/237	192/196	343/351	100/100	137/137	148/150	229/255	342/354	254/256	245/245	183/201	375/383	208/278	160/160	299/299	235/255
271	183/183	199/203	182/196	339/361	233/237	192/196	343/351	100/100	137/137	132/150	223/255	340/342	250/254	245/245	183/201	379/383	208/208	142/160	283/299	235/255
272	177/183	199/219	196/196	361/361	233/237	196/208	351/369	100/100	123/147	148/150	223/229	340/342	254/256	227/245	183/201	375/375	278/300	160/160	287/299	235/255
273	183/183	203/219	180/182	339/361	233/237	192/196	351/369	100/110	-/-	132/150	229/255	340/342	254/256	227/245	189/201	379/383	278/300	142/160	283/287	235/255
274	177/183	203/219	180/196	361/361	233/237	192/208	343/351	100/100	137/147	148/148	223/229	354/354	250/256	227/245	201/201	379/383	208/278	152/160	299/299	223/255
276	183/185	199/199	180/182	333/339	233/237	192/196	343/343	98/100	137/147	148/150	229/255	340/354	250/254	-/-	183/189	375/383	208/208	160/160	299/299	235/255
277	183/183	199/219	180/182	339/361	233/237	192/196	351/369	100/100	137/147	148/150	229/255	340/342	254/254	227/245	189/201	375/379	278/300	142/160	283/287	223/235
278	183/183	199/203	180/196	339/361	211/211	192/196	-/-	98/100	123/147	-/-	-/-	340/354	250/256	227/249	183/201	375/375	-/-	142/152	283/299	223/235
281	183/183	203/219	180/182	339/361	211/233	192/196	351/369	100/100	123/147	-/-	-/-	340/354	250/256	227/249	183/201	375/379	-/-	142/160	283/287	235/255
282	183/185	199/199	180/196	333/339	233/237	192/208	343/351	100/110	123/137	148/150	223/229	342/354	254/254	245/249	189/201	375/383	208/278	152/160	283/287	223/235
284	177/183	199/203	196/196	361/361	233/237	196/196	351/369	98/100	-/-	-/-	-/-	340/354	250/254	245/249	183/189	375/375	278/300	160/160	299/299	223/255
285	183/185	203/219	182/196	333/339	211/211	192/208	343/351	100/100	137/137	132/150	229/229	340/342	250/256	227/249	189/201	375/383	208/300	152/160	287/299	223/255
286	183/185	199/203	180/196	333/339	211/237	192/208	351/369	100/110	123/137	148/150	223/229	340/342	254/256	227/249	201/201	375/379	278/300	152/160	299/299	223/255
287	177/183	199/203	182/196	361/361	211/233	196/196	351/369	100/100	137/147	148/148	223/255	340/354	250/256	245/249	189/201	379/383	208/300	142/152	299/299	223/255
288	177/185	199/199	196/196	333/361	211/233	196/208	343/351	100/110	137/147	132/148	229/229	354/354	254/254	227/245	201/201	375/379	208/278	142/152	287/299	235/255
289	177/185	203/219	182/196	333/361	211/211	196/208	351/369	98/110	123/137	132/148	223/255	340/354	250/254	227/245	201/201	375/375	278/300	152/160	287/299	223/255
291	177/185	203/219	196/196	333/361	211/237	196/208	343/351	98/100	123/137	148/148	229/229	354/354	250/254	227/249	189/201	379/383	208/278	152/160	287/299	235/255
292	183/183	199/203	180/182	339/361	211/233	192/196	343/351	100/100	123/147	148/148	223/255	340/354	254/254	245/249	183/201	379/383	208/300	142/152	287/299	223/255
SP	183/183	199/219	180/182	339/361	211/211	192/196	343/369	100/110	123/137	132/150	223/255	342/354	250/254	245/245	183/189	375/375	278/300	142/152	299/299	235/255
93b	177/183	199/199	182/196	361/361	211/211	196/196	343/351	100/110	137/147	-/-	-/-	342/354	-/-	245/245	183/201	375/375	-/-	142/160	287/299	235/255
98	177/185	199/219	196/196	333/361	211/237	196/208	343/351	98/100	123/137	-/-	-/-	340/342	250/256	-/-	201/201	379/383	208/278	142/160	299/299	223/235
115	183/185	199/199	196/196	333/339	211/233	192/208	343/369	100/110	123/137	132/150	229/255	354/354	254/254	227/245	201/201	375/383	208/300	160/160	299/299	223/223
121	177/183	203/219	182/196	361/361	211/211	196/196	343/369	100/100	123/147	-/-	-/-	340/354	250/256	-/-	189/201	375/375	278/300	160/160	283/287	223/235
143	-/-	199/219	182/196	333/339	211/233	192/196	343/343	100/100	123/137	132/150	229/229	340/342	250/254	245/245	183/201	379/383	208/208	142/152	287/299	235/255
99	-/-	199/219	196/196	361/361	211/211	196/208	343/351	100/100	123/147	148/148	229/229	340/354	254/256	227/245	201/201	375/379	208/278	160/160	283/299	223/235
100	177/185	199/199	180/196	333/361	211/211	192/208	343/343	98/100	137/147	148/148	229/229	354/354	250/254	227/245	189/201	375/383	208/300	152/160	283/287	223/235
211	177/183	199/203	196/196	333/361	211/211	196/208	343/369	98/110	137/147	132/148	223/255	340/354	254/254	227/249	183/189	375/383	208/208	152/160	287/299	235/255
198	177/183	199/203	180/196	361/361	233/237	192/208	343/351	100/100	137/137	148/148	229/229	340/354	254/254	245/249	189/201	375/375	208/278	160/160	283/287	223/235

269	136/138	105/117	200/200	185/187	150/182	161/161	172/172	289/289	108/110	167/182	156/174	120/126	93/101	190/196	224/252	108/114	131/179	155/159	139/167
270	136/136	105/111	200/202	185/187	150/182	159/183	168/172	289/289	102/108	143/182	156/174	120/120	93/101	190/190	244/244	114/122	131/179	155/159	129/139
271	136/136	111/117	196/200	185/189	150/182	161/183	164/168	237/249	-/-	-/-	174/210	120/126	91/93	190/190	244/244	108/122	157/179	155/159	129/139
272	136/136	105/117	200/202	185/187	172/172	159/161	168/172	237/289	108/110	182/182	156/174	116/120	91/101	190/190	224/252	108/114	131/179	155/159	139/167
273	136/136	105/111	200/200	185/189	172/172	159/161	164/168	249/289	108/108	182/182	174/210	120/126	93/101	190/190	244/252	114/122	157/179	155/159	129/139
274	136/138	105/117	200/200	187/189	172/182	159/183	172/172	249/289	108/110	143/167	156/210	120/126	91/101	190/196	244/252	108/114	131/157	155/161	129/167
276	136/136	111/117	200/202	185/187	150/182	161/183	-/-	289/289	108/108	167/182	156/174	120/120	91/93	190/190	244/244	108/122	131/179	155/159	139/167
277	136/150	105/111	200/202	185/189	150/182	159/161	168/172	289/289	102/108	182/182	174/210	116/126	91/101	182/190	244/244	114/122	157/179	159/161	129/139
278	136/150	111/117	200/202	185/187	172/172	161/161	-/-	-/-	108/108	182/182	156/174	116/120	93/101	182/190	224/252	108/122	131/179	159/161	139/167
281	136/136	105/111	200/200	187/189	-/-	159/183	-/-	-/-	102/108	143/167	156/210	116/126	91/93	190/190	224/252	114/122	131/157	155/159	129/167
282	136/150	105/105	200/202	185/185	172/182	159/183	168/172	289/289	102/110	143/182	174/174	120/126	93/101	182/190	224/244	108/114	179/179	159/161	139/139
284	138/150	105/117	200/200	187/189	172/182	159/161	-/-	-/-	108/110	143/182	156/210	116/126	91/101	182/196	244/252	108/114	131/157	161/161	129/167
285	136/138	105/117	200/200	185/189	172/182	161/161	164/168	249/289	102/110	143/167	174/210	120/126	93/93	190/196	244/252	108/114	157/179	161/161	129/139
286	138/150	105/117	196/200	185/189	150/172	159/161	168/172	237/249	108/108	167/182	174/210	116/126	91/93	182/196	224/244	108/114	157/179	161/161	129/139
287	138/150	105/117	196/200	187/189	150/172	161/161	172/172	-/-	102/110	143/182	156/210	120/126	91/93	182/196	244/252	108/114	131/157	161/161	129/167
288	136/138	105/117	196/202	-/-	150/172	159/183	164/172	237/289	108/110	143/167	174/174	120/126	91/93	190/196	244/244	108/114	131/179	155/161	129/139
289	136/138	111/117	200/200	187/189	150/182	159/161	-/-	249/289	108/108	143/167	156/210	116/126	93/101	190/196	224/244	108/122	131/157	155/161	-/-
291	136/136	105/105	200/202	185/185	172/172	159/183	172/172	-/-	102/108	167/182	174/174	120/126	93/101	190/190	224/244	114/114	131/157	159/161	129/139
292	138/150	111/117	196/200	185/187	150/172	161/161	172/172	237/249	108/108	167/182	156/174	120/126	93/101	182/196	224/244	108/122	131/179	161/161	139/167
SP	136/138	111/117	200/202	185/185	172/182	-/-	164/168	289/289	108/108	167/182	-/-	116/120	93/93	182/196	224/244	108/122	157/179	155/161	139/139
93b	136/138	105/105	196/202	187/189	172/182	-/-	172/172	237/289	102/110	167/182	156/210	120/126	93/101	190/190	-/-	114/114	131/157	155/159	129/167
98	136/150	105/117	200/202	187/189	150/172	159/183	168/172	-/-	108/110	182/182	156/210	120/126	93/101	182/190	224/244	108/114	131/157	155/159	129/167
115	136/138	105/111	200/200	187/189	172/182	161/161	164/168	249/289	102/108	167/182	156/210	120/120	93/93	-/-	224/252	114/122	131/157	155/159	129/167
121	138/150	105/105	200/200	-/-	172/182	159/161	164/172	249/289	102/110	167/182	156/210	116/120	93/101	182/196	224/252	114/114	131/157	155/161	129/167
143	136/138	-/-	200/202	-/-	150/172	161/183	164/172	289/289	102/110	143/182	174/174	120/126	93/93	190/190	224/244	114/114	179/179	155/159	139/139
99	136/150	105/105	200/200	-/-	172/172	159/183	172/172	249/289	102/110	143/182	174/210	116/126	91/93	182/190	244/252	114/114	157/179	159/161	129/139
100	136/150	105/117	196/202	-/-	-/-	161/161	172/172	237/289	108/110	167/182	174/174	120/120	93/93	182/190	244/244	108/114	131/179	159/161	129/139
211	136/136	111/117	200/200	-/-	150/172	161/183	164/172	249/289	108/110	143/167	174/174	116/120	91/93	190/190	244/244	108/122	131/179	155/159	129/139
198	136/150	105/105	200/200	187/189	150/172	159/183	172/172	249/289	102/110	143/167	156/210	120/126	91/93	182/190	244/244	114/114	131/157	159/161	129/139

269	131/139	133/167	390/392	97/97	164/170	163/163	142/146	314/314	146/190	275/277	194/194	95/117	362/374	269/279	125/147	229/231	293/305	109/117	192/204	111/115
270	139/149	133/157	392/392	91/95	164/170	159/187	146/158	300/314	-/-	275/277	192/216	-/-	362/374	277/279	125/147	227/229	289/293	117/121	192/204	-/-
271	149/149	133/157	392/400	91/95	170/170	163/163	146/158	300/310	-/-	273/275	194/216	-/-	372/374	269/279	125/147	229/231	289/293	109/117	192/210	93/111
272	149/149	133/157	390/392	97/97	154/164	163/163	146/158	314/314	190/190	275/277	192/194	95/117	372/372	269/279	125/149	227/229	293/305	117/121	192/210	93/111
273	149/149	167/167	390/400	95/97	164/170	159/187	142/146	310/314	146/154	273/275	192/194	109/117	372/372	269/277	125/147	227/229	289/293	109/117	192/210	93/111
274	131/139	157/167	390/392	95/97	154/170	159/163	146/158	314/314	154/190	273/277	192/216	109/117	362/374	277/279	125/149	227/229	293/305	117/121	192/210	93/111
276	131/149	133/167	392/392	91/95	154/170	159/187	158/158	300/314	146/154	275/277	194/216	109/109	372/372	277/279	125/147	229/231	289/293	117/121	192/204	93/111
277	149/149	167/167	390/400	95/97	154/170	159/187	146/158	310/314	154/190	273/275	192/194	109/109	372/372	277/279	125/147	227/229	289/293	109/117	192/210	93/111
278	149/149	133/157	392/392	97/97	164/170	159/163	158/158	-/-	146/154	275/277	194/194	95/117	-/-	269/277	125/147	229/231	289/293	117/121	192/204	93/111
281	139/149	133/157	390/400	97/97	164/170	159/187	146/158	-/-	-/-	273/277	192/216	-/-	372/374	277/279	125/149	227/229	293/305	109/117	192/210	-/-
282	139/149	167/167	390/400	91/97	154/164	159/163	142/146	310/314	190/190	275/275	192/216	109/117	-/-	277/279	125/149	227/229	293/305	117/121	192/204	93/111
284	131/149	133/167	392/392	95/97	154/170	163/163	158/158	300/314	146/154	273/277	192/194	109/117	372/374	269/279	125/149	227/229	293/305	117/121	192/204	111/115
285	149/149	167/167	390/392	95/97	154/164	163/163	146/158	314/314	146/154	273/275	194/194	109/117	-/-	269/279	125/149	229/231	293/305	117/121	192/204	93/111
286	149/149	157/167	390/400	91/97	154/170	159/163	142/146	310/314	146/154	273/275	192/194	95/109	372/374	279/279	125/147	227/229	289/293	109/117	192/204	93/111
287	131/149	167/167	392/392	95/97	154/170	163/163	146/158	300/314	154/190	273/277	194/194	109/117	372/374	279/279	125/147	229/231	289/293	109/117	192/210	111/115
288	131/139	157/167	390/392	95/97	154/170	163/163	142/146	314/314	-/-	275/275	192/216	-/-	372/372	277/279	125/147	227/229	289/293	109/117	192/210	93/111
289	131/149	133/157	392/392	91/97	164/170	163/163	142/158	314/314	154/190	273/277	192/194	95/109	-/-	269/279	125/149	227/229	293/305	117/121	192/204	-/-
291	139/149	133/167	390/392	91/97	154/164	163/163	158/158	314/314	190/190	275/275	192/216	95/117	-/-	269/277	125/149	227/229	293/305	109/117	192/204	93/111
292	131/149	133/157	390/392	91/97	154/164	159/187	158/158	314/314	146/190	275/277	194/194	95/117	-/-	269/279	125/147	229/231	289/293	109/117	192/204	93/111
SP	139/149	133/167	390/392	97/97	154/170	159/187	142/146	300/314	146/190	275/275	192/194	95/109	372/372	277/279	125/147	227/229	289/293	117/121	192/210	111/115
93b	131/149	133/157	390/392	95/97	164/170	163/163	142/146	-/-	146/190	273/277	192/216	109/117	362/374	269/279	125/147	227/229	289/293	117/121	192/210	-/-
98	149/149	157/167	392/400	91/97	164/170	163/163	158/158	-/-	-/-	273/277	192/216	-/-	362/374	-/-	125/147	-/-	289/293	117/121	192/204	93/111
115	131/139	157/167	390/392	91/97	170/170	163/163	142/146	300/314	146/190	273/277	194/194	95/117	-/-	269/277	125/149	227/229	293/305	117/121	192/204	111/115
121	131/149	167/167	390/400	97/97	170/170	163/163	142/158	310/314	146/190	273/277	192/194	95/117	-/-	279/279	125/149	227/229	293/305	117/121	192/204	93/111
143	149/149	133/157	392/400	91/97	154/170	163/163	158/158	300/314	154/190	275/275	194/216	95/109	372/374	279/279	125/147	229/231	289/293	109/117	192/210	-/-
99	131/149	157/167	392/400	97/97	154/170	163/163	146/158	300/310	146/154	273/275	192/216	109/117	362/374	279/279	125/147	227/229	289/293	109/117	192/204	93/111
100	131/139	133/167	392/400	95/97	170/170	159/163	158/158	300/310	154/190	275/275	194/194	109/109	362/372	279/279	125/147	229/231	293/305	117/121	192/204	93/111
211	131/149	133/167	390/400	95/97	154/164	163/163	142/158	310/314	146/154	275/275	194/216	109/109	-/-	269/277	125/149	229/231	289/293	117/121	192/204	93/111
198	131/149	167/167	392/400	91/95	154/164	159/163	146/158	310/314	146/154	273/277	192/216	109/109	-/-	277/279	125/149	227/229	293/305	117/121	192/210	93/111

Tabela 2. Continuação

Isolado	VVIN73	VVIN83	VVIH01	VVC4C6	VVIM43	VVC2H9	VVS1	VVCNG4B9	VVCNG2H1	UDV050	VVC9H4.2	UDV033	VVIR21	VVC5A1	VVMD24	UDV032	VRZAG64	VVIM10	UDV047
733-34	252/262	231/235	239/243	154/163	81/85	112/118	183/189	148/190	222/240	163/165	271/271	144/144	163/163	166/166	208/208	166/166	137/137	363/365	117/121
1103-88	254/254	233/233	235/235	160/160	77/77	116/116	177/177	156/156	210/210	161/161	298/310	146/160	169/177	160/162	204/212	138/164	133/153	363/363	117/117
1	252/254	233/235	235/239	160/163	77/81	-/-	177/189	148/156	210/240	161/165	271/298	144/160	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	363/365	117/121
2	252/254	233/235	235/239	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/163	271/310	144/160	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	363/365	117/121
3	254/262	231/233	235/239	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/222	161/165	271/298	144/160	-/-	160/166	204/208	138/166	137/153	363/363	117/117
5	252/254	231/233	235/243	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/163	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/363	117/121
6	252/254	233/235	235/239	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	161/165	271/298	144/160	-/-	160/166	204/208	164/166	133/137	363/365	117/121
7	252/254	233/235	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/163	271/310	144/146	163/177	160/166	208/212	138/166	133/137	363/365	117/117
8	254/262	233/235	235/243	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/165	271/298	144/146	163/177	162/166	208/212	138/166	133/137	363/365	117/117
9	254/262	233/235	235/243	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	161/165	271/310	144/146	163/177	160/166	204/208	138/166	133/137	363/365	-/-
10	254/262	231/233	235/239	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/163	271/310	144/160	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	363/363	117/121
11	254/262	231/233	235/239	154/160	77/81	116/118	177/183	-/-	210/222	161/163	271/298	144/146	163/177	162/166	208/212	138/166	133/137	363/363	117/117
13	252/254	233/235	235/243	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/165	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/365	117/121
15	254/262	233/235	235/243	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	161/165	271/298	144/146	163/169	162/166	208/212	164/166	137/153	363/365	117/117
16	252/254	233/235	235/243	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	161/163	271/298	144/160	163/177	160/166	204/208	138/166	133/137	363/365	117/117
17	254/262	231/233	235/239	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/163	271/310	144/160	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	363/363	117/121
18	-/-	233/235	235/239	160/163	77/85	116/118	177/83	156/190	210/222	161/165	271/310	144/160	163/169	162/166	204/208	138/166	137/153	363/365	117/117
19	254/262	231/233	235/239	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	-/-	161/163	271/298	144/160	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	363/363	117/117
20	252/254	231/233	235/243	160/163	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	161/165	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	138/166	137/153	363/363	117/117
21	254/262	233/235	235/243	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	161/163	271/310	144/160	163/177	160/166	204/208	138/166	133/137	363/365	117/117
22	252/254	231/233	235/243	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/222	161/163	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/363	117/121
23	254/262	231/233	235/239	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	161/165	271/298	144/160	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/121
25	252/254	233/235	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/163	271/298	144/146	163/177	160/166	208/212	164/166	133/137	363/365	117/117
26	254/262	231/233	235/243	160/163	77/85	116/118	177/189	156/190	210/222	161/163	271/298	144/146	163/177	162/166	208/212	164/166	133/137	363/363	117/117
27	254/262	233/235	235/243	160/163	77/81	-/-	177/189	148/156	210/222	-/-	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/365	117/121
28	252/254	231/233	235/239	160/163	77/81	112/116	177/183	148/156	210/222	161/163	271/298	144/160	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	363/365	117/117
29	254/262	233/235	235/239	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	161/163	271/310	144/160	163/177	162/166	204/208	164/166	133/137	363/365	117/117
30	254/262	231/233	235/243	160/163	77/81	116/118	177/183	148/156	210/240	161/165	271/310	144/160	163/169	162/166	204/208	164/166	137/153	363/363	117/121
31	254/262	233/235	-/-	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/163	271/310	144/146	163/169	160/166	208/212	138/166	137/153	363/365	117/117
32	254/262	233/235	235/239	160/163	77/81	112/116	177/183	148/156	210/222	161/165	271/310	144/146	163/169	160/166	208/212	138/166	137/153	363/365	117/117
33	254/262	233/235	235/239	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/163	271/310	144/160	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	363/365	117/117
34	254/262	231/233	235/239	160/163	77/85	116/118	177/189	156/190	210/222	161/165	271/298	144/146	163/177	160/166	208/212	138/166	133/137	363/363	117/117
35	254/262	231/233	235/243	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/165	271/310	144/146	163/177	162/166	208/212	164/166	133/137	363/363	117/117
36	252/254	233/235	235/243	160/163	77/85	112/116	177/189	156/190	210/222	161/163	271/298	144/146	163/169	162/166	208/212	164/166	137/153	363/365	117/117
37	254/262	231/233	235/239	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	161/165	271/310	144/160	163/177	160/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/117
38a	252/254	231/233	235/243	160/163	77/85	116/118	177/189	156/190	210/222	161/165	271/310	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/363	117/117
38b	254/262	233/235	235/243	160/163	77/81	112/116	177/183	148/156	-/-	-/-	271/310	144/160	163/169	162/166	204/208	138/166	137/153	363/365	117/121
39	254/262	233/235	235/243	154/160	77/81	116/118	177/189	148/156	210/240	161/163	271/310	144/146	163/169	162/166	208/212	138/166	137/153	363/365	117/121
40	252/254	231/233	235/239	160/163	77/81	112/116	177/183	148/156	210/222	161/165	271/310	144/160	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	363/363	117/117
41	254/262	231/233	235/243	154/160	77/81	112/116	-/-	148/156	210/240	161/163	271/298	144/160	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/117
42	254/262	233/235	235/239	154/160	77/81	116/118	177/189	148/156	210/222	161/165	271/298	144/146	163/169	162/166	208/212	164/166	137/153	363/365	117/121
43	-/-	231/233	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/165	271/310	144/160	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/121

44	252/254	233/235	235/239	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	161/163	271/310	144/160	163/169	162/166	204/208	164/166	137/153	363/365	117/117
45	254/262	231/233	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/165	271/298	144/160	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/121
46	254/262	231/233	235/243	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/163	271/310	144/160	163/169	162/166	204/208	164/166	137/153	363/363	117/121
47	252/254	231/233	235/239	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	161/163	271/298	144/146	163/177	162/166	208/212	164/166	133/137	363/363	117/121
48	254/262	231/233	235/239	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/165	271/310	144/160	163/169	160/166	204/208	138/166	137/153	363/363	-/-
49	252/254	231/233	235/239	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/222	161/163	271/298	144/160	163/169	162/166	204/208	138/166	137/153	363/363	117/121
50	252/254	-/-	235/239	154/160	77/81	112/116	-/-	156/190	210/222	-/-	-/-	144/160	163/177	160/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/117
51	254/262	231/233	235/239	154/160	77/81	116/118	177/183	148/156	210/222	161/165	271/298	144/160	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/121
52	252/254	231/233	235/243	-/-	77/81	116/118	177/189	148/156	210/240	161/163	271/298	144/160	163/169	160/166	204/208	-/-	137/153	363/363	117/121
53	252/254	233/235	235/243	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	161/163	271/310	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	-/-	117/117
54	-/-	231/233	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/165	271/310	144/160	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	363/363	117/117
55	-/-	233/235	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/163	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/363	117/117
56	-/-	233/235	235/243	160/163	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	161/165	271/298	144/146	163/177	162/166	208/212	164/166	133/137	363/363	117/121
57	252/254	233/235	235/239	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/165	271/310	144/146	163/177	162/166	208/212	164/166	133/137	363/365	117/117
58	252/254	233/235	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/163	271/310	144/146	163/177	160/166	208/212	164/166	133/137	363/365	117/121
59	254/262	231/233	235/239	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	161/163	271/310	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/365	117/121
60	254/262	231/233	235/239	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/163	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/363	117/117
61	254/262	233/235	235/243	160/163	77/85	112/116	177/189	156/190	-/-	161/165	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/365	117/121
62	254/262	-/-	235/239	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/222	-/-	-/-	144/160	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	363/365	117/117
63	-/-	-/-	235/239	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	-/-	161/163	-/-	144/146	163/177	162/166	208/212	164/166	133/137	363/363	117/117
64	254/262	233/235	235/243	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	-/-	271/298	144/146	163/177	162/166	208/212	138/166	133/137	363/365	117/117
65	254/262	233/235	235/243	160/163	77/85	116/118	177/189	156/190	-/-	161/165	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/365	117/121
66	252/254	233/235	235/239	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	161/163	271/298	144/160	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	-/-	117/117
67	254/262	231/233	235/239	160/163	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	161/165	271/310	144/160	163/169	162/166	204/208	164/166	137/153	363/365	117/117
70	252/254	231/233	235/243	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	161/165	271/310	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/363	117/117
71	252/254	233/235	235/239	160/163	77/81	116/118	177/189	148/156	210/240	161/163	271/310	144/146	163/169	162/166	208/212	164/166	137/153	363/365	117/121
72	252/254	231/233	235/243	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/165	271/310	144/160	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/121
73	254/262	231/233	235/243	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	161/165	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	138/166	137/153	363/363	117/117
74	252/254	233/235	235/239	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/165	271/298	144/160	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	363/363	117/117
75	254/262	233/235	235/239	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/165	271/310	144/146	163/177	160/166	208/212	138/166	133/137	363/365	117/121
76	254/262	-/-	235/243	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	-/-	-/-	-/-	144/146	163/169	160/166	208/212	138/166	137/153	363/365	117/121
77	252/254	233/235	235/243	160/163	77/81	116/118	177/189	148/156	210/222	161/163	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	138/166	137/153	363/365	-/-
78	-/-	233/235	235/243	160/163	77/81	116/118	177/183	148/156	210/222	-/-	271/298	144/160	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	363/365	117/117
79	-/-	231/233	235/239	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/165	271/310	144/160	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/121
80	-/-	231/233	235/243	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	161/165	271/310	144/146	163/177	162/166	208/212	138/166	133/137	363/363	117/121
82	254/262	231/233	235/239	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	161/165	271/298	144/146	163/177	160/166	208/212	138/166	133/137	363/363	117/117
84	254/262	231/233	235/243	160/163	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	161/163	271/298	144/160	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	363/363	117/117
85a	254/262	233/235	235/243	160/163	77/81	112/116	177/183	148/156	210/222	161/165	271/310	144/160	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	363/365	117/121
85b	-/-	231/233	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/163	271/310	144/146	163/169	162/166	208/212	138/166	137/153	363/363	117/121
86	254/262	231/233	235/243	160/163	77/81	116/118	177/189	148/156	210/222	161/165	271/310	144/146	163/177	162/166	208/212	138/166	133/137	363/363	117/117
87	252/254	231/233	235/243	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/222	161/163	271/310	144/160	163/169	160/166	204/208	138/166	137/153	363/363	117/121
88	254/262	233/235	235/239	154/160	77/85	112/116	177/189	156/190	210/240	161/163	271/310	144/146	163/177	160/166	208/212	164/166	133/137	363/365	117/117
89	252/254	-/-	235/239	154/160	77/81	-/-	177/189	148/156	210/240	-/-	-/-	144/146	163/177	162/166	208/212	164/166	133/137	363/363	117/117
90	-/-	231/233	-/-	160/163	77/85	116/118	177/189	156/190	-/-	161/165	271/310	144/160	163/177	162/166	204/208	164/166	133/137	363/363	117/117
92b	-/-	231/233	235/239	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/165	271/298	144/146	163/177	160/166	208/212	164/166	133/137	363/363	-/-
93a	254/262	231/233	235/243	154/160	77/85	112/116	177/183	156/190	-/-	161/163	271/298	144/160	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	-/-	117/117
94	-/-	233/235	235/239	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/163	271/310	144/160	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	363/365	117/117

95	254/262	233/235	235/239	154/160	77/85	112/116	177/183	156/190	-/-	161/165	271/298	144/146	163/177	160/166	208/212	138/166	133/137	363/363	117/117
96	252/254	233/235	235/239	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/163	271/310	144/146	163/177	160/166	208/212	164/166	133/137	363/365	117/117
97	252/254	233/235	235/239	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	161/163	271/298	144/160	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/117
101	254/262	231/233	235/239	154/160	77/85	112/116	-/-	148/156	210/240	161/165	-/-	-/-	163/169	162/166	204/208	138/166	137/153	363/363	117/117
103	254/262	233/235	235/239	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/165	271/298	144/160	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	363/365	117/117
104	254/262	231/233	235/239	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/163	-/-	144/160	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	363/363	117/117
105	254/262	231/233	235/239	154/160	77/81	-/-	177/189	148/156	210/240	161/163	-/-	144/160	163/169	162/166	204/208	138/166	137/153	363/363	117/117
106	252/254	233/235	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/165	-/-	144/146	163/177	162/166	208/212	164/166	133/137	363/365	117/117
107	252/254	231/233	235/243	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	161/163	271/298	144/160	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/117
108	252/254	-/-	235/243	160/163	77/81	112/116	-/-	148/156	210/222	161/165	-/-	144/160	163/177	162/166	204/208	164/166	133/137	363/363	117/117
109	254/262	-/-	235/239	160/163	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	161/165	271/298	144/146	163/177	160/166	208/212	164/166	133/137	363/365	117/117
110	254/262	233/235	235/239	154/160	77/81	116/118	177/183	148/156	210/240	161/165	-/-	144/160	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	363/365	117/121
111	252/254	-/-	235/243	160/163	77/85	116/118	177/183	-/-	210/240	161/165	271/298	144/146	163/177	162/166	208/212	138/166	133/137	-/-	117/121
112	252/254	231/233	235/243	154/160	77/81	-/-	-/-	148/156	210/222	161/163	-/-	-/-	163/177	160/166	208/212	164/166	133/137	363/363	117/121
113	252/254	233/235	235/243	154/160	77/85	-/-	-/-	156/190	210/222	161/163	271/298	144/160	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	363/365	117/117
114	252/254	233/235	235/239	160/163	77/81	112/116	-/-	148/156	210/222	161/163	-/-	144/146	163/177	160/166	208/212	138/166	133/137	363/365	117/117
116	254/262	233/235	235/243	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/163	271/310	144/160	163/169	160/166	204/208	138/166	137/153	363/363	117/117
117	252/254	231/233	235/243	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	161/163	-/-	144/160	163/169	162/166	204/208	164/166	137/153	363/363	117/121
118	252/254	231/233	235/243	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	161/163	271/310	144/146	163/169	162/166	208/212	164/166	137/153	-/-	117/117
119	252/254	233/235	235/239	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/165	271/298	144/160	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	363/365	117/121
120	254/262	233/235	235/243	160/163	77/85	112/116	177/189	156/190	210/222	161/165	-/-	144/160	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	363/365	117/121
123	252/254	231/233	235/243	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/165	271/298	144/160	163/177	162/166	204/208	164/166	133/137	363/363	117/117
124	252/254	231/233	235/243	160/163	77/85	116/118	177/189	156/190	210/222	161/165	-/-	144/160	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	363/363	117/121
126	252/254	233/235	235/239	160/163	77/81	112/116	-/-	148/156	210/222	161/163	-/-	-/-	163/169	160/166	204/208	138/166	137/153	363/365	117/121
127	252/254	233/235	235/239	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	161/165	271/310	144/160	163/169	162/166	208/212	164/166	137/153	363/365	117/117
128	252/254	231/233	235/243	160/163	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	161/165	271/298	144/146	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	363/363	117/121
129	254/262	233/235	235/239	154/160	77/81	112/116	-/-	148/156	210/222	161/163	-/-	-/-	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	363/365	117/121
130	254/262	231/233	235/243	160/163	77/85	112/116	-/-	156/190	210/222	161/163	271/298	144/160	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/121
131	254/262	231/233	235/243	154/160	-/-	-/-	177/189	156/190	210/240	161/165	271/298	144/146	163/177	160/166	208/212	138/166	133/137	363/363	117/117
132	254/262	231/233	235/239	160/163	77/85	112/116	177/189	156/190	210/222	161/165	-/-	144/146	163/169	160/166	208/212	138/166	137/153	363/363	117/117
133	254/262	233/235	235/239	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/165	271/298	144/160	163/169	162/166	204/208	164/166	137/153	363/365	117/121
134	254/262	233/235	235/239	154/160	77/85	112/116	177/183	156/190	210/240	161/165	271/310	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/365	117/121
135	254/262	231/233	235/239	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/222	161/163	271/298	144/146	163/169	162/166	208/212	164/166	137/153	363/363	117/121
136	254/262	233/235	235/243	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	-/-	-/-	144/146	-/-	162/166	208/212	138/166	133/137	363/365	117/117
137	252/254	-/-	235/239	160/163	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	-/-	-/-	144/146	163/177	-/-	208/212	164/166	133/137	363/363	117/121
138	254/262	-/-	235/239	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	161/165	-/-	-/-	163/177	162/166	208/212	138/166	133/137	363/365	117/117
139	252/254	233/235	235/243	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/165	271/310	144/160	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	363/365	117/121
140a	254/262	231/233	235/243	160/163	77/85	-/-	177/183	156/190	210/222	161/163	271/298	144/146	163/169	162/166	204/208	138/166	137/153	363/363	117/117
140b	254/262	231/233	235/243	154/160	77/85	-/-	177/189	156/190	210/222	161/165	271/298	-/-	163/169	160/166	208/212	138/166	137/153	363/363	117/121
141	254/262	-/-	235/243	154/160	77/81	-/-	177/189	148/156	210/222	161/163	271/298	-/-	163/177	162/166	208/212	164/166	133/137	363/363	117/121
142	254/262	231/233	235/243	154/160	77/81	116/118	177/183	148/156	210/222	161/165	271/298	144/160	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	363/363	117/121
144	254/262	233/235	235/243	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	161/165	271/298	144/160	163/169	162/166	204/208	138/166	137/153	363/365	117/121
145	254/262	231/233	235/243	160/163	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	161/163	271/310	144/160	163/169	162/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/117
146	254/262	231/233	235/243	160/163	77/85	112/116	177/189	156/190	210/240	161/165	271/298	144/160	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	363/363	117/121
147	254/262	233/235	235/243	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	161/165	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	138/166	137/153	363/365	117/117
148	-/-	231/233	235/243	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	-/-	161/165	271/310	144/160	163/177	162/166	204/208	-/-	133/137	363/363	117/121
149	254/262	231/233	235/243	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/165	271/310	144/160	163/169	162/166	204/208	138/166	137/153	363/363	117/117

150	254/262	233/235	235/239	160/163	77/81	116/118	177/189	156/190	210/240	161/165	271/298	-/-	163/177	160/166	208/212	138/166	133/137	363/365	117/121
151	254/262	-/-	235/243	160/163	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	161/163	-/-	144/160	163/177	162/166	208/212	164/166	133/137	363/363	117/117
152	254/262	231/233	235/239	160/163	77/85	112/116	177/183	156/190	210/240	161/165	298/310	144/146	163/177	160/166	208/212	164/166	133/137	363/363	117/117
153	254/262	233/235	235/243	160/163	77/81	-/-	177/183	148/156	210/222	161/163	-/-	144/160	163/169	162/166	208/212	138/166	137/153	363/365	117/117
154	252/254	231/233	235/239	160/163	77/85	-/-	177/189	156/190	210/222	161/165	271/298	144/146	163/169	162/166	208/212	138/166	137/153	363/363	117/121
155	252/254	231/233	235/239	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/165	-/-	144/160	163/169	160/166	204/208	138/166	137/153	363/363	117/117
156	254/262	233/235	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/165	-/-	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/365	117/121
157	254/262	231/233	235/243	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/165	-/-	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	-/-	117/117
160	254/262	233/235	235/239	160/163	77/85	112/116	177/183	156/190	210/240	161/165	-/-	144/146	163/169	162/166	208/212	138/166	137/153	363/365	117/121
163	252/254	231/233	235/239	154/160	77/85	112/116	177/189	156/190	210/240	161/163	271/310	144/146	163/177	160/166	208/212	164/166	133/137	363/363	117/117
164	254/262	233/235	235/239	154/160	77/85	112/116	177/183	156/190	210/240	161/165	271/310	144/160	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	363/365	117/117
165	254/262	233/235	-/-	154/160	77/81	116/118	177/189	148/156	210/240	161/165	271/298	144/160	163/169	162/166	204/208	164/166	137/153	363/365	117/121
166	254/262	233/235	235/243	160/163	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	161/163	-/-	-/-	163/177	160/166	208/212	164/166	133/137	363/365	117/117
168	254/262	233/235	235/243	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	161/163	-/-	-/-	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/365	117/117
169	254/262	233/235	235/239	160/163	77/85	-/-	-/-	156/190	210/222	161/163	271/298	144/160	163/169	160/166	204/208	138/166	137/153	363/365	117/117
170	254/262	233/235	235/243	154/160	77/81	112/116	-/-	148/156	210/222	161/163	271/298	144/146	163/177	160/166	208/212	164/166	133/137	363/365	117/117
171	252/254	231/233	235/243	160/163	77/85	116/118	-/-	156/190	210/222	161/165	271/298	144/160	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	363/363	117/121
172	254/262	231/233	235/239	160/163	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	161/163	-/-	-/-	163/177	162/166	208/212	164/166	133/137	363/363	117/117
173	252/254	231/233	235/239	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	161/165	-/-	144/146	163/177	160/166	208/212	164/166	133/137	363/363	117/117
174	252/254	233/235	235/239	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/163	-/-	144/160	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	363/363	117/117
175	252/254	231/233	235/243	160/163	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	161/163	271/298	144/160	163/169	162/166	204/208	138/166	137/153	363/363	117/117
176	254/262	233/235	235/239	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	161/163	-/-	144/146	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	363/365	117/121
177	252/254	231/233	235/239	160/163	77/81	116/118	177/189	148/156	210/222	161/165	-/-	144/146	163/169	160/166	204/208	138/166	-/-	363/363	117/121
178	252/254	231/233	235/239	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	161/163	-/-	144/160	163/177	160/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/117
179	254/262	233/235	235/243	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/165	271/298	-/-	163/169	162/166	204/208	138/166	137/153	363/365	117/117
180	254/262	233/235	235/243	154/160	77/81	116/118	177/183	148/156	210/240	161/165	-/-	144/160	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	363/365	117/121
181	254/262	233/235	235/243	160/163	77/81	112/116	-/-	148/156	210/240	161/163	-/-	144/146	163/177	-/-	204/208	164/166	133/137	363/365	117/117
182a	252/254	233/235	235/243	160/163	77/81	-/-	177/183	148/156	210/240	161/165	271/298	-/-	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	363/365	117/121
182b	254/262	231/233	235/243	154/160	77/85	116/118	-/-	156/190	210/240	161/165	271/298	144/146	163/169	162/166	208/212	138/166	137/153	-/-	117/117
184	254/262	233/235	235/239	154/160	77/81	112/116	-/-	148/156	210/222	161/163	271/298	-/-	163/177	162/166	208/212	138/166	133/137	363/365	117/117
185	254/262	231/233	235/239	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/222	161/165	-/-	144/160	163/169	162/166	204/208	164/166	137/153	363/363	117/117
186	252/254	231/233	235/243	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/165	-/-	144/160	163/177	162/166	204/208	164/166	133/137	363/365	117/117
187	252/254	233/235	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/165	271/298	144/146	163/177	160/166	208/212	164/166	133/137	363/365	117/121
188	254/262	233/235	235/243	160/163	77/81	112/116	177/183	148/156	210/222	161/165	-/-	144/160	163/169	162/166	204/208	138/166	137/153	363/365	117/121
189	252/254	231/233	235/243	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/222	161/165	271/298	144/160	163/169	160/166	204/208	138/166	137/153	363/363	117/121
191	252/254	233/235	235/243	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	161/163	-/-	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/365	117/121
192	254/262	231/233	235/239	154/160	77/81	116/118	177/189	148/156	210/222	161/163	271/310	144/160	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	363/363	117/121
193	254/262	233/235	235/243	160/163	77/85	-/-	177/189	156/190	210/240	161/165	271/298	-/-	163/177	160/166	208/212	138/166	133/137	363/365	117/117
201	252/254	231/233	235/243	160/163	77/81	112/116	-/-	148/156	210/222	161/165	271/298	-/-	163/177	162/166	208/212	138/166	133/137	363/363	117/117
202	254/262	233/235	235/243	154/160	77/85	-/-	-/-	156/190	210/240	161/165	-/-	144/160	163/169	162/166	204/208	164/166	137/153	363/365	117/121
204	252/254	233/235	235/239	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/163	271/298	144/146	163/169	162/166	208/212	138/166	137/153	363/365	117/121
206	252/254	231/233	235/243	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	161/165	-/-	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	-/-	117/121
208	254/262	231/233	235/239	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/165	271/310	144/160	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/121
210	254/262	233/235	235/243	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/163	271/310	144/160	163/169	162/166	204/208	164/166	137/153	363/365	117/117
212	252/254	231/233	235/239	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/222	-/-	271/298	144/160	163/177	162/166	204/208	-/-	133/137	363/365	117/121
213	252/254	233/235	235/243	160/163	77/81	112/116	177/183	148/156	210/222	161/163	271/310	144/160	163/169	160/166	204/208	138/166	137/153	363/365	117/117
214	252/254	231/233	235/239	160/163	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	161/163	271/310	144/146	163/177	160/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/121

215	254/262	231/233	235/243	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/163	271/298	144/160	163/169	160/166	204/208	138/166	137/153	363/363	117/121
216	254/262	233/235	235/239	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	161/163	271/310	144/146	163/177	160/166	-/-	164/166	133/137	-/-	117/117
218	254/262	233/235	235/239	160/163	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	161/163	271/298	144/146	163/177	160/166	208/212	164/166	133/137	-/-	117/121
219	252/254	233/235	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/163	271/298	144/146	163/169	162/166	208/212	138/166	137/153	-/-	-/-
220	254/262	231/233	235/239	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/165	271/310	144/146	163/169	162/166	208/212	164/166	137/153	363/363	117/117
221	252/254	231/233	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	-/-	271/298	144/146	163/177	160/166	208/212	-/-	133/137	363/363	117/121
222	252/254	231/233	235/239	154/160	77/85	112/116	177/183	148/156	210/222	161/165	271/298	144/146	163/177	162/166	208/212	164/166	133/137	-/-	-/-
224	252/254	233/235	235/239	154/160	77/85	-/-	177/189	156/190	210/222	161/163	271/298	-/-	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/363	117/117
225	252/254	231/233	235/243	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/165	271/298	-/-	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	363/365	117/117
226	252/254	231/233	235/243	160/163	77/85	112/116	177/183	156/190	210/222	161/163	271/310	144/146	163/169	160/166	208/212	138/166	137/153	363/365	117/117
227	252/254	233/235	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/165	271/298	144/160	163/169	160/166	204/208	138/166	137/153	363/363	117/121
228	254/262	231/233	235/243	160/163	77/81	116/118	177/189	148/156	210/240	161/165	271/310	144/160	163/177	160/166	-/-	138/166	133/137	363/363	117/117
229	254/262	231/233	235/243	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/165	271/298	144/160	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	-/-	117/121
230	254/262	233/235	235/243	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	-/-	271/298	144/146	163/169	162/166	208/212	164/166	137/153	363/363	117/121
231	254/262	231/233	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	-/-	271/298	144/146	163/177	160/166	-/-	138/166	133/137	-/-	117/121
232	254/262	231/233	235/239	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/165	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/363	117/121
233	252/254	231/233	235/239	160/163	77/81	-/-	177/183	148/156	210/240	161/165	271/298	144/160	163/169	162/166	204/208	138/166	137/153	-/-	117/117
234	254/262	231/233	235/243	154/160	77/81	-/-	177/183	148/156	210/222	161/163	271/298	-/-	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/121
235	254/262	231/233	235/243	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/222	161/163	271/298	144/160	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	-/-	117/117
236	252/254	233/235	235/239	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/163	271/310	144/146	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	-/-	117/117
237	254/262	231/233	235/239	160/163	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	161/163	271/310	-/-	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/117
239	252/254	231/233	235/243	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	161/165	271/310	144/146	163/169	162/166	208/212	138/166	137/153	363/363	117/117
240	254/262	233/235	235/239	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/222	161/165	271/310	144/146	163/177	160/166	208/212	164/166	133/137	363/365	117/117
242	252/254	233/235	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/163	271/310	144/146	163/169	160/166	208/212	138/166	137/153	363/363	117/117
243	252/254	233/235	235/243	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/222	161/165	271/310	144/160	163/169	162/166	204/208	164/166	137/153	363/365	117/121
245	252/254	231/233	235/243	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	-/-	271/298	144/146	163/177	160/166	208/212	138/166	133/137	363/363	117/117
246	254/262	231/233	235/239	-/-	77/81	112/116	177/183	148/156	210/222	-/-	271/310	144/160	163/169	160/166	204/208	-/-	137/153	-/-	117/121
247	254/262	231/233	235/239	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	-/-	271/298	144/160	163/177	162/166	204/208	164/166	133/137	363/363	117/121
248	252/254	231/233	235/243	154/160	77/81	116/118	177/183	148/156	210/240	-/-	271/298	144/160	163/169	162/166	204/208	138/166	137/153	363/363	117/117
249	254/262	231/233	235/243	154/160	77/81	-/-	177/183	148/156	210/240	161/165	271/310	144/160	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	363/363	117/121
250	254/262	231/233	235/239	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/222	-/-	271/298	-/-	163/169	162/166	204/208	164/166	137/153	-/-	117/121
251	252/254	231/233	235/243	160/163	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	-/-	271/298	-/-	163/169	160/166	208/212	138/166	137/153	-/-	117/117
252	252/254	231/233	235/243	160/163	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	161/165	271/298	144/160	163/169	160/166	-/-	138/166	137/153	363/363	117/117
253	254/262	231/233	235/239	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/222	161/165	271/298	144/146	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	363/363	117/117
255	252/254	233/235	235/239	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	161/163	271/310	-/-	163/169	-/-	208/212	138/166	137/153	-/-	117/121
256	252/254	233/235	235/239	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	161/163	271/310	144/146	163/169	162/166	208/212	138/166	137/153	363/363	-/-
257	252/254	233/235	235/239	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/222	161/165	271/310	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	-/-	117/117
258	254/262	231/233	235/243	160/163	77/85	112/116	177/189	148/156	210/222	161/165	271/298	144/160	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	363/363	117/121
259	254/262	233/235	235/239	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	161/163	271/310	144/160	163/169	162/166	-/-	164/166	137/153	363/363	117/121
260	254/262	231/233	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/165	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/363	117/117
261	252/254	231/233	235/239	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/165	271/310	144/160	163/169	160/166	204/208	138/166	137/153	363/365	117/117
262	254/262	233/235	235/239	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/165	271/298	-/-	163/169	-/-	208/212	164/166	137/153	363/365	117/121
263	252/254	233/235	235/243	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	-/-	271/298	-/-	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	363/363	117/117
265	252/254	231/233	235/239	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	-/-	271/298	144/160	-/-	160/166	208/212	164/166	137/153	363/363	117/117
266	254/262	233/235	235/243	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	-/-	271/298	144/146	163/169	162/166	208/212	138/166	137/153	-/-	117/121
267	252/254	233/235	235/243	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	-/-	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	138/166	137/153	-/-	117/117
268	254/262	231/233	235/243	160/163	77/85	116/118	177/189	156/190	210/240	161/165	271/298	144/160	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	-/-	117/121

269	252/254	231/233	235/243	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	-/-	271/310	144/160	163/177	-/-	204/208	164/166	133/137	363/363	117/121
270	254/262	231/233	235/243	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/240	-/-	271/298	144/160	163/169	160/166	204/208	138/166	137/153	-/-	117/121
271	252/254	233/235	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	-/-	271/310	144/146	163/169	162/166	208/212	164/166	137/153	363/365	117/117
272	252/254	231/233	235/243	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/165	271/298	144/160	163/169	160/166	204/208	164/166	137/153	-/-	117/121
273	254/262	231/233	235/243	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/222	161/165	271/310	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/363	117/121
274	254/262	231/233	235/243	160/163	77/81	112/116	177/183	148/156	210/222	161/163	271/310	144/160	163/177	160/166	-/-	164/166	133/137	363/363	117/117
276	254/262	231/233	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/163	271/298	144/160	163/169	162/166	204/208	-/-	137/153	-/-	117/117
277	254/262	231/233	235/239	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/222	-/-	271/298	144/146	163/169	162/166	208/212	164/166	137/153	363/363	117/121
278	252/254	231/233	235/239	154/160	77/81	116/118	177/183	148/156	210/222	-/-	271/298	144/160	163/169	-/-	208/212	164/166	137/153	363/363	117/117
281	254/262	233/235	235/243	154/160	77/81	116/118	177/183	156/190	210/240	-/-	271/310	144/146	163/169	162/166	204/208	164/166	137/153	-/-	117/121
282	254/262	231/233	235/239	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	-/-	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/363	117/121
284	252/254	231/233	235/239	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	-/-	271/310	-/-	163/177	162/166	204/208	164/166	133/137	-/-	117/117
285	252/254	233/235	235/239	154/160	77/81	112/116	177/183	148/156	210/222	161/165	271/310	144/146	163/177	162/166	208/212	164/166	133/137	-/-	117/121
286	252/254	233/235	235/239	160/163	77/85	116/118	177/189	156/190	210/222	161/165	271/310	144/146	163/177	162/166	208/212	138/166	133/137	363/365	117/121
287	254/262	233/235	235/239	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/163	271/310	144/160	163/177	160/166	204/208	138/166	133/137	363/365	117/117
288	254/262	233/235	235/243	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	161/163	271/298	144/146	163/177	162/166	208/212	164/166	133/137	363/363	117/117
289	252/254	231/233	235/243	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	-/-	271/310	144/160	163/177	162/166	204/208	138/166	133/137	363/363	117/117
291	252/254	231/233	235/239	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	-/-	271/310	144/146	163/169	162/166	208/212	164/166	137/153	363/363	117/121
292	252/254	231/233	235/239	154/160	77/85	116/118	177/189	156/190	210/222	-/-	271/310	144/160	163/177	162/166	204/208	164/166	133/137	363/363	117/121
SP	254/262	233/235	235/243	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	-/-	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	133/137	363/363	117/121
93b	254/262	231/233	235/243	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	161/163	271/298	144/160	163/169	162/166	204/208	164/166	137/153	-/-	117/121
98	254/262	231/233	235/243	160/163	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	161/165	271/298	144/146	163/169	162/166	-/-	164/166	137/153	363/363	117/117
115	252/254	233/235	235/243	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/240	-/-	271/310	144/160	163/177	160/166	204/208	164/166	133/137	-/-	117/121
121	254/262	233/235	235/243	154/160	77/85	116/118	177/183	156/190	210/222	161/165	271/310	-/-	163/177	162/166	204/208	164/166	133/137	-/-	117/121
143	254/262	233/235	235/243	160/163	77/81	116/118	177/183	156/190	210/240	161/165	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	138/166	137/153	-/-	117/117
99	254/262	233/235	235/239	160/163	77/81	116/118	177/183	148/156	210/222	161/165	271/298	144/146	163/169	160/166	208/212	164/166	137/153	363/365	117/117
100	254/262	233/235	235/239	154/160	77/81	112/116	177/189	148/156	210/222	-/-	271/298	144/160	163/169	162/166	204/208	164/166	137/153	-/-	117/117
211	254/262	233/235	235/243	154/160	77/85	112/116	177/189	156/190	210/240	-/-	271/310	144/146	163/169	162/166	208/212	138/166	137/153	-/-	117/121
198	254/262	233/235	235/239	160/163	77/81	112/116	177/189	148/156	210/240	-/-	271/310	144/160	163/169	162/166	204/208	164/166	137/153	-/-	117/117

Tabela 2. Continuação

Isolado	VMC9B5	VvP18B20	VMC1A5	VVIN85	GT183H07	VMC9F4_DG_A	VMCNG2G7	VVMD25	VMC2E2	VMC7F2	VVIN16	VMC5C1	VVC6	VMC8C2	VVS2	VMC7G3	UDV043	VMC8D3	VVS5
733-34	237/239	229/237	181/183	343/349	244/250	138/148	105/117	239/245	127/151	196/198	143/153	145/167	109/111	130/144	135/147	114/116	157/161	160/168	107/115
1103-88	237/237	237/237	181/181	349/349	250/250	138/138	105/105	245/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/109	144/144	147/147	114/114	161/161	168/168	107/107
1	237/237	229/237	181/181	349/349	244/250	138/138	105/117	245/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/109	130/144	147/147	114/116	161/161	168/168	107/115
2	237/237	229/237	181/183	349/349	244/250	138/148	105/117	239/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/109	130/144	135/147	114/116	157/161	168/168	107/115
3	237/239	229/237	181/181	343/349	-/-	-/-	105/105	245/245	127/151	196/198	143/153	145/167	109/109	130/144	-/-	114/116	161/161	160/168	107/107
5	237/239	229/237	181/183	343/349	250/250	138/148	105/117	245/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/111	144/144	147/147	114/114	157/161	160/168	107/115
6	237/239	229/237	181/183	349/349	250/250	138/148	105/117	245/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/111	130/144	147/147	114/116	157/161	168/168	107/107
7	237/237	229/237	181/183	343/349	250/250	138/148	105/117	239/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/109	130/144	135/147	114/116	157/161	160/168	107/115
8	237/239	229/237	181/181	-/-	250/250	138/138	105/105	239/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/111	130/144	135/147	114/116	161/161	160/168	107/115
9	-/-	229/237	181/183	-/-	244/250	138/148	105/105	245/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/111	130/144	147/147	114/116	157/161	160/168	107/107
10	237/239	229/237	181/181	-/-	244/250	138/138	105/105	245/245	127/151	196/198	143/153	145/167	109/109	144/144	147/147	114/114	161/161	168/168	107/115
11	237/239	237/237	181/183	-/-	250/250	138/148	105/105	245/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/109	144/144	-/-	114/114	157/161	160/168	107/107
13	237/239	229/237	181/183	-/-	250/250	138/148	105/117	239/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/111	144/144	135/147	114/114	157/161	160/168	107/107
15	237/237	229/237	181/183	343/349	250/250	138/148	105/117	245/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/109	144/144	147/147	114/114	157/161	160/168	107/107
16	237/239	229/237	181/181	343/349	250/250	138/148	105/117	245/245	127/151	196/198	143/153	145/167	109/109	144/144	147/147	114/114	161/161	160/168	107/107
17	237/239	229/237	181/181	-/-	-/-	-/-	105/105	245/245	127/151	196/198	143/153	145/167	109/109	144/144	147/147	114/114	161/161	168/168	107/115
18	237/237	237/237	181/183	349/349	-/-	-/-	105/105	239/245	-/-	196/196	153/153	145/167	109/109	130/144	147/147	114/116	161/161	168/168	107/107
19	237/239	229/237	181/181	-/-	-/-	-/-	105/117	239/245	127/151	196/198	143/153	145/167	109/111	130/144	135/147	114/116	161/161	160/168	107/107
20	237/237	237/237	181/181	-/-	244/250	138/138	105/117	239/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/111	130/144	135/147	114/116	161/161	160/168	107/107
21	237/239	229/237	181/181	-/-	244/250	138/138	105/117	245/245	127/151	196/198	143/153	145/167	109/109	144/144	147/147	114/114	161/161	160/168	107/107
22	237/239	229/237	181/181	343/349	250/250	138/138	105/117	239/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/111	144/144	135/147	114/114	161/161	168/168	107/115
23	237/237	229/237	181/181	349/349	250/250	138/138	105/105	245/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/111	130/144	147/147	114/116	161/161	168/168	107/107
25	237/237	229/237	181/181	343/349	244/250	138/138	105/105	245/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/109	130/144	147/147	114/116	161/161	160/168	107/115
26	237/237	229/237	181/181	343/349	250/250	138/138	105/105	239/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/109	144/144	135/147	114/114	161/161	168/168	107/107
27	237/237	237/237	181/183	343/349	244/250	138/138	105/105	239/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/111	144/144	135/147	114/114	157/161	160/168	107/115
28	237/237	229/237	181/181	349/349	244/250	138/138	105/117	239/245	151/151	-/-	143/153	167/167	109/111	144/144	135/147	114/114	161/161	168/168	107/115
29	237/239	237/237	181/183	-/-	250/250	138/148	105/105	245/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/111	144/144	147/147	114/114	157/161	168/168	107/107
30	237/237	237/237	181/183	-/-	250/250	138/148	105/117	245/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/109	130/144	147/147	114/116	157/161	160/168	107/107
31	237/237	229/237	181/181	343/349	250/250	138/138	105/105	239/245	151/151	196/198	153/153	167/167	109/111	144/144	135/147	114/114	161/161	160/168	107/115
32	237/239	237/237	181/181	349/349	250/250	138/138	105/117	239/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/111	130/144	135/147	114/116	161/161	168/168	107/115
33	237/237	229/237	181/181	349/349	244/250	138/138	105/105	239/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/111	144/144	135/147	114/114	161/161	168/168	107/115
34	237/237	229/237	181/181	349/349	244/250	138/148	105/105	239/245	127/151	196/198	143/153	145/167	109/109	144/144	135/147	114/114	161/161	160/168	107/107
35	237/237	237/237	181/183	343/349	250/250	138/148	105/105	239/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/109	130/144	135/147	114/116	157/161	160/168	107/107
36	237/239	237/237	181/183	343/349	244/250	138/148	105/105	239/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/111	130/144	135/147	114/116	157/161	160/168	107/107
37	237/239	229/237	181/181	349/349	250/250	138/148	105/117	245/245	151/151	196/198	143/153	167/167	-/-	144/144	147/147	114/114	157/161	168/168	107/107
38a	237/239	237/237	181/181	-/-	244/250	138/138	105/105	239/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/111	130/144	135/147	114/116	161/161	168/168	107/107
38b	237/237	229/237	181/183	343/349	250/250	138/148	105/105	239/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/111	144/144	135/147	114/114	157/161	160/168	107/115
39	237/239	229/237	181/181	343/349	244/250	138/138	105/105	245/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/111	144/144	147/147	114/114	161/161	160/168	107/115
40	237/237	237/237	181/183	349/349	-/-	-/-	105/105	245/245	127/151	196/196	-/-	145/167	109/109	144/144	147/147	114/114	157/161	168/168	107/115
41	237/237	237/237	181/181	-/-	-/-	-/-	105/105	245/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/109	144/144	147/147	114/114	161/161	168/168	107/115
42	237/239	229/237	181/183	349/349	244/250	138/138	105/105	239/245	151/151	196/198	-/-	167/167	111/111	130/144	135/147	-/-	157/161	168/168	107/115
43	237/239	229/237	181/181	343/349	244/250	138/138	105/117	239/245	127/151	196/198	-/-	145/167	-/-	144/144	147/147	114/114	161/161	168/168	107/115

44	237/239	237/237	181/181	343/349	244/250	138/148	105/105	245/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/109	130/144	147/147	114/116	161/161	160/168	107/107
45	237/239	229/237	181/181	343/349	244/250	138/138	105/105	239/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/109	130/144	135/147	114/116	161/161	160/168	107/115
46	237/239	229/237	181/181	343/349	-/-	-/-	105/105	245/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/111	144/144	147/147	114/114	161/161	160/168	107/107
47	237/237	229/237	181/181	343/349	-/-	-/-	105/105	245/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/109	130/144	147/147	114/116	161/161	160/168	107/115
48	-/-	229/237	181/183	349/349	250/250	138/138	105/117	239/245	127/151	196/198	143/153	145/167	109/111	130/144	135/147	114/116	157/161	168/168	107/107
49	237/239	229/237	181/183	349/349	244/250	138/148	105/117	239/245	127/151	-/-	143/153	145/167	109/109	130/144	135/147	114/116	157/161	168/168	-/-
50	237/239	229/237	181/181	349/349	250/250	138/138	105/117	245/245	127/151	-/-	153/153	145/167	109/111	144/144	147/147	114/114	161/161	168/168	107/115
51	237/239	229/237	181/183	349/349	244/250	138/148	105/117	239/245	127/151	-/-	143/153	145/167	109/111	144/144	135/147	114/114	157/161	168/168	107/115
52	237/239	237/237	181/183	-/-	-/-	-/-	105/105	245/245	127/151	196/196	-/-	145/167	109/111	130/144	147/147	114/116	157/161	160/168	107/115
53	237/237	229/237	181/183	349/349	244/250	138/148	105/117	245/245	127/151	-/-	143/153	145/167	109/109	144/144	147/147	114/114	157/161	168/168	107/107
54	237/239	229/237	181/181	343/349	244/250	138/138	105/105	239/245	127/151	196/198	-/-	145/167	109/111	130/144	135/147	-/-	161/161	160/168	107/115
55	237/237	237/237	181/181	349/349	250/250	138/138	105/117	245/245	127/151	196/196	-/-	145/167	109/109	130/144	147/147	114/116	161/161	168/168	107/115
56	237/237	229/237	181/181	343/349	244/250	138/138	105/105	245/245	127/151	196/198	-/-	145/167	109/111	144/144	147/147	114/114	161/161	160/168	107/115
57	237/237	237/237	181/183	349/349	244/250	138/148	105/105	239/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/111	144/144	135/147	114/114	157/161	168/168	107/115
58	237/239	237/237	181/181	343/349	250/250	138/138	105/105	245/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/109	144/144	147/147	114/114	161/161	168/168	107/115
59	237/239	229/237	181/183	349/349	244/250	138/138	105/117	239/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/109	144/144	135/147	114/114	157/161	168/168	107/115
60	237/237	229/237	183/183	349/349	-/-	-/-	105/105	239/245	127/151	196/198	143/153	145/167	109/109	144/144	135/147	114/114	157/161	168/168	107/107
61	237/239	237/237	-/-	-/-	-/-	-/-	105/117	239/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/111	130/144	135/147	114/116	161/161	160/168	107/107
62	237/239	237/237	181/181	343/349	244/250	138/138	105/117	239/245	151/151	196/196	-/-	167/167	109/111	144/144	147/147	114/114	161/161	160/168	107/107
63	237/239	237/237	181/181	-/-	244/250	138/148	105/117	245/245	127/151	196/196	-/-	145/167	109/111	130/144	135/147	114/116	157/161	168/168	107/115
64	237/239	237/237	181/181	343/349	250/250	138/138	105/105	245/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/109	130/144	147/147	114/116	161/161	168/168	107/107
65	237/239	229/237	181/181	-/-	250/250	138/138	105/117	239/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/111	130/144	135/147	114/116	161/161	160/168	107/107
66	237/239	237/237	181/183	349/349	244/250	138/148	105/105	245/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/111	130/144	147/147	114/116	157/161	168/168	107/107
67	237/239	229/237	181/183	349/349	250/250	138/148	105/105	245/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/111	144/144	147/147	114/114	157/161	168/168	107/115
70	237/239	229/237	181/183	-/-	250/250	138/148	105/117	245/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/109	144/144	147/147	114/114	157/161	168/168	107/115
71	237/237	229/237	181/183	349/349	-/-	-/-	105/105	245/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/109	130/144	147/147	114/116	157/161	168/168	107/107
72	237/239	237/237	181/181	349/349	250/250	138/148	105/117	239/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/109	144/144	135/147	114/114	161/161	168/168	107/107
73	237/237	229/237	181/183	349/349	250/250	138/138	105/117	245/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/109	130/144	147/147	114/116	161/161	168/168	107/107
74	237/239	237/237	181/181	349/349	-/-	-/-	105/117	245/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/111	144/144	147/147	114/114	161/161	168/168	107/115
75	237/239	237/237	181/183	349/349	244/250	138/148	105/117	245/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/109	144/144	147/147	114/114	157/161	168/168	107/115
76	237/237	237/237	181/181	-/-	244/250	138/138	105/117	239/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/109	144/144	135/147	114/114	161/161	168/168	107/107
77	-/-	229/237	181/181	-/-	-/-	-/-	105/105	239/245	127/151	196/198	143/153	145/167	109/111	130/144	135/147	114/116	161/161	160/168	107/115
78	237/237	237/237	181/181	343/349	250/250	138/138	105/117	239/245	127/151	-/-	-/-	145/167	109/109	144/144	135/147	114/114	161/161	160/168	107/115
79	237/239	237/237	181/183	349/349	250/250	138/148	105/117	239/245	151/151	196/196	-/-	167/167	109/111	130/144	135/147	114/116	157/161	168/168	107/107
80	237/239	229/237	181/181	343/349	244/250	138/138	105/117	245/245	127/151	196/198	-/-	145/167	109/111	130/144	147/147	114/116	161/161	168/168	107/115
82	237/239	237/237	181/183	349/349	250/250	138/148	105/105	245/245	127/151	196/196	-/-	145/167	109/111	144/144	147/147	114/114	157/161	168/168	107/107
84	237/239	229/237	181/183	-/-	250/250	138/148	105/105	245/245	127/151	196/198	143/153	145/167	109/109	130/144	147/147	114/116	157/161	168/168	107/115
85a	237/237	229/237	181/181	343/349	-/-	-/-	105/105	239/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/109	144/144	135/147	114/114	161/161	160/168	107/115
85b	237/239	237/237	181/181	349/349	250/250	138/138	105/105	239/245	151/151	196/196	-/-	167/167	109/111	144/144	135/147	114/114	161/161	168/168	107/115
86	237/237	229/237	181/181	343/349	244/250	138/148	105/105	239/245	127/151	196/198	-/-	145/167	109/109	130/144	135/147	114/116	161/161	160/168	107/107
87	237/239	229/237	181/183	349/349	244/250	138/148	105/105	239/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/109	130/144	135/147	114/116	157/161	168/168	107/107
88	237/239	229/237	181/183	349/349	244/250	138/148	105/117	245/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/111	130/144	147/147	114/116	157/161	160/168	107/115
89	237/237	229/237	181/183	-/-	244/250	138/148	105/105	245/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/109	144/144	147/147	-/-	157/161	168/168	107/115
90	237/237	229/237	181/181	349/349	244/250	138/138	105/105	245/245	127/151	196/196	-/-	145/167	109/111	130/144	-/-	114/116	161/161	168/168	107/107
92b	-/-	229/237	181/183	-/-	250/250	138/148	105/105	239/245	151/151	196/198	-/-	167/167	109/109	144/144	135/147	-/-	157/161	168/168	107/115
93a	237/239	229/237	181/183	349/349	250/250	138/148	105/117	245/245	127/151	196/198	-/-	145/167	109/109	144/144	147/147	-/-	157/161	168/168	107/107
94	237/239	229/237	-/-	-/-	250/250	138/148	105/105	245/245	127/151	196/196	-/-	145/167	109/111	144/144	147/147	114/114	157/161	168/168	107/107

269	237/237	229/237	181/181	343/349	250/250	138/138	105/117	245/245	127/151	-/-	143/153	145/167	109/109	130/144	147/147	-/-	161/161	160/168	107/107
270	237/239	229/237	181/181	343/349	250/250	138/138	105/105	245/245	151/151	196/198	-/-	167/167	109/109	130/144	147/147	-/-	161/161	160/168	107/115
271	237/239	229/237	181/181	343/349	244/250	138/138	105/117	239/245	127/151	196/198	143/153	145/167	109/111	130/144	135/147	114/116	161/161	168/168	107/115
272	237/237	229/237	181/183	343/349	250/250	138/148	105/105	239/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/109	144/144	147/147	114/114	157/161	160/168	107/107
273	237/239	229/237	181/183	343/349	250/250	138/148	105/117	239/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/111	144/144	135/147	114/114	157/161	160/168	107/115
274	237/237	229/237	181/183	343/349	250/250	138/148	105/117	239/245	127/151	196/198	143/153	145/167	109/109	144/144	135/147	114/114	157/161	168/168	107/115
276	237/239	229/237	-/-	343/349	244/250	138/138	105/105	239/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/111	130/144	135/147	114/116	161/161	160/168	107/115
277	237/239	229/237	-/-	-/-	-/-	138/138	105/117	239/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/111	144/144	135/147	114/114	157/161	168/168	107/115
278	237/239	237/237	181/181	349/349	250/250	138/148	105/105	239/245	151/151	-/-	153/153	167/167	109/111	130/144	135/147	114/116	157/161	160/168	-/-
281	237/239	237/237	181/183	343/349	244/250	138/148	105/117	239/245	127/151	-/-	153/153	145/167	109/111	144/144	135/147	114/114	157/161	160/168	-/-
282	237/237	229/237	181/181	349/349	250/250	138/138	105/105	239/245	151/151	-/-	143/153	167/167	109/109	130/144	135/147	114/116	161/161	168/168	107/107
284	237/239	229/237	181/181	349/349	244/250	138/138	105/117	239/245	151/151	196/198	143/153	167/167	109/109	130/144	135/147	114/116	161/161	160/168	107/115
285	237/239	237/237	181/183	343/349	244/250	138/148	105/117	239/245	151/151	-/-	153/153	167/167	109/109	144/144	135/147	-/-	157/161	160/168	107/115
286	237/237	229/237	181/183	349/349	244/250	138/148	105/117	239/245	127/151	-/-	143/153	145/167	109/111	130/144	135/147	114/116	157/161	168/168	107/107
287	237/239	237/237	181/181	-/-	244/250	138/138	105/117	245/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/109	144/144	147/147	114/114	161/161	160/168	107/115
288	237/237	237/237	181/183	343/349	244/250	138/148	105/117	239/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/109	144/144	135/147	114/114	157/161	160/168	107/115
289	237/237	237/237	181/183	343/349	250/250	138/148	105/105	245/245	151/151	196/196	143/153	167/167	109/111	130/144	147/147	114/116	157/161	160/168	107/107
291	237/237	229/237	181/183	343/349	250/250	138/148	105/117	239/245	127/151	196/198	143/153	145/167	109/111	130/144	135/147	114/116	157/161	160/168	107/107
292	237/239	237/237	181/181	343/349	244/250	138/138	105/117	239/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/111	130/144	135/147	114/116	161/161	160/168	107/107
SP	237/239	237/237	181/181	343/349	250/250	138/138	105/105	245/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/111	144/144	147/147	114/114	161/161	160/168	107/107
93b	237/237	237/237	181/181	343/349	244/250	138/138	105/117	245/245	127/151	-/-	153/153	145/167	109/109	144/144	147/147	114/114	161/161	160/168	-/-
98	237/237	229/237	181/183	-/-	-/-	138/138	105/117	239/245	151/151	-/-	143/153	167/167	109/109	130/144	135/147	114/116	157/161	168/168	107/107
115	-/-	237/237	181/183	343/349	-/-	-/-	105/105	245/245	127/151	-/-	153/153	145/167	109/111	130/144	147/147	114/116	157/161	168/168	107/107
121	237/237	237/237	181/183	349/349	250/250	138/148	105/105	245/245	127/151	196/196	153/153	145/167	109/109	130/144	147/147	114/116	157/161	168/168	107/107
143	237/237	237/237	181/181	343/349	250/250	138/138	105/117	245/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/109	144/144	147/147	-/-	161/161	160/168	107/107
99	237/237	237/237	181/183	349/349	244/250	138/148	105/117	239/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/109	130/144	135/147	114/116	157/161	168/168	107/115
100	237/237	237/237	181/183	349/349	244/250	138/148	105/105	239/245	151/151	196/196	153/153	167/167	109/109	130/144	135/147	114/116	157/161	168/168	107/115
211	237/239	237/237	181/181	343/349	244/250	138/148	105/105	239/245	151/151	196/198	153/153	167/167	109/109	130/144	135/147	114/116	157/161	160/168	107/115
198	237/237	229/237	181/181	349/349	244/250	138/138	105/117	245/245	127/151	196/198	153/153	145/167	109/109	130/144	147/147	114/114	161/161	168/168	107/115

Tabela 2. Continuação

Isolado	VVII52	VVIU20	VVIV67	VVS16	VVC19	VVMD28	VVMD17	VVIT68	VMC6D12	VMC2C3	VMC7H2	VMC3G8.2	UDV036	VVIM01	UDV076	UDV088	VVIS63	VMC8A7	VMC1G7	VRZAG30
733-34	84/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/240	216/218	258/270	154/176	163/187	117/126	160/168	175/177	180/182	156/178	181/211	178/184	148/174	219/233	145/147
1103-88	98/98	361/361	369/369	284/284	94/94	230/230	218/218	258/258	176/176	163/163	117/117	160/160	177/177	180/180	156/156	181/181	184/184	148/148	219/219	147/147
1	98/98	361/373	-/-	264/284	94/98	230/230	218/218	-/-	176/176	163/163	117/117	160/160	175/177	180/180	156/178	181/211	178/184	-/-	219/219	145/147
2	84/98	361/361	357/369	264/284	94/98	230/240	218/218	258/270	176/176	163/163	117/126	160/160	175/177	180/180	156/178	181/211	178/184	148/174	219/233	145/147
3	98/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/230	216/218	-/-	154/176	163/187	117/126	160/168	177/177	180/180	156/156	181/211	184/184	148/148	219/219	147/147
5	98/98	361/361	357/369	264/284	94/94	230/240	218/218	-/-	176/176	163/163	117/117	160/160	177/177	180/180	156/156	181/211	178/184	148/148	219/233	145/147
6	98/98	361/361	357/369	264/284	94/98	230/240	218/218	-/-	176/176	163/187	117/126	160/168	175/177	180/182	156/156	181/181	178/184	148/174	219/233	147/147
7	98/98	361/361	369/369	284/284	94/94	230/240	218/218	258/270	154/176	163/163	117/126	160/168	177/177	180/180	156/156	181/181	178/184	148/148	219/233	145/147
8	98/98	361/361	369/369	284/284	94/94	230/230	218/218	258/258	154/176	163/187	117/117	160/168	175/177	180/180	156/178	181/211	184/184	148/174	219/219	145/147
9	84/98	361/361	357/369	264/284	94/94	230/240	218/218	258/258	176/176	163/187	117/117	160/160	177/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/148	219/233	147/147
10	98/98	361/361	357/369	264/284	94/94	230/230	216/218	258/270	154/176	163/163	117/126	160/168	177/177	180/180	156/178	181/211	184/184	148/148	219/219	145/147
11	98/98	361/361	369/369	284/284	94/94	230/240	-/-	258/258	176/176	163/163	117/117	160/160	177/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/148	219/233	147/147
13	84/98	361/361	357/369	-/-	94/98	230/240	218/218	258/258	176/176	163/187	117/117	160/160	175/177	180/182	156/156	181/181	178/184	148/174	219/233	147/147
15	84/98	361/361	369/369	264/284	94/98	230/240	218/218	258/270	-/-	163/187	117/117	160/168	175/177	180/182	156/178	181/181	178/184	148/174	219/233	147/147
16	98/98	361/361	369/369	284/284	94/98	230/240	216/218	258/258	176/176	163/163	117/117	160/160	175/177	180/182	156/156	181/181	178/184	148/174	219/219	147/147
17	-/-	-/-	357/369	264/284	94/94	230/230	216/218	258/258	154/176	163/163	117/126	160/168	177/177	180/180	156/178	181/211	184/184	148/148	219/219	145/147
18	98/98	361/361	369/369	284/284	94/98	230/230	218/218	258/258	154/176	163/187	117/126	160/168	175/177	180/182	156/156	181/181	178/184	148/174	219/219	147/147
19	98/98	361/361	369/369	284/284	94/98	230/230	216/218	-/-	154/176	163/163	117/117	160/168	175/177	180/180	156/178	181/211	184/184	148/174	219/219	147/147
20	98/98	361/373	369/369	284/284	94/98	230/230	216/218	258/258	154/176	163/187	117/117	160/168	175/177	180/180	156/156	181/211	178/184	148/174	219/219	147/147
21	84/98	361/361	369/369	284/284	94/98	230/230	216/218	258/258	154/176	163/187	117/117	160/168	175/177	180/180	156/178	181/211	178/184	148/174	219/219	147/147
22	98/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/230	218/218	258/258	154/176	163/163	117/126	160/168	175/177	180/182	156/178	181/181	178/184	148/174	219/219	145/147
23	84/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/230	216/218	258/258	176/176	163/187	117/126	160/160	175/177	180/182	156/178	181/181	184/184	148/174	219/219	147/147
25	84/98	361/361	369/369	284/284	94/98	230/230	216/218	-/-	176/176	163/163	117/117	160/160	175/177	180/180	156/178	181/211	178/184	148/174	219/219	145/147
26	98/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/230	218/218	-/-	176/176	163/187	117/117	160/160	177/177	180/180	156/156	181/181	184/184	148/148	219/219	147/147
27	84/98	361/361	-/-	-/-	94/94	230/230	218/218	-/-	154/176	163/163	117/126	160/168	177/177	180/180	156/156	181/211	184/184	-/-	219/219	145/147
28	84/98	361/361	369/369	284/284	94/94	230/230	216/218	-/-	154/176	163/163	117/117	160/168	177/177	180/182	156/156	181/211	178/184	148/148	219/219	145/147
29	84/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/240	218/218	258/258	176/176	163/187	117/126	160/160	177/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/148	219/233	147/147
30	98/98	361/361	357/369	264/284	94/98	230/240	218/218	258/270	176/176	163/163	117/126	160/160	175/177	180/182	156/178	181/181	184/184	148/174	219/233	147/147
31	84/98	361/361	369/369	284/284	94/94	230/230	218/218	258/258	176/176	163/163	117/117	160/160	177/177	180/180	156/156	181/181	184/184	148/148	219/219	145/147
32	84/98	361/361	369/369	284/284	94/98	230/230	218/218	258/258	176/176	163/163	117/126	160/160	175/177	180/182	156/178	181/181	184/184	148/174	219/219	145/147
33	84/98	361/373	369/369	284/284	94/98	230/230	216/218	258/258	176/176	163/187	117/117	160/160	175/177	180/180	156/156	181/211	184/184	148/174	219/219	145/147
34	84/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/240	216/218	-/-	176/176	163/187	117/126	160/168	177/177	180/180	156/156	181/211	178/184	148/148	219/233	147/147
35	84/98	361/361	369/369	284/284	94/98	230/240	218/218	258/270	176/176	163/187	117/126	160/160	175/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/148	219/233	147/147
36	84/98	361/361	369/369	264/284	94/94	230/240	218/218	258/258	154/176	163/163	117/126	160/168	177/177	180/180	156/178	181/211	178/184	148/148	219/233	147/147
37	98/98	361/361	369/369	284/284	94/94	230/240	216/218	258/258	176/176	163/187	117/117	160/160	177/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/148	219/233	147/147
38a	98/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/230	218/218	258/258	154/176	163/187	117/117	160/168	177/177	180/180	156/178	181/211	178/184	148/148	219/219	147/147
38b	98/98	361/361	-/-	-/-	94/94	230/240	218/218	258/270	154/176	163/187	117/117	160/168	177/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/148	219/233	145/147
39	98/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/230	218/218	258/258	176/176	163/163	117/126	160/160	175/177	180/180	156/156	181/211	184/184	148/174	219/219	145/147
40	84/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/240	218/218	-/-	154/176	163/187	117/126	160/168	177/177	180/182	156/178	181/181	178/184	148/148	219/233	145/147
41	98/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/230	218/218	258/270	154/176	163/163	117/126	160/168	177/177	180/182	156/178	181/181	184/184	148/148	219/219	145/147
42	84/98	361/361	357/369	264/284	94/94	-/-	218/218	258/258	176/176	163/187	117/126	160/160	177/177	180/180	156/178	181/211	184/184	148/148	219/219	145/147
43	98/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/230	216/218	258/258	154/176	163/163	117/117	160/168	175/177	180/180	156/156	181/211	178/184	148/174	219/219	145/147

95	98/98	361/361	369/369	284/284	94/94	230/230	216/218	258/270	176/176	163/187	117/117	160/160	177/177	180/182	156/178	181/181	184/184	148/148	219/219	147/147
96	84/98	361/361	369/369	284/284	94/98	230/240	218/218	258/258	176/176	163/163	117/117	160/168	175/177	180/180	156/156	181/211	178/184	148/174	219/233	145/147
97	84/98	361/373	369/369	284/284	94/98	230/230	216/218	258/258	176/176	163/163	117/117	160/160	175/177	180/182	156/178	181/181	178/184	148/174	219/219	147/147
101	98/98	361/361	369/369	284/284	94/94	230/230	216/218	258/258	176/176	-/-	117/117	160/160	177/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/148	219/233	147/147
103	98/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/230	218/218	258/258	176/176	163/187	117/126	160/160	177/177	180/180	156/178	181/181	-/-	148/148	219/233	-/-
104	84/98	361/373	369/369	284/284	94/98	230/240	218/218	258/270	176/176	163/163	117/126	160/160	175/177	180/182	156/178	181/181	184/184	148/174	219/219	147/147
105	98/98	361/361	369/369	284/284	94/94	230/230	216/218	258/258	154/176	163/187	117/126	160/160	177/177	180/180	156/178	181/211	184/184	-/-	219/219	-/-
106	98/98	361/361	369/369	284/284	94/98	230/230	216/218	258/258	176/176	163/187	117/126	160/160	175/177	180/180	156/178	181/211	-/-	148/174	219/219	145/147
107	98/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/230	216/218	258/258	154/176	163/163	117/126	160/168	177/177	180/182	156/178	181/181	-/-	148/148	219/219	147/147
108	98/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/240	218/218	258/258	-/-	163/187	-/-	160/168	175/177	180/182	156/156	181/211	178/184	148/174	219/219	145/147
109	84/98	361/361	369/369	284/284	94/98	230/230	218/218	258/270	176/176	163/187	117/126	160/160	175/177	180/180	156/178	181/211	184/184	148/174	219/233	147/147
110	98/98	361/373	357/369	264/284	-/-	230/230	218/218	-/-	-/-	163/187	117/126	160/160	177/177	180/182	156/178	181/181	184/184	148/148	219/219	145/147
111	84/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/230	218/218	258/270	-/-	163/163	117/117	160/160	175/177	180/182	156/178	181/181	-/-	148/174	219/233	147/147
112	84/98	361/361	357/369	264/284	94/98	230/230	218/218	-/-	154/176	163/163	117/126	160/168	175/177	180/180	156/178	181/181	-/-	-/-	219/219	145/147
113	84/98	361/373	369/369	284/284	94/98	230/230	216/218	258/270	176/176	163/187	117/126	160/160	175/177	180/180	156/178	181/181	184/184	-/-	219/219	147/147
114	84/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/240	218/218	258/270	154/176	163/163	117/126	160/168	177/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/148	219/233	-/-
116	98/98	361/361	369/369	284/284	-/-	230/230	218/218	258/258	154/176	163/163	117/117	160/168	177/177	180/180	156/156	181/181	184/184	148/148	219/233	-/-
117	98/98	361/361	357/369	264/284	94/98	230/240	216/218	258/258	154/176	163/163	117/126	160/168	175/177	180/180	156/156	181/181	184/184	148/174	219/219	147/147
118	98/98	361/373	369/369	284/284	94/98	230/240	216/218	258/258	154/176	163/187	117/126	160/168	175/177	180/180	156/178	181/211	-/-	148/174	219/233	147/147
119	98/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/230	216/218	258/258	176/176	163/187	117/117	160/160	175/177	180/180	156/178	181/211	178/184	148/174	219/219	145/147
120	84/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/240	218/218	258/258	176/176	163/187	117/126	160/160	175/177	180/180	156/178	181/211	184/184	148/174	219/233	147/147
123	98/98	361/361	369/369	284/284	94/98	230/230	216/218	258/258	154/176	163/187	117/117	160/168	-/-	-/-	156/178	181/211	178/184	148/174	219/233	145/147
124	98/98	361/373	357/369	284/284	94/94	230/230	216/218	258/258	176/176	163/187	117/117	160/160	177/177	180/180	156/156	181/211	178/184	148/148	219/219	147/147
126	84/98	361/361	357/369	264/284	94/98	230/240	216/218	258/270	176/176	163/163	117/117	160/160	175/177	180/180	156/156	181/211	178/184	148/148	219/233	-/-
127	84/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/230	218/218	258/270	176/176	163/187	117/117	160/160	177/177	180/182	156/178	181/181	-/-	148/148	219/219	145/147
128	84/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/240	218/218	258/270	154/176	163/187	117/117	160/168	175/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/174	219/219	145/147
129	84/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/240	218/218	258/270	176/176	163/163	117/117	160/160	175/177	180/182	156/178	181/181	184/184	148/174	219/219	-/-
130	98/98	361/361	357/369	264/284	94/94	230/240	216/218	258/258	154/176	163/163	117/126	160/168	175/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/174	219/233	147/147
131	98/98	361/373	369/369	284/284	94/98	230/230	216/218	258/258	176/176	163/163	117/126	160/160	175/177	180/180	156/178	181/211	184/184	-/-	219/219	147/147
132	84/98	361/361	369/369	284/284	-/-	230/240	216/218	258/270	154/176	163/187	117/126	160/168	177/177	180/180	156/178	181/211	184/184	148/148	219/219	147/147
133	84/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/240	218/218	258/270	154/176	163/187	117/126	160/168	175/177	180/180	156/178	181/211	184/184	148/174	219/233	-/-
134	84/98	361/361	357/369	264/284	94/94	230/230	216/218	258/270	-/-	163/187	117/126	160/160	177/177	180/182	156/156	181/211	184/184	148/148	219/219	147/147
135	98/98	361/361	357/369	264/284	94/98	230/240	216/218	258/258	176/176	163/187	117/117	160/160	175/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/174	219/233	145/147
136	84/98	361/361	369/369	284/284	94/94	230/230	216/218	258/270	176/176	163/163	117/126	160/160	177/177	180/180	156/178	181/211	184/184	148/148	219/219	145/147
137	98/98	361/373	357/369	284/284	94/98	230/240	218/218	258/270	176/176	163/163	117/117	160/160	175/177	180/180	156/156	181/211	184/184	148/174	219/219	147/147
138	98/98	361/373	369/369	264/284	94/94	230/240	216/218	258/258	176/176	163/187	117/126	160/160	175/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/174	219/219	145/147
139	98/98	361/361	357/369	264/284	-/-	230/230	218/218	-/-	176/176	163/187	117/126	160/160	175/177	180/180	156/178	181/181	184/184	148/174	219/219	145/147
140a	98/98	361/373	369/369	284/284	94/98	230/230	216/218	258/258	154/176	163/163	117/117	160/168	175/177	180/182	156/178	181/181	184/184	-/-	219/233	-/-
140b	98/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/240	216/218	258/258	154/176	163/187	117/117	160/168	-/-	-/-	156/156	181/211	184/184	-/-	219/219	-/-
141	98/98	361/361	357/369	264/284	94/94	230/240	216/218	258/258	176/176	-/-	117/117	160/168	177/177	180/180	156/156	181/181	184/184	-/-	219/233	145/147
142	84/98	361/361	357/369	264/284	-/-	230/230	218/218	258/270	154/176	163/187	117/126	160/168	177/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/148	219/233	145/147
144	84/98	361/373	357/369	264/284	-/-	230/240	216/218	258/270	-/-	163/187	117/117	160/168	175/177	180/182	156/178	181/181	184/184	148/174	219/233	145/147
145	84/98	361/361	369/369	284/284	-/-	230/240	216/218	258/270	176/176	163/163	117/126	160/160	175/177	180/180	156/156	181/211	184/184	148/174	219/233	147/147
146	84/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/230	216/218	258/258	176/176	163/187	117/126	160/160	175/177	180/180	156/156	181/211	184/184	148/174	219/233	147/147
147	84/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/240	218/218	258/270	-/-	163/187	117/126	160/160	175/177	180/182	156/178	181/181	184/184	148/174	219/233	147/147
148	98/98	361/361	357/369	264/284	94/94	230/230	218/218	258/258	154/176	163/187	117/117	160/168	177/177	180/182	156/178	181/181	178/184	148/148	219/219	147/147
149	84/98	361/361	369/369	284/284	94/94	230/240	-/-	258/270	-/-	163/187	117/126	160/160	175/177	180/180	156/156	181/211	184/184	148/174	219/219	145/147

150	84/98	361/373	357/369	264/284	94/94	230/230	218/218	258/258	176/176	163/187	117/126	160/160	175/177	180/180	156/156	181/211	184/184	148/174	219/233	147/147
151	84/98	361/361	369/369	284/284	94/94	230/230	216/218	258/270	176/176	-/-	117/117	160/160	177/177	180/180	156/178	181/181	184/184	148/148	219/233	147/147
152	98/98	361/373	-/-	-/-	94/98	230/230	218/218	258/258	176/176	-/-	117/117	160/160	-/-	-/-	156/156	181/181	184/184	148/174	219/233	147/147
153	84/98	361/373	-/-	-/-	94/98	230/240	218/218	258/270	154/176	163/163	117/126	160/168	175/177	180/182	156/178	181/181	184/184	-/-	219/233	145/147
154	84/98	361/361	357/369	264/284	94/94	230/230	216/218	258/270	154/176	163/187	117/126	160/168	177/177	180/180	156/178	181/211	178/184	-/-	219/233	147/147
155	84/98	361/361	369/369	264/284	94/94	230/240	216/218	258/270	176/176	163/187	117/117	160/160	177/177	180/180	156/178	181/211	178/184	148/148	219/219	145/147
156	98/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/240	218/218	258/258	-/-	163/187	117/126	160/168	175/177	180/180	156/178	181/211	184/184	148/148	219/233	-/-
157	84/98	361/361	369/369	284/284	94/98	230/240	218/218	258/270	-/-	163/187	117/117	160/168	175/177	180/180	156/156	181/181	178/184	148/174	219/219	-/-
160	84/98	361/373	357/369	264/284	-/-	230/230	218/218	258/270	154/176	163/187	117/126	160/168	177/177	180/182	156/156	181/181	178/184	148/148	219/219	147/147
163	84/98	361/373	369/369	284/284	94/98	230/240	216/218	258/270	154/176	163/163	117/126	160/168	175/177	180/180	156/178	181/211	178/184	148/174	219/233	-/-
164	98/98	361/373	369/369	264/284	94/98	230/240	218/218	258/258	154/176	163/187	117/126	160/168	175/177	180/182	156/178	181/181	184/184	148/174	219/233	145/147
165	84/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/240	216/218	-/-	154/176	163/187	117/117	160/168	175/177	180/180	156/178	181/211	184/184	148/174	219/233	145/147
166	98/98	361/373	369/369	284/284	94/98	230/230	218/218	258/258	154/176	163/163	117/117	160/168	175/177	180/180	156/178	181/211	184/184	148/174	219/219	147/147
168	84/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/240	218/218	258/270	154/176	163/163	117/126	160/160	175/177	180/182	156/178	181/211	178/184	148/174	219/233	-/-
169	98/98	361/373	-/-	-/-	94/94	230/230	216/218	258/258	-/-	163/163	117/126	160/168	177/177	180/182	156/178	181/181	184/184	-/-	219/233	147/147
170	98/98	361/361	369/369	284/284	94/94	230/240	218/218	258/258	154/176	163/163	117/126	160/168	177/177	180/180	156/178	181/181	184/184	148/148	219/219	-/-
171	98/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/230	216/218	258/258	176/176	163/187	117/117	160/160	177/177	180/180	156/156	181/211	184/184	148/148	219/219	-/-
172	98/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/230	216/218	258/258	154/176	163/163	117/117	160/168	175/177	180/180	156/178	181/211	184/184	148/148	219/219	147/147
173	98/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/240	218/218	258/258	176/176	163/163	117/117	160/160	177/177	180/182	156/156	181/181	178/184	148/148	219/219	147/147
174	98/98	361/361	369/369	284/284	94/98	230/240	218/218	258/258	154/176	163/187	117/117	160/168	175/177	180/182	156/156	181/181	178/184	148/148	219/219	147/147
175	98/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/240	216/218	258/258	176/176	163/163	-/-	160/160	177/177	180/180	156/156	181/211	184/184	148/148	219/233	147/147
176	98/98	361/373	357/369	264/284	94/94	230/230	218/218	258/258	176/176	163/187	117/126	160/160	177/177	180/182	156/178	181/181	178/184	148/148	219/233	147/147
177	84/98	361/361	357/369	264/284	-/-	230/230	216/218	258/270	154/176	163/187	117/126	160/168	175/177	180/180	-/-	181/211	178/184	148/174	219/219	145/147
178	84/98	361/361	357/369	264/284	94/98	230/230	218/218	258/270	154/176	163/163	117/126	160/168	175/177	180/182	156/156	181/181	178/184	148/174	219/219	147/147
179	84/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/240	216/218	258/270	176/176	163/187	117/117	160/160	177/177	180/180	156/156	181/211	184/184	148/148	219/233	145/147
180	98/98	361/361	357/369	264/284	94/94	230/240	218/218	258/258	176/176	163/187	117/117	160/160	177/177	180/182	156/178	181/211	178/184	148/148	219/233	145/147
181	98/98	361/373	369/369	284/284	94/98	230/230	216/218	-/-	154/176	163/163	117/117	160/168	175/177	180/182	156/178	181/181	184/184	148/174	219/219	-/-
182a	98/98	361/373	357/369	264/284	94/94	230/230	218/218	258/270	154/176	163/187	117/126	160/168	-/-	-/-	156/178	181/181	-/-	-/-	219/219	-/-
182b	84/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/230	218/218	258/270	154/176	163/187	117/126	160/168	177/177	180/180	156/178	181/211	184/184	148/148	219/219	-/-
184	84/98	361/373	369/369	284/284	94/98	230/230	218/218	258/270	-/-	163/163	117/117	160/160	175/177	180/180	156/156	181/211	184/184	148/174	219/233	-/-
185	98/98	361/373	369/369	284/284	94/98	230/240	218/218	258/258	176/176	163/187	117/126	160/160	175/177	180/182	156/178	181/181	184/184	148/174	219/233	145/147
186	84/98	361/361	369/369	284/284	94/94	230/230	218/218	258/270	176/176	163/187	117/126	160/160	177/177	180/180	156/178	181/211	178/184	148/148	219/219	145/147
187	98/98	361/361	357/369	264/284	94/94	230/230	218/218	258/258	-/-	163/187	117/117	160/168	177/177	180/180	156/178	181/211	178/184	148/148	219/219	145/147
188	84/98	361/361	357/369	264/284	94/94	230/240	218/218	258/270	154/176	163/187	117/117	160/168	177/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/148	219/233	145/147
189	98/98	361/373	357/369	264/284	94/94	230/240	216/218	258/258	176/176	163/163	117/126	160/160	177/177	180/180	156/156	181/211	178/184	148/148	219/219	147/147
191	98/98	361/361	357/369	264/284	94/98	230/230	218/218	258/258	176/176	163/187	117/117	160/160	175/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/174	219/219	145/147
192	98/98	361/373	-/-	-/-	94/98	230/230	218/218	258/258	-/-	163/163	-/-	-/-	175/177	180/180	156/178	181/211	184/184	148/174	219/219	145/147
193	84/98	361/361	-/-	-/-	94/94	230/230	218/218	258/270	176/176	163/187	117/126	160/160	177/177	180/180	156/178	181/181	184/184	-/-	219/219	147/147
201	84/98	361/373	-/-	264/284	-/-	230/240	216/218	258/270	-/-	163/187	117/117	160/168	177/177	180/182	156/178	181/211	178/184	148/148	219/219	145/147
202	84/98	361/361	357/369	264/284	-/-	230/240	218/218	258/270	-/-	163/187	117/126	160/168	177/177	180/180	156/156	181/211	184/184	-/-	219/233	-/-
204	84/98	361/373	357/369	264/284	-/-	230/230	218/218	258/270	-/-	163/163	117/117	160/160	175/177	180/180	156/156	181/211	178/184	148/174	219/219	-/-
206	98/98	361/373	357/369	264/284	94/94	230/230	218/218	258/258	-/-	163/163	117/126	160/168	177/177	180/182	156/178	181/181	178/184	148/148	219/233	147/147
208	98/98	361/373	357/369	-/-	-/-	230/240	216/218	258/258	176/176	163/187	117/117	160/160	177/177	180/182	156/178	181/181	184/184	148/148	219/219	147/147
210	98/98	361/373	369/369	284/284	-/-	230/230	218/218	258/258	154/176	163/163	117/126	160/168	175/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/174	219/233	-/-
212	84/98	361/361	-/-	-/-	94/98	230/240	216/218	258/270	176/176	163/163	117/117	160/160	175/177	180/182	156/156	181/181	178/184	148/174	219/233	145/147
213	98/98	361/361	369/369	284/284	94/98	230/240	-/-	258/258	154/176	163/187	117/117	160/168	175/177	180/182	156/156	181/181	178/184	148/174	219/233	145/147
214	98/98	361/361	357/369	264/284	94/94	230/240	216/218	258/258	154/176	163/163	117/117	160/168	177/177	180/182	156/178	181/181	178/184	148/148	219/233	145/147

269	84/98	361/373	369/369	284/284	94/98	230/230	216/218	258/270	154/176	163/163	117/126	160/168	175/177	180/182	156/178	181/181	178/184	148/174	219/219	147/147
270	98/98	361/373	357/369	264/284	94/94	230/230	216/218	258/258	176/176	163/163	117/117	160/160	177/177	180/182	156/156	-/-	-/-	148/148	219/219	145/147
271	84/98	361/373	369/369	284/284	94/98	230/240	216/218	258/270	176/176	163/187	117/117	160/160	-/-	-/-	156/156	181/211	178/184	148/174	219/219	145/147
272	84/98	361/361	357/369	264/284	94/94	230/240	216/218	258/270	176/176	163/187	117/117	160/160	177/177	180/182	156/178	181/181	178/184	148/148	219/233	147/147
273	98/98	361/361	357/369	264/284	94/98	230/240	216/218	258/258	176/176	163/187	117/117	160/160	175/177	180/182	156/156	-/-	-/-	148/174	219/219	145/147
274	84/98	361/361	357/369	264/284	94/98	230/240	216/218	258/270	154/176	163/163	117/117	160/168	175/177	180/182	156/178	181/181	184/184	148/174	219/233	145/147
276	-/-	-/-	369/369	284/284	94/94	230/230	216/218	258/258	176/176	163/187	117/126	160/160	177/177	180/180	156/156	181/181	184/184	148/148	219/219	145/147
277	98/98	361/361	357/369	264/284	94/98	230/240	-/-	258/258	-/-	163/187	117/117	160/160	175/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/174	219/233	145/147
278	98/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/240	218/218	258/258	176/176	163/187	117/126	160/160	177/177	180/182	156/156	181/181	178/184	148/148	219/233	147/147
281	98/98	361/361	357/369	264/284	94/98	230/240	216/218	258/258	154/176	163/187	117/117	160/168	175/177	180/182	156/178	181/181	184/184	148/174	219/233	147/147
282	84/98	361/373	357/369	264/284	94/94	230/230	216/218	258/270	176/176	163/163	117/117	160/160	177/177	180/182	156/178	181/181	184/184	148/148	219/219	147/147
284	84/98	361/373	369/369	284/284	94/98	230/230	216/218	258/270	176/176	163/187	117/126	160/160	175/177	180/180	156/178	181/211	178/184	148/174	219/219	145/147
285	84/98	361/361	357/369	264/284	94/98	230/240	218/218	258/270	176/176	163/187	117/117	160/160	175/177	180/182	156/178	181/181	178/184	148/148	219/219	145/147
286	84/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/240	216/218	258/258	154/176	163/187	117/117	160/168	175/177	180/180	156/156	-/-	-/-	148/174	219/219	147/147
287	84/98	361/361	369/369	284/284	94/98	230/230	216/218	258/270	176/176	163/187	117/117	160/160	175/177	180/180	156/156	181/211	184/184	148/174	219/219	145/147
288	84/98	361/361	369/369	284/284	94/98	230/230	216/218	258/270	154/176	163/163	117/117	160/168	175/177	180/180	156/156	181/181	-/-	148/174	219/233	145/147
289	98/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/240	216/218	258/258	176/176	163/187	117/117	160/160	177/177	180/182	156/178	-/-	-/-	148/148	219/219	147/147
291	84/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/240	216/218	258/270	154/176	-/-	117/126	160/168	175/177	180/182	156/178	181/181	-/-	148/174	219/219	147/147
292	98/98	361/373	357/369	264/284	94/98	230/230	216/218	258/258	-/-	163/187	117/117	160/168	175/177	180/180	156/156	181/211	178/184	148/174	219/219	147/147
SP	98/98	361/361	357/369	264/284	94/94	230/230	-/-	258/258	-/-	163/163	-/-	-/-	177/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/148	219/219	147/147
93b	84/98	361/361	357/369	264/284	94/94	230/230	-/-	258/270	154/176	163/187	117/117	160/168	177/177	180/180	156/156	181/211	184/184	148/148	219/219	145/147
98	-/-	-/-	369/369	264/284	94/98	230/240	-/-	258/270	176/176	163/187	117/126	160/160	175/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/174	219/233	147/147
115	98/98	361/373	357/369	264/284	94/94	230/240	-/-	258/258	154/176	163/187	117/117	160/168	177/177	180/182	156/178	181/181	178/184	148/148	219/233	147/147
121	-/-	-/-	357/369	264/284	94/94	230/240	216/218	258/270	154/176	163/187	117/117	160/168	177/177	180/182	156/178	181/181	184/184	148/148	219/219	147/147
143	84/98	361/361	369/369	284/284	94/98	230/240	-/-	258/270	176/176	163/187	117/117	-/-	175/177	180/182	156/156	181/181	184/184	148/174	219/219	147/147
99	84/98	361/373	369/369	284/284	94/98	230/240	218/218	258/270	176/176	163/187	117/117	160/160	175/177	180/182	156/156	-/-	-/-	148/174	219/219	145/147
100	84/98	361/373	369/369	284/284	94/94	230/240	218/218	258/270	176/176	163/163	117/126	160/160	177/177	180/180	156/156	-/-	-/-	148/148	219/219	145/147
211	84/98	361/373	357/369	264/284	94/94	230/240	218/218	258/270	176/176	163/187	117/126	160/160	177/177	180/180	156/156	181/181	-/-	148/148	219/219	147/147
198	84/98	361/361	369/369	284/284	94/94	230/230	218/218	258/270	154/176	163/187	117/117	160/168	177/177	180/180	156/178	181/181	-/-	148/148	219/219	145/147

Tabela 2. Continuação

Isolado	UDV024	VMCSH2	VvP18B32	p3_VvAGL11	VMC7B1	VVM63	VVIQ61	VVIC72	VVMD32	VVMD26	VVIP08	VVIN78	VMC2E10	VVIP60	VVIP37	VMCNG2E1	VMC8E8	VMC3G11	VVMD34
733-34	178/194	186/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/361	249/259	268/268	246/246	69/69	158/158	66/66	318/318	137/137	104/104	124/124	200/200	234/234
1103-88	194/194	188/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	259/259	252/268	246/248	65/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	168/200	234/242
1	178/194	188/188	254/268	194/194	212/212	300/304	357/361	249/259	252/268	246/248	65/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/104	124/124	200/200	234/242
2	178/194	186/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/361	249/259	252/268	246/246	65/69	156/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/242
3	178/194	188/188	-/-	178/194	212/240	300/304	357/357	259/259	268/268	246/248	65/69	158/158	66/66	314/318	137/137	104/110	124/128	168/200	234/234
5	194/194	188/188	254/268	194/194	-/-	300/304	357/361	259/259	252/268	246/246	65/69	156/158	50/66	318/318	133/137	104/104	124/124	200/200	234/234
6	194/194	186/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/361	249/259	252/268	246/246	69/69	156/158	50/66	318/318	-/-	104/104	124/124	200/200	234/234
7	178/194	186/188	254/268	194/194	212/212	300/304	357/357	259/259	268/268	246/246	69/69	158/158	50/66	318/318	-/-	104/104	124/124	200/200	234/234
8	178/194	188/188	268/268	194/194	-/-	300/304	357/357	249/259	268/268	246/248	65/69	158/158	50/66	314/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/242
9	178/194	186/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/361	259/259	268/268	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	137/137	104/110	124/124	168/200	234/234
10	194/194	186/188	268/268	178/194	212/212	300/304	357/361	259/259	252/268	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/242
11	194/194	188/188	254/268	194/194	212/212	304/304	357/357	249/259	252/268	246/248	69/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/104	124/128	168/200	234/242
13	178/194	-/-	268/268	194/194	212/240	304/304	357/361	249/259	268/268	246/248	65/69	156/158	66/66	-/-	137/137	104/104	124/128	200/200	234/242
15	178/194	-/-	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	249/259	252/268	246/248	69/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/242
16	178/194	188/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/357	249/259	268/268	246/246	65/69	158/158	66/66	318/318	137/137	104/110	124/124	168/200	234/242
17	194/194	186/188	254/268	178/194	212/212	300/304	357/361	259/259	252/268	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	-/-	104/110	124/124	200/200	234/242
18	194/194	186/188	268/268	194/194	-/-	-/-	357/357	249/259	268/268	246/248	69/69	156/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/242
19	194/194	186/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/357	249/259	268/268	246/248	65/69	158/158	50/66	314/318	-/-	104/110	124/124	200/200	234/234
20	178/194	188/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/357	259/259	268/268	246/248	69/69	158/158	66/66	314/318	137/137	104/110	124/128	168/200	234/234
21	194/194	188/188	268/268	178/194	212/240	300/304	357/357	249/259	-/-	246/248	69/69	158/158	66/66	314/318	133/137	104/104	124/128	168/200	234/242
22	194/194	188/188	254/268	194/194	212/240	304/304	357/357	249/259	-/-	246/246	65/69	156/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/242
23	178/194	186/188	268/268	178/194	212/212	304/304	357/361	249/259	-/-	246/246	69/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	168/200	234/234
25	194/194	188/188	268/268	178/194	212/240	300/304	357/357	249/259	268/268	246/246	69/69	158/158	50/66	318/318	137/137	104/104	124/124	200/200	234/234
26	178/194	-/-	254/268	178/194	212/212	300/304	357/357	259/259	268/268	246/248	65/69	158/158	50/66	314/318	137/137	104/104	124/124	200/200	234/234
27	194/194	186/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/361	259/259	268/268	246/248	65/69	156/158	50/66	314/318	137/137	104/104	124/128	200/200	234/234
28	178/194	-/-	268/268	178/194	212/240	300/304	357/357	259/259	-/-	246/246	65/69	156/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/242
29	194/194	186/188	254/268	194/194	212/240	304/304	357/357	259/259	-/-	246/246	69/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/234
30	178/194	186/188	254/268	194/194	212/240	304/304	357/361	249/259	268/268	246/246	69/69	156/158	50/66	318/318	137/137	104/104	124/124	168/200	234/242
31	178/194	188/188	268/268	178/194	212/240	304/304	357/357	259/259	268/268	246/246	69/69	156/158	66/66	318/318	137/137	104/104	124/124	200/200	234/242
32	194/194	188/188	254/268	194/194	212/240	304/304	357/357	249/259	252/268	246/248	69/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	168/200	234/234
33	194/194	188/188	268/268	178/194	212/240	300/304	357/357	249/259	268/268	246/248	65/69	158/158	66/66	314/318	137/137	104/110	124/128	200/200	234/234
34	178/194	186/188	268/268	178/194	212/240	300/304	357/357	259/259	268/268	246/246	65/69	158/158	66/66	318/318	-/-	104/104	124/124	200/200	234/242
35	194/194	186/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	259/259	268/268	246/248	69/69	156/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/242
36	194/194	188/188	254/268	194/194	212/212	300/304	357/357	259/259	252/268	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/104	124/128	200/200	234/234
37	194/194	188/188	268/268	178/194	212/212	304/304	357/357	259/259	252/268	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	168/200	234/242
38a	194/194	188/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/357	259/259	252/268	246/248	65/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/242
38b	178/194	186/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/361	259/259	252/268	246/248	69/69	156/158	50/66	314/318	137/137	104/110	124/128	168/200	234/234
39	178/194	-/-	268/268	194/194	212/240	300/304	357/361	249/259	-/-	246/248	69/69	156/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/242
40	178/194	-/-	254/268	194/194	212/212	304/304	357/357	259/259	252/268	246/248	69/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/242
41	178/194	186/188	254/268	194/194	212/212	304/304	357/357	259/259	268/268	246/248	65/69	158/158	66/66	314/318	137/137	104/110	124/128	168/200	234/234
42	178/194	186/188	268/268	178/194	212/240	300/304	357/361	259/259	252/268	246/246	69/69	156/158	-/-	318/318	133/137	104/104	124/128	200/200	234/234
43	178/194	188/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/361	249/259	252/268	246/248	65/69	158/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/234

44	194/194	188/188	254/268	194/194	212/240	300/304	357/357	259/259	-/-	246/248	65/69	156/158	50/66	314/318	-/-	104/104	124/128	200/200	234/234
45	194/194	188/188	-/-	178/194	212/240	300/304	357/361	259/259	268/268	246/248	69/69	156/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/234
46	194/194	188/188	254/268	194/194	212/240	304/304	357/361	259/259	268/268	246/246	65/69	156/158	66/66	318/318	137/137	104/104	124/124	200/200	234/234
47	194/194	188/188	268/268	178/194	212/240	304/304	357/361	249/259	252/268	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	-/-	104/104	124/124	168/200	234/234
48	194/194	186/188	268/268	178/194	212/240	304/304	357/361	249/259	268/268	246/246	69/69	156/158	50/66	318/318	137/137	104/110	124/124	168/200	234/234
49	178/194	188/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/361	249/259	268/268	246/246	69/69	156/158	66/66	318/318	137/137	104/110	124/124	168/200	234/234
50	194/194	188/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/357	249/259	-/-	246/246	65/69	158/158	66/66	318/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/242
51	194/194	186/188	268/268	178/194	212/240	304/304	357/361	249/259	-/-	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	168/200	234/242
52	178/194	188/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/361	259/259	-/-	246/246	69/69	156/158	66/66	318/318	-/-	-/-	124/124	168/200	234/242
53	178/194	186/188	268/268	178/194	-/-	-/-	-/-	249/259	-/-	246/246	65/69	156/158	66/66	318/318	133/137	104/104	124/124	200/200	234/242
54	194/194	188/188	268/268	178/194	212/212	300/304	357/357	249/259	-/-	246/248	65/69	156/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/128	200/200	234/234
55	178/194	186/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	249/259	268/268	246/246	69/69	-/-	50/66	318/318	137/137	104/104	124/124	200/200	234/242
56	194/194	188/188	268/268	178/194	212/212	304/304	357/361	259/259	252/268	246/246	69/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/242
57	194/194	188/188	254/268	194/194	212/212	300/304	357/357	259/259	-/-	246/248	65/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	168/200	234/242
58	178/194	186/188	254/268	194/194	212/212	300/304	357/361	259/259	268/268	246/248	69/69	158/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/128	200/200	234/234
59	194/194	188/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/361	249/259	-/-	246/248	69/69	156/158	66/66	314/318	137/137	104/110	124/128	200/200	234/242
60	178/194	186/188	254/268	178/194	212/212	304/304	357/357	249/259	268/268	246/248	69/69	158/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/124	200/200	234/242
61	178/194	188/188	254/268	194/194	212/212	300/304	357/361	249/259	252/268	246/246	69/69	158/158	50/66	318/318	-/-	104/104	124/124	200/200	234/234
62	178/194	186/188	254/268	194/194	212/212	300/304	357/357	259/259	-/-	246/246	69/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	168/200	-/-
63	194/194	-/-	268/268	194/194	212/240	300/304	357/357	249/259	-/-	246/248	69/69	158/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/124	200/200	234/234
64	194/194	188/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	259/259	-/-	246/248	69/69	158/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	168/200	234/242
65	194/194	188/188	254/268	194/194	-/-	-/-	-/-	249/259	-/-	246/246	69/69	158/158	50/66	314/318	133/137	104/104	124/124	200/200	234/234
66	178/194	188/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/357	249/259	268/268	246/246	65/69	156/158	66/66	318/318	137/137	104/104	124/124	200/200	234/234
67	194/194	186/188	268/268	178/194	212/240	304/304	357/357	259/259	252/268	246/248	65/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/234
70	194/194	188/188	268/268	178/194	212/212	304/304	357/357	249/259	-/-	246/246	69/69	156/158	66/66	318/318	137/137	104/104	124/128	200/200	234/242
71	178/194	188/188	268/268	178/194	212/240	300/304	357/361	259/259	-/-	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/234
72	194/194	186/188	254/268	194/194	212/240	304/304	357/361	249/259	-/-	246/246	65/69	158/158	66/66	318/318	137/137	104/110	124/124	168/200	234/234
73	194/194	188/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/357	249/259	-/-	246/246	65/69	156/158	50/66	318/318	137/137	104/104	124/124	200/200	234/242
74	194/194	188/188	254/268	194/194	212/240	300/304	357/357	249/259	252/268	246/246	69/69	156/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/242
75	194/194	186/188	254/268	194/194	212/212	300/304	357/361	259/259	268/268	246/248	65/69	158/158	50/66	314/318	137/137	104/104	124/128	200/200	234/242
76	178/194	-/-	254/268	194/194	212/212	304/304	357/361	249/259	268/268	246/248	65/69	156/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/128	168/200	-/-
77	178/194	186/188	254/268	178/194	212/212	300/304	357/361	259/259	268/268	246/248	65/69	156/158	50/66	314/318	137/137	104/104	124/124	168/200	234/242
78	178/194	-/-	268/268	194/194	212/240	304/304	357/357	249/259	268/268	246/248	65/69	158/158	50/66	314/318	137/137	104/104	124/128	200/200	234/242
79	178/194	186/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/361	249/259	268/268	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	137/137	104/110	124/124	168/200	234/242
80	194/194	186/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/361	249/259	252/268	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/104	124/124	168/200	234/242
82	178/194	186/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/357	259/259	-/-	246/248	65/69	158/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/124	168/200	234/242
84	194/194	188/188	268/268	178/194	212/240	304/304	357/357	259/259	252/268	246/246	65/69	156/158	50/66	318/318	-/-	104/110	124/124	200/200	234/242
85a	194/194	188/188	268/268	178/194	212/212	304/304	357/361	259/259	252/268	246/248	65/69	156/158	50/66	314/318	-/-	104/110	124/124	200/200	234/242
85b	178/194	186/188	254/268	194/194	212/212	300/304	357/357	259/259	268/268	246/248	65/69	156/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/124	168/200	234/234
86	194/194	188/188	254/268	178/194	212/212	300/304	357/357	259/259	268/268	246/248	65/69	158/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/234
87	194/194	186/188	254/268	178/194	212/212	300/304	357/361	259/259	268/268	246/246	65/69	156/158	66/66	318/318	137/137	104/104	124/124	168/200	234/242
88	194/194	188/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/357	259/259	-/-	246/248	65/69	158/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/128	200/200	234/234
89	178/194	-/-	254/268	178/194	212/240	300/304	357/357	259/259	268/268	246/248	65/69	158/158	50/66	314/318	137/137	104/104	124/128	200/200	-/-
90	194/194	188/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/357	259/259	252/268	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/234
92b	178/194	188/188	254/268	178/194	212/212	300/304	357/357	259/259	252/268	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/242
93a	178/194	188/188	268/268	178/194	212/212	304/304	357/357	249/259	-/-	246/246	65/69	-/-	50/66	318/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/242
94	194/194	188/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/357	259/259	268/268	246/246	69/69	158/158	50/66	-/-	-/-	104/104	124/124	200/200	234/234

95	194/194	188/188	-/-	178/194	212/240	304/304	357/357	259/259	268/268	246/248	69/69	158/158	66/66	-/-	137/137	104/104	124/128	200/200	234/242
96	178/194	186/188	254/268	194/194	212/240	300/304	357/357	249/259	252/268	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/234
97	194/194	186/188	254/268	194/194	212/240	304/304	357/357	249/259	252/268	246/246	69/69	158/158	50/66	318/318	137/137	104/104	124/124	168/200	234/234
101	178/194	188/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/357	259/259	252/268	246/246	69/69	156/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/128	168/200	-/-
103	178/194	186/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/357	259/259	252/268	-/-	69/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/234
104	178/194	188/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	249/259	252/268	246/246	65/69	158/158	66/66	318/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/242
105	178/194	-/-	268/268	194/194	212/240	300/304	357/361	259/259	252/268	-/-	69/69	156/158	66/66	314/318	133/137	104/110	124/128	168/200	234/234
106	178/194	-/-	254/268	178/194	212/212	300/304	357/357	249/259	252/268	246/248	65/69	158/158	66/66	314/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/242
107	194/194	188/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/357	259/259	268/268	246/248	69/69	158/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/242
108	194/194	188/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	249/259	252/268	246/248	65/69	156/158	66/66	314/318	133/137	-/-	124/128	168/200	234/234
109	194/194	188/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/357	249/259	268/268	246/248	69/69	158/158	50/66	314/318	137/137	104/110	124/128	200/200	234/242
110	178/194	186/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/361	259/259	252/268	246/246	65/69	156/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/234
111	178/194	188/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/357	249/259	252/268	246/248	69/69	158/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	168/200	234/242
112	178/194	186/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/361	249/259	252/268	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/234
113	178/194	186/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/357	249/259	252/268	246/248	65/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/104	124/128	200/200	234/234
114	194/194	186/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	259/259	268/268	-/-	65/69	156/158	66/66	314/318	137/137	104/110	124/128	168/200	234/234
116	178/194	-/-	268/268	194/194	212/212	300/304	357/357	259/259	252/268	-/-	69/69	158/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/124	168/200	234/234
117	178/194	186/188	254/268	178/194	212/212	300/304	357/361	249/259	252/268	246/248	69/69	156/158	66/66	314/318	133/137	104/104	124/128	168/200	234/242
118	178/194	186/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/357	249/259	268/268	246/248	65/69	158/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/128	200/200	234/242
119	178/194	188/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/361	249/259	252/268	246/246	65/69	156/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/242
120	178/194	-/-	268/268	194/194	212/212	300/304	357/361	249/259	268/268	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	137/137	104/104	124/124	168/200	234/234
123	178/194	188/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/357	249/259	252/268	246/246	69/69	158/158	66/66	318/318	133/137	104/110	-/-	-/-	234/234
124	194/194	188/188	268/268	178/194	212/240	300/304	357/361	259/259	252/268	246/248	65/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/104	124/124	200/200	234/234
126	178/194	-/-	254/268	178/194	212/212	300/304	357/361	259/259	252/268	-/-	65/69	156/158	66/66	314/318	133/137	104/104	-/-	200/200	234/234
127	178/194	-/-	268/268	194/194	212/240	304/304	357/357	259/259	268/268	246/246	69/69	156/158	66/66	318/318	-/-	104/104	124/124	168/200	234/242
128	178/194	188/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/361	249/259	252/268	246/246	69/69	158/158	66/66	318/318	133/137	104/104	124/128	200/200	234/234
129	194/194	188/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/361	249/259	252/268	-/-	69/69	156/158	66/66	318/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/234
130	178/194	186/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/361	249/259	252/268	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/104	124/124	168/200	234/242
131	178/194	186/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/357	249/259	268/268	246/248	69/69	158/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/242
132	178/194	186/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/357	259/259	268/268	246/246	65/69	156/158	66/66	318/318	137/137	104/104	124/124	168/200	234/234
133	178/194	-/-	268/268	194/194	212/212	300/304	357/361	249/259	252/268	-/-	69/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/234
134	178/194	186/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/361	259/259	268/268	246/248	69/69	156/158	50/66	314/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/234
135	178/194	188/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/361	249/259	252/268	246/248	65/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/104	124/128	168/200	234/242
136	178/194	188/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/357	259/259	252/268	246/246	69/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/104	124/124	168/200	234/234
137	194/194	188/188	-/-	194/194	212/240	300/304	357/361	249/259	252/268	246/248	65/69	158/158	50/66	314/318	133/137	104/110	128/128	200/200	234/234
138	178/194	188/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/357	249/259	252/268	246/246	65/69	158/158	66/66	318/318	133/137	104/110	-/-	168/200	234/234
139	178/194	188/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/361	249/259	252/268	246/248	65/69	158/158	66/66	314/318	133/137	104/110	128/128	200/200	234/234
140a	194/194	186/188	254/268	178/194	-/-	304/304	357/357	259/259	268/268	-/-	65/69	156/158	50/66	318/318	137/137	104/104	124/124	168/200	234/234
140b	194/194	188/188	254/268	178/194	212/212	300/304	357/361	249/259	268/268	-/-	65/69	156/158	50/66	314/318	137/137	104/110	124/128	-/-	234/242
141	194/194	188/188	254/268	178/194	-/-	304/304	357/361	259/259	268/268	246/248	65/69	158/158	50/66	314/318	137/137	104/110	124/128	200/200	-/-
142	178/194	186/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/361	259/259	268/268	246/248	65/69	158/158	50/66	314/318	137/137	104/104	124/128	200/200	234/234
144	194/194	186/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/361	249/259	268/268	246/246	69/69	-/-	66/66	318/318	-/-	104/104	-/-	168/200	234/234
145	178/194	186/188	254/268	178/194	212/212	300/304	357/357	249/259	252/268	246/246	65/69	-/-	50/66	318/318	133/137	104/104	124/124	168/200	234/234
146	194/194	186/188	254/268	178/194	212/212	300/304	357/361	249/259	268/268	246/248	65/69	156/158	66/66	314/318	137/137	104/104	128/128	200/200	234/242
147	178/194	186/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/361	249/259	268/268	246/248	69/69	156/158	50/66	314/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/234
148	178/194	186/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/361	259/259	252/268	246/246	69/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	168/200	234/234
149	178/194	186/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/357	249/259	268/268	246/246	65/69	156/158	66/66	318/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/234

150	194/194	186/188	268/268	194/194	-/-	300/304	357/361	249/259	-/-	246/248	69/69	158/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/242
151	194/194	188/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/357	259/259	252/268	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	-/-	104/110	124/128	200/200	-/-
152	194/194	188/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/357	249/259	268/268	246/246	69/69	156/158	50/66	318/318	137/137	104/104	-/-	-/-	-/-
153	178/194	186/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	249/259	252/268	246/246	65/69	-/-	66/66	318/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/234
154	194/194	186/188	254/268	178/194	212/212	300/304	357/361	259/259	268/268	246/246	69/69	158/158	66/66	318/318	133/137	104/104	124/124	168/200	234/242
155	194/194	186/188	254/268	178/194	212/212	300/304	357/357	259/259	268/268	246/246	65/69	156/158	50/66	318/318	137/137	104/104	124/124	200/200	234/234
156	194/194	186/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/361	259/259	252/268	-/-	65/69	-/-	66/66	318/318	133/137	104/104	124/124	200/200	234/242
157	178/194	186/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/357	249/259	252/268	-/-	65/69	-/-	50/66	314/318	133/137	104/104	-/-	200/200	234/242
160	178/194	-/-	268/268	194/194	212/240	304/304	357/361	259/259	252/268	246/248	65/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	168/200	234/234
163	178/194	186/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/357	249/259	268/268	-/-	65/69	156/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/128	200/200	234/242
164	178/194	186/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/357	249/259	252/268	246/248	69/69	158/158	66/66	314/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/234
165	194/194	186/188	254/268	178/194	212/212	300/304	357/361	249/259	252/268	246/246	69/69	156/158	66/66	318/318	133/137	104/110	124/124	168/200	234/242
166	178/194	188/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/357	249/259	252/268	246/246	65/69	158/158	66/66	318/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/242
168	194/194	186/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/357	249/259	268/268	-/-	65/69	158/158	50/66	314/318	137/137	104/104	124/128	200/200	234/242
169	194/194	186/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/357	259/259	268/268	246/246	65/69	156/158	50/66	318/318	137/137	104/104	124/124	200/200	234/234
170	178/194	186/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/357	259/259	252/268	-/-	65/69	158/158	66/66	318/318	133/137	104/104	124/128	200/200	234/234
171	194/194	186/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/361	259/259	252/268	-/-	65/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/104	124/124	200/200	234/234
172	178/194	186/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/357	259/259	252/268	246/246	69/69	156/158	66/66	318/318	133/137	104/104	124/124	200/200	234/242
173	194/194	188/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/357	259/259	252/268	246/246	65/69	158/158	66/66	318/318	133/137	104/104	124/128	200/200	234/242
174	194/194	188/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	259/259	252/268	246/248	69/69	156/158	66/66	314/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/234
175	194/194	186/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/357	259/259	268/268	246/248	69/69	156/158	50/66	314/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/242
176	178/194	186/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/361	259/259	252/268	246/246	69/69	158/158	66/66	318/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/234
177	178/194	188/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/361	249/259	268/268	246/248	65/69	156/158	66/66	314/318	137/137	104/110	124/128	168/200	234/242
178	178/194	186/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	249/259	252/268	246/248	69/69	158/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	168/200	234/234
179	178/194	186/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/357	259/259	252/268	246/246	65/69	156/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	168/200	234/234
180	178/194	188/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/361	259/259	268/268	246/248	69/69	158/158	50/66	314/318	137/137	104/110	124/128	168/200	234/234
181	178/194	-/-	254/268	178/194	212/212	304/304	357/357	249/259	252/268	-/-	69/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/110	-/-	200/200	234/242
182a	194/194	186/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/361	259/259	252/268	-/-	65/69	158/158	66/66	314/318	133/137	104/110	124/124	-/-	234/234
182b	178/194	186/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/357	259/259	252/268	-/-	69/69	158/158	50/66	314/318	137/137	104/110	124/128	168/200	234/234
184	178/194	-/-	268/268	194/194	212/240	300/304	357/357	249/259	252/268	-/-	69/69	158/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	168/200	234/242
185	178/194	186/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	249/259	268/268	246/248	69/69	156/158	50/66	314/318	137/137	104/104	124/128	200/200	234/242
186	178/194	188/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/357	259/259	268/268	246/248	69/69	158/158	66/66	314/318	137/137	104/110	124/124	200/200	234/242
187	178/194	-/-	268/268	194/194	212/240	300/304	357/361	259/259	268/268	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	137/137	104/104	124/124	200/200	234/234
188	178/194	-/-	268/268	194/194	212/212	304/304	357/361	259/259	252/268	246/248	69/69	156/158	66/66	314/318	137/137	104/110	124/128	168/200	234/234
189	194/194	186/188	254/268	178/194	212/212	300/304	357/361	259/259	252/268	246/248	69/69	156/158	66/66	314/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/234
191	178/194	188/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/361	249/259	268/268	246/246	69/69	158/158	50/66	318/318	137/137	104/104	124/124	200/200	234/234
192	178/194	186/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/361	-/-	252/268	246/248	65/69	158/158	50/66	314/318	133/137	104/104	-/-	200/200	234/242
193	194/194	186/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	-/-	252/268	246/248	69/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/242
201	178/194	-/-	254/268	178/194	212/212	300/304	357/361	259/259	268/268	246/246	69/69	-/-	50/66	318/318	137/137	104/110	124/124	168/200	234/242
202	178/194	-/-	268/268	194/194	212/240	300/304	357/361	259/259	252/268	-/-	65/69	-/-	50/66	-/-	133/137	104/110	124/124	200/200	234/242
204	178/194	-/-	268/268	194/194	212/212	300/304	357/361	249/259	252/268	-/-	65/69	158/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	168/200	234/242
206	178/194	186/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/361	259/259	268/268	246/246	65/69	156/158	50/66	318/318	137/137	104/110	124/128	200/200	234/234
208	178/194	188/188	254/268	178/194	212/212	304/304	357/361	259/259	268/268	246/248	69/69	158/158	50/66	314/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/234
210	178/194	186/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/357	249/259	252/268	-/-	69/69	156/158	-/-	318/318	133/137	104/104	124/128	168/200	234/234
212	178/194	186/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/361	249/259	268/268	246/248	65/69	158/158	66/66	314/318	-/-	104/110	124/128	168/200	234/242
213	178/194	-/-	268/268	194/194	212/240	304/304	357/357	249/259	268/268	246/246	65/69	156/158	66/66	318/318	-/-	104/104	124/124	168/200	234/234
214	178/194	186/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	259/259	252/268	246/246	69/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/234

215	178/194	188/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/361	249/259	-/-	246/246	69/69	-/-	66/66	318/318	-/-	104/104	124/124	168/200	234/242
216	194/194	186/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/357	249/259	268/268	246/246	69/69	158/158	66/66	318/318	137/137	104/104	124/124	200/200	234/242
218	194/194	186/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/361	259/259	252/268	246/248	65/69	158/158	50/66	314/318	-/-	104/110	124/128	200/200	234/242
219	178/194	188/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/357	249/259	252/268	246/246	69/69	156/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	168/200	234/242
220	194/194	186/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/357	249/259	268/268	246/246	69/69	156/158	66/66	318/318	137/137	104/104	124/124	168/200	234/234
221	178/194	186/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/361	249/259	252/268	246/246	69/69	158/158	50/66	318/318	-/-	104/110	124/124	200/200	234/234
222	178/194	186/188	-/-	194/194	212/240	304/304	357/357	249/259	268/268	246/248	65/69	158/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/242
224	194/194	188/188	254/268	178/194	-/-	-/-	-/-	249/259	-/-	246/248	69/69	156/158	50/66	314/318	137/137	104/110	124/128	200/200	234/234
225	178/194	-/-	254/268	178/194	212/240	300/304	357/357	249/259	268/268	246/248	69/69	156/158	66/66	314/318	-/-	104/104	124/128	200/200	234/242
226	194/194	186/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	249/259	252/268	246/248	65/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/124	168/200	234/242
227	194/194	-/-	268/268	194/194	212/240	300/304	357/361	249/259	252/268	246/246	65/69	156/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	168/200	234/242
228	194/194	186/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/357	249/259	-/-	246/248	69/69	156/158	66/66	-/-	-/-	104/110	124/128	168/200	234/242
229	194/194	186/188	254/268	178/194	212/212	304/304	357/361	249/259	268/268	246/248	69/69	156/158	66/66	314/318	137/137	104/104	128/128	168/200	234/242
230	178/194	188/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/361	249/259	252/268	246/246	69/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/104	124/124	200/200	234/234
231	178/194	188/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/361	249/259	-/-	246/246	69/69	158/158	50/66	318/318	137/137	104/110	124/124	168/200	234/242
232	194/194	186/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/361	259/259	-/-	246/246	65/69	156/158	66/66	318/318	133/137	104/104	124/124	200/200	234/242
233	178/194	188/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/357	259/259	-/-	246/246	65/69	156/158	50/66	318/318	-/-	104/110	124/128	168/200	234/234
234	-/-	186/188	268/268	194/194	-/-	-/-	-/-	249/259	268/268	246/246	69/69	158/158	66/66	318/318	137/137	104/104	-/-	168/200	234/242
235	194/194	-/-	254/268	178/194	212/212	300/304	357/357	249/259	-/-	246/248	65/69	156/158	66/66	314/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/242
236	194/194	186/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/357	249/259	-/-	246/246	65/69	156/158	50/66	318/318	133/137	104/104	124/124	200/200	234/234
237	178/194	188/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	249/259	268/268	246/246	69/69	158/158	66/66	318/318	137/137	104/104	124/124	168/200	234/242
239	178/194	-/-	268/268	194/194	212/240	304/304	357/357	259/259	252/268	246/248	65/69	158/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	168/200	234/234
240	194/194	186/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/357	259/259	268/268	246/246	65/69	158/158	66/66	318/318	137/137	104/110	124/124	200/200	234/242
242	194/194	-/-	254/268	178/194	212/212	300/304	357/357	249/259	252/268	246/248	69/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	168/200	234/242
243	178/194	186/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/361	249/259	252/268	246/246	69/69	156/158	50/66	318/318	-/-	104/110	124/128	200/200	234/242
245	194/194	188/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	249/259	268/268	246/246	69/69	158/158	66/66	318/318	137/137	104/110	124/124	200/200	234/242
246	194/194	186/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/361	249/259	252/268	246/246	69/69	156/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/242
247	194/194	186/188	254/268	178/194	212/212	304/304	357/361	249/259	268/268	246/246	65/69	158/158	66/66	318/318	-/-	104/104	124/128	200/200	234/242
248	178/194	188/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	259/259	268/268	246/248	65/69	156/158	66/66	314/318	137/137	104/110	124/128	168/200	234/242
249	194/194	-/-	254/268	178/194	212/240	304/304	357/361	259/259	268/268	246/248	69/69	158/158	66/66	314/318	137/137	-/-	124/124	200/200	234/234
250	178/194	188/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/361	249/259	268/268	246/248	65/69	158/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/124	200/200	234/242
251	194/194	186/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/357	249/259	-/-	246/248	65/69	-/-	66/66	314/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/242
252	178/194	-/-	254/268	178/194	212/240	304/304	357/357	259/259	268/268	246/246	69/69	-/-	50/66	318/318	137/137	104/110	124/128	168/200	234/234
253	194/194	186/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/357	249/259	252/268	246/248	65/69	156/158	50/66	314/318	-/-	104/110	124/128	200/200	234/234
255	194/194	186/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/361	249/259	252/268	246/248	69/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	168/200	234/242
256	178/194	188/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/357	249/259	268/268	246/246	65/69	-/-	66/66	318/318	137/137	104/104	124/124	168/200	234/234
257	194/194	186/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	259/259	252/268	246/248	69/69	-/-	50/66	314/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/234
258	178/194	186/188	254/268	178/194	212/212	300/304	357/357	249/259	268/268	246/248	69/69	158/158	66/66	314/318	-/-	104/110	124/128	200/200	234/242
259	178/194	188/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/361	259/259	252/268	246/246	69/69	156/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	168/200	234/234
260	178/194	188/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/357	259/259	268/268	246/246	65/69	156/158	66/66	318/318	-/-	104/104	124/124	168/200	234/234
261	178/194	186/188	254/268	178/194	212/212	304/304	357/357	259/259	268/268	246/246	69/69	156/158	66/66	318/318	137/137	104/104	124/128	200/200	234/242
262	178/194	188/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/361	259/259	252/268	246/248	65/69	156/158	50/66	314/318	137/137	104/110	124/128	200/200	234/234
263	194/194	186/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	249/259	252/268	246/246	69/69	156/158	-/-	318/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/242
265	178/194	-/-	254/268	178/194	212/240	300/304	357/357	259/259	252/268	246/248	65/69	-/-	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/242
266	194/194	186/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/361	259/259	-/-	246/248	65/69	-/-	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	168/200	234/242
267	194/194	186/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/357	249/259	268/268	246/246	65/69	158/158	66/66	318/318	137/137	104/104	124/124	168/200	234/242
268	178/194	188/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/361	259/259	268/268	246/248	65/69	158/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/124	200/200	234/242

269	194/194	186/188	254/268	178/194	212/212	304/304	357/361	249/259	268/268	246/246	69/69	-/-	66/66	318/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/242
270	194/194	188/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/361	259/259	268/268	246/246	69/69	-/-	66/66	318/318	137/137	104/104	124/124	168/200	234/242
271	194/194	186/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/357	249/259	252/268	246/246	65/69	158/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	-/-	234/242
272	178/194	188/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/361	259/259	268/268	246/248	65/69	156/158	50/66	314/318	-/-	104/104	124/128	200/200	234/242
273	178/194	188/188	254/268	178/194	212/212	304/304	357/361	249/259	268/268	246/246	65/69	158/158	66/66	318/318	137/137	104/104	124/128	200/200	234/242
274	194/194	188/188	254/268	178/194	212/212	304/304	357/361	249/259	268/268	246/246	65/69	156/158	66/66	318/318	133/137	104/104	124/124	200/200	234/234
276	178/194	-/-	254/268	178/194	212/240	300/304	357/357	259/259	268/268	246/246	65/69	156/158	66/66	318/318	133/137	104/104	124/124	200/200	234/242
277	178/194	188/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/361	249/259	252/268	246/248	65/69	156/158	-/-	314/318	133/137	104/104	124/128	168/200	234/242
278	194/194	188/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	259/259	252/268	246/248	69/69	158/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/234
281	194/194	186/188	268/268	194/194	-/-	-/-	-/-	249/259	252/268	246/248	65/69	156/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/124	168/200	234/242
282	178/194	188/188	254/268	178/194	212/240	304/304	357/361	259/259	252/268	246/246	69/69	156/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/234
284	194/194	186/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/357	249/259	252/268	246/248	65/69	158/158	50/66	314/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/242
285	178/194	188/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/361	259/259	268/268	246/246	69/69	158/158	66/66	318/318	137/137	104/110	124/128	168/200	234/234
286	194/194	188/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/361	249/259	268/268	246/248	65/69	158/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/234
287	194/194	188/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/357	249/259	268/268	246/248	65/69	158/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/128	168/200	234/234
288	178/194	186/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/357	249/259	252/268	246/246	65/69	156/158	50/66	318/318	-/-	104/110	124/124	168/200	234/234
289	178/194	188/188	268/268	194/194	212/212	304/304	357/357	259/259	268/268	246/248	69/69	156/158	50/66	314/318	-/-	104/110	124/128	168/200	234/234
291	178/194	188/188	254/268	178/194	212/212	304/304	357/361	249/259	268/268	246/246	69/69	156/158	50/66	318/318	137/137	104/110	124/124	200/200	-/-
292	178/194	188/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/361	249/259	252/268	246/246	69/69	158/158	-/-	318/318	133/137	104/110	124/128	168/200	234/234
SP	178/194	188/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/361	259/259	268/268	246/248	69/69	156/158	66/66	314/318	137/137	-/-	124/128	200/200	234/234
93b	194/194	188/188	268/268	194/194	212/240	300/304	357/361	259/259	268/268	246/246	69/69	156/158	50/66	318/318	-/-	104/110	124/124	200/200	234/242
98	194/194	186/188	254/268	178/194	-/-	-/-	-/-	249/259	252/268	246/246	69/69	158/158	50/66	318/318	-/-	104/104	124/124	168/200	234/242
115	178/194	188/188	268/268	194/194	-/-	-/-	-/-	259/259	252/268	246/246	69/69	156/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/128	200/200	234/242
121	178/194	-/-	268/268	194/194	-/-	-/-	-/-	259/259	268/268	246/248	65/69	156/158	66/66	314/318	137/137	104/104	124/128	200/200	234/242
143	194/194	188/188	268/268	194/194	212/240	304/304	357/357	249/259	252/268	246/246	65/69	156/158	50/66	-/-	-/-	104/110	124/124	200/200	234/234
99	194/194	186/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/357	249/259	252/268	246/246	69/69	156/158	50/66	318/318	133/137	104/110	124/124	200/200	234/242
100	178/194	186/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/357	259/259	268/268	246/246	69/69	156/158	66/66	318/318	137/137	104/104	124/124	168/200	234/234
211	178/194	188/188	268/268	194/194	212/212	300/304	357/361	259/259	268/268	246/248	65/69	156/158	66/66	314/318	-/-	104/110	124/124	168/200	234/234
198	178/194	186/188	254/268	178/194	212/240	300/304	357/357	259/259	268/268	246/246	65/69	156/158	66/66	318/318	137/137	104/110	124/124	200/200	234/242

Tabela 2. Continuação

Isolado	VMC2F12	VVIQ32	VVIN75
733-34	191/191	101/101	182/182
1103-			
88	191/229	99/101	182/188
1	-/-	101/101	182/188
2	191/229	99/101	182/188
3	191/191	99/101	182/182
5	191/191	101/101	182/188
6	191/191	99/101	182/188
7	191/229	101/101	182/182
8	191/229	101/101	182/182
9	191/191	99/101	182/182
10	191/191	99/101	182/188
11	191/229	101/101	182/182
13	191/191	101/101	182/182
15	191/191	101/101	182/188
16	191/229	99/101	182/182
17	191/191	99/101	182/188
18	191/191	99/101	182/182
19	191/229	99/101	182/188
20	191/191	99/101	182/182
21	191/229	99/101	182/182
22	191/191	99/101	182/188
23	191/229	99/101	182/188
25	191/191	101/101	182/182
26	191/191	101/101	182/182
27	-/-	101/101	182/182
28	191/229	99/101	182/188
29	191/191	99/101	182/188
30	191/229	99/101	182/182
31	191/191	101/101	182/182
32	191/191	101/101	182/188
33	191/191	99/101	182/188
34	191/191	101/101	182/182
35	191/191	99/101	182/182
36	191/191	101/101	182/188
37	191/191	99/101	182/188
38a	191/229	99/101	182/188
38b	191/191	99/101	182/188
39	191/229	101/101	182/182
40	191/229	99/101	182/188
41	191/229	99/101	182/188
42	191/229	99/101	182/188

43	191/229	99/101	182/188
44	191/191	99/101	182/188
45	191/229	99/101	182/182
46	191/229	101/101	182/182
47	191/191	99/101	182/188
48	191/229	99/101	182/182
49	191/191	101/101	182/182
50	191/191	99/101	182/182
51	191/229	99/101	182/188
52	191/229	99/101	182/182
53	191/191	101/101	182/182
54	191/191	99/101	182/182
55	191/191	101/101	182/182
56	191/229	101/101	182/188
57	191/229	99/101	182/188
58	191/191	99/101	182/182
59	191/229	101/101	182/182
60	191/229	101/101	182/182
61	191/191	101/101	182/188
62	191/229	101/101	182/188
63	191/191	101/101	182/182
64	191/229	101/101	182/188
65	191/191	101/101	182/188
66	191/229	101/101	182/182
67	191/229	101/101	182/188
70	191/191	101/101	182/182
71	191/191	101/101	182/188
72	191/191	101/101	182/188
73	191/229	101/101	182/182
74	191/229	99/101	182/188
75	191/229	101/101	182/182
76	191/191	99/101	182/182
77	191/191	101/101	182/182
78	191/229	99/101	182/182
79	191/229	99/101	182/188
80	191/229	101/101	182/188
82	191/229	101/101	182/188
84	191/191	99/101	182/188
85a	191/229	101/101	182/188
85b	191/229	101/101	182/182
86	191/229	99/101	182/182
87	191/229	101/101	182/182
88	191/229	101/101	182/182
89	-/-	99/101	182/182
90	191/191	99/101	182/188
92b	191/229	101/101	182/188
93a	191/229	99/101	182/188

94	191/191	99/101	182/182
95	191/191	99/101	182/182
96	191/229	101/101	182/188
97	191/229	99/101	182/182
101	191/229	101/101	182/188
103	191/191	-/-	182/188
104	191/229	101/101	182/188
105	-/-	-/-	182/188
106	191/191	99/101	182/188
107	191/191	101/101	182/182
108	191/191	101/101	182/188
109	191/229	99/101	182/188
110	191/191	99/101	182/188
111	191/229	101/101	182/188
112	-/-	99/101	182/188
113	-/-	99/101	182/182
114	191/229	-/-	182/182
116	191/191	-/-	182/188
117	191/229	99/101	182/188
118	191/229	101/101	182/182
119	191/191	99/101	182/188
120	191/191	101/101	182/182
123	191/191	99/101	182/188
124	191/229	99/101	182/182
126	191/229	-/-	182/188
127	191/191	101/101	182/182
128	191/229	99/101	182/182
129	191/229	-/-	182/188
130	191/229	99/101	182/182
131	-/-	101/101	182/182
132	191/229	101/101	182/182
133	191/229	-/-	182/188
134	191/191	101/101	182/182
135	191/191	101/101	182/188
136	191/191	101/101	182/188
137	191/229	101/101	182/188
138	191/229	99/101	182/188
139	191/191	99/101	182/188
140a	-/-	-/-	182/182
140b	-/-	-/-	182/188
141	-/-	99/101	182/182
142	191/191	101/101	182/182
144	191/229	101/101	182/182
145	191/229	99/101	182/182
146	191/191	101/101	182/182
147	191/191	101/101	182/182
148	191/191	99/101	182/188

149	191/229	99/101	182/182
150	191/229	101/101	182/188
151	191/191	101/101	182/188
152	191/191	99/101	182/182
153	-/-	101/101	182/188
154	-/-	101/101	182/182
155	191/191	99/101	182/182
156	191/229	-/-	182/182
157	191/229	-/-	182/182
160	191/191	99/101	182/188
163	191/229	-/-	182/182
164	191/229	99/101	182/188
165	191/191	99/101	182/188
166	191/191	101/101	182/188
168	191/191	-/-	182/182
169	-/-	99/101	182/182
170	191/229	-/-	182/182
171	191/229	-/-	182/182
172	191/191	101/101	182/188
173	191/229	101/101	182/188
174	191/191	101/101	182/188
175	191/229	99/101	182/182
176	191/191	101/101	182/188
177	191/191	101/101	182/182
178	191/191	99/101	182/188
179	191/229	101/101	182/188
180	191/191	99/101	182/182
181	191/191	-/-	182/188
182a	-/-	-/-	182/188
182b	191/229	-/-	182/188
184	191/229	-/-	182/188
185	191/229	99/101	182/182
186	191/191	101/101	182/182
187	191/229	101/101	182/182
188	191/191	99/101	182/188
189	191/229	99/101	182/188
191	191/191	99/101	182/182
192	191/229	101/101	182/188
193	-/-	101/101	182/188
201	191/229	101/101	182/188
202	-/-	-/-	182/188
204	191/229	-/-	182/188
206	191/191	101/101	182/182
208	191/229	101/101	182/182
210	191/191	-/-	182/182
212	191/229	99/101	182/188
213	191/191	99/101	182/182

214	191/229	101/101	182/188
215	191/191	99/101	182/182
216	191/191	99/101	182/182
218	191/191	99/101	182/188
219	191/191	101/101	182/188
220	191/191	101/101	182/182
221	191/229	101/101	182/188
222	191/191	99/101	182/182
224	-/-	101/101	182/188
225	191/191	99/101	182/182
226	191/229	101/101	182/188
227	191/191	101/101	182/188
228	191/191	101/101	182/182
229	191/191	99/101	182/182
230	191/191	101/101	182/188
231	191/229	101/101	182/188
232	191/191	99/101	182/182
233	-/-	101/101	182/188
234	-/-	99/101	182/182
235	191/229	101/101	182/182
236	191/229	99/101	182/182
237	191/191	99/101	182/182
239	191/191	101/101	182/188
240	191/229	101/101	182/182
242	191/229	101/101	182/188
243	191/229	101/101	182/188
245	191/229	101/101	182/182
246	191/229	99/101	182/188
247	191/229	99/101	-/-
248	191/191	99/101	182/182
249	-/-	99/101	182/182
250	191/229	99/101	182/182
251	191/229	101/101	182/182
252	191/229	99/101	182/182
253	191/229	99/101	182/188
255	191/191	101/101	182/188
256	191/191	99/101	182/182
257	191/191	101/101	182/188
258	191/191	99/101	182/182
259	191/229	99/101	182/188
260	191/191	99/101	182/182
261	191/229	101/101	182/182
262	191/229	101/101	182/188
263	191/229	99/101	182/188
265	191/229	101/101	182/188
266	191/229	101/101	182/188
267	191/229	101/101	182/182

268	191/191	99/101	182/182
269	191/229	99/101	182/182
270	191/191	101/101	182/182
271	191/191	101/101	182/188
272	191/191	101/101	182/182
273	191/229	101/101	182/182
274	191/191	99/101	182/182
276	191/191	99/101	182/182
277	191/191	101/101	182/188
278	191/191	101/101	182/188
281	191/191	101/101	182/188
282	191/229	101/101	182/188
284	191/191	99/101	182/188
285	191/191	99/101	182/188
286	191/229	101/101	182/182
287	191/191	99/101	182/182
288	191/229	99/101	182/188
289	191/229	99/101	182/188
291	191/191	101/101	182/188
292	191/191	99/101	182/188
SP	191/229	101/101	182/182
93b	191/229	99/101	182/188
98	191/191	101/101	182/188
115	191/229	99/101	182/188
121	191/229	101/101	182/182
143	191/191	101/101	182/182
99	191/191	99/101	182/188
100	191/191	99/101	182/182
211	191/229	99/101	182/188
198	191/191	99/101	182/182

Tabela 3. Fenotipagem de resistência ao míldio da videira na progênie F1 do cruzamento de *Vitis vinifera* (CNPUV 733-34 x CNPUV 1103-88).

Híbrido	Campo		Bioensaio			Híbrido	Campo		Bioensaio		
	F1	2010	2011	R1	R2		R3	F1	2010	2011	R1
1	7	7	7	5	7	151	7	7	7	7	7
2	7	7	7	7	7	152	7	5	7	7	5
3	3	3	3	3	3	154	3	3	3	1	3
5	7	7	7	7	7	155	3	1	-	-	-
7	9	9	7	9	9	156	7	7	7	7	7
8	7	7	7	9	7	157	5	5	5	5	5
10	5	5	5	5	5	160	5	5	5	5	5
11	7	7	7	7	7	165	3	3	-	-	-
15	7	7	7	7	7	166	9	9	9	9	9
16	5	5	5	5	5	169	9	7	7	7	9
19	5	5	5	5	5	171	7	7	5	7	7
20	9	7	9	7	9	172	7	5	5	5	7
21	5	5	5	5	5	173	9	9	9	9	9
22	7	7	7	7	7	174	9	7	-	-	-
25	5	5	5	5	5	175	9	9	-	-	-
28	7	7	7	7	7	176	7	7	7	7	7
29	7	7	7	7	7	177	3	3	3	3	3
30	7	9	9	9	7	178	5	5	5	5	5
33	7	7	7	7	7	179	3	3	-	-	-
34	5	7	7	5	7	180	7	7	7	7	7
35	7	7	7	7	5	181	7	7	7	7	7
36	5	7	7	5	5	182a	5	7	7	5	5
37	7	7	7	7	7	182b	7	7	7	7	7
38a	5	5	5	5	5	184	7	7	7	7	7
38b	7	9	9	9	7	185	5	3	3	5	5
39	7	7	7	7	7	186	7	7	7	7	7
40	9	9	9	9	9	187	7	7	7	7	7
41	7	7	7	7	7	189	5	7	7	7	7
43	5	5	5	5	5	191	5	5	-	-	-
44	7	7	7	7	7	192	3	5	-	-	-
45	3	1	3	3	1	193	7	7	7	7	7
46	9	9	9	9	9	201	5	5	5	5	5
47	5	7	7	5	7	202	7	5	7	7	7
48	7	7	7	7	7	204	5	5	5	5	5
49	3	3	3	3	3	206	9	7	7	9	7
50	9	7	9	7	7	208	7	7	7	7	7
52	7	5	5	5	7	210	5	5	5	5	5
53	3	3	1	1	1	212	5	7	5	7	5
54	7	7	7	7	7	213	5	5	5	5	5

55	7	7	7	7	7	214	7	7	7	7	7
56	7	7	7	7	7	215	7	7	7	7	7
57	7	7	7	7	7	216	7	5	5	5	5
58	5	5	5	5	5	218	3	3	-	-	-
59	5	5	5	5	5	219	7	7	7	5	7
60	5	5	5	5	5	220	7	5	5	7	7
61	7	7	7	7	7	221	7	7	7	7	7
62	7	7	-	-	-	222	7	5	5	5	7
63	7	7	7	7	9	224	7	5	7	7	7
64	7	7	7	9	7	225	9	7	9	9	7
65	7	7	7	7	7	226	5	5	5	5	5
70	5	5	5	5	5	227	5	5	5	5	5
71	3	3	1	3	1	228	5	5	5	5	5
72	7	7	7	7	7	229	3	1	3	1	1
73	5	5	5	5	5	230	7	7	7	7	7
74	7	7	7	7	7	231	9	7	7	7	9
76	7	7	7	7	7	233	3	5	3	5	5
77	7	7	7	7	9	234	5	3	3	5	5
79	7	7	7	7	7	236	7	5	7	7	7
80	7	7	7	7	7	237	7	7	7	7	7
84	7	7	7	7	7	240	5	5	5	5	5
85a	5	3	5	3	3	242	3	3	3	3	3
85b	5	5	5	5	5	243	7	5	7	7	5
86	9	9	9	9	9	245	9	9	9	9	9
87	5	5	5	5	5	246	5	5	5	5	3
88	5	7	5	5	5	247	7	7	7	7	7
89	5	5	5	5	5	248	9	7	7	9	7
90	7	7	7	7	7	249	9	9	9	9	7
92b	7	5	7	7	5	250	5	3	5	3	3
93a	7	5	5	7	7	251	5	3	3	3	3
103	7	9	9	7	9	252	5	3	5	5	3
104	5	5	5	5	5	255	5	7	7	7	5
105	5	5	5	5	5	256	5	7	7	5	7
107	5	5	5	5	5	258	7	7	7	7	7
109	7	9	7	7	9	259	7	5	7	7	5
110	5	5	5	5	5	260	5	5	5	5	5
111	7	5	5	7	5	261	7	7	7	7	7
112	7	5	5	5	5	262	5	5	5	3	5
113	3	3	3	3	3	263	9	9	9	9	9
114	5	7	7	7	7	266	5	7	7	7	5
116	7	7	-	-	-	267	9	9	9	9	9
117	5	5	5	5	5	268	7	9	9	9	9
118	7	7	7	7	7	269	3	1	3	3	1
119	7	7	7	7	7	270	5	3	3	3	3
120	7	7	7	7	7	271	3	1	3	1	1

123	7	7	7	7	7	272	5	5	5	5	5
124	5	7	-	-	-	273	7	5	7	7	7
126	5	5	-	-	-	274	5	3	3	3	3
127	7	7	7	7	7	277	5	5	5	5	5
128	9	9	9	9	9	278	7	7	7	7	7
129	5	7	7	7	7	281	7	5	7	7	5
130	7	7	7	7	7	282	3	3	3	3	3
132	3	1	3	3	1	284	5	5	5	5	5
133	9	9	9	9	9	288	5	5	5	5	5
134	5	3	3	3	5	289	5	5	5	5	5
136	7	7	7	7	7	291	7	7	7	7	7
137	5	5	5	5	5	SP	9	9	9	9	9
138	7	7	7	7	7	93b	5	5	5	5	5
140a	9	7	7	9	9	98	5	3	3	5	5
140b	5	7	-	-	-	115	7	7	7	7	7
142	5	5	5	5	5	121	9	9	9	9	9
144	3	3	3	3	3	143	7	7	7	7	7
145	3	3	3	3	3	99	7	5	7	7	7
148	5	3	5	3	3	100	3	5	5	5	3
149	7	5	5	5	7	211	7	7	7	7	7
150	7	7	7	7	7	198	5	7	7	7	5
