



* B R 1 0 2 0 2 4 0 0 8 2 9 5 A 2 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102024008295-8 A2

(22) Data do Depósito: 26/04/2024

(43) Data da Publicação Nacional:
28/10/2025

(54) Título: MÉTODO DE MONITORAMENTO DE INÓCULO E DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS PARA MANEJO INTEGRADO DA FERRUGEM DA SOJA E DA BRUSONE DO TRIGO

(51) Int. Cl.: C12Q 1/68; C12Q 1/6895.

(52) CPC: C12Q 1/68; C12Q 1/6895.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO; INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO RURAL DO PARANÁ - IAPAR-EMATER; ROTHAMSTED RESEARCH LIMITED; FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS; UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA.

(72) Inventor(es): PAULO CEZAR CERESINI; ADRIANO AUGUSTO DE PAIVA CUSTÓDIO; ANDRE LUIZ JOHANN; BARTHOLOMEUS ANTONIOUS FRAAIJE; DIEGO ENRIQUE PORTALANZA PERALTA; ERNESTO ABEL FERNANDO FRIEDMANN PALLAROLAS; FELIPE RAFAEL GARCÉS FIALLOS; HEVANDRO COLONHESE DELALIBERA; JONATHAN SPENCER WEST; KEVIN M. KING; LOANE DANTAS KRUG; NICHOLA JANE HAWKINS; RUI PEREIRA LEITE JUNIOR; SAMARA NUNES CAMPOS VICENTINI; SILVINO INTRA MOREIRA; WALDIR CINTRA DE JESUS JUNIOR.

(57) Resumo: MÉTODO DE MONITORAMENTO DE INÓCULO E DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS PARA MANEJO INTEGRADO DA FERRUGEM DA SOJA E DA BRUSONE DO TRIGO. O presente pedido de patente refere-se à um método para monitoramento aerobiológico de inóculo de fitopatógenos e detecção de resistência a fungicidas compreendendo as seguintes etapas: coleta de populações de esporos de fitopatógenos fúngicos em aerossóis usando um dispositivo ciclone automatizado de alto volume para amostragens diárias; extração de DNA fúngico de amostras de ar e purificação; detecção dos fitopatógenos nas amostras de ar usando qPCR em tempo real (qPCR TR) com iniciadores e sondas específicas para os fitopatógenos; detecção de alelos de resistência de genes que codificam para a proteína alvo dos fungicidas; representação descritiva das séries temporais e análises estatísticas e dados finais. Pertencendo ao campo da agricultura e saúde animal, o método permite a detecção precoce de patógenos fúngicos e a identificação de resistência a fungicidas, auxiliando no manejo eficiente de doenças de culturas agrícolas e no desenvolvimento de estratégias sustentáveis de manejo de doenças.



MÉTODO DE MONITORAMENTO DE INÓCULO E DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS PARA MANEJO INTEGRADO DA FERRUGEM DA SOJA E DA BRUSONE DO TRIGO

INTRODUÇÃO

[001] O presente pedido de patente de invenção refere-se à um método para monitoramento aerobiológico de inóculo de fitopatógenos e detecção de resistência a fungicidas.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] A principal aplicação da tecnologia é na área da agricultura e saúde animal, permitindo a medição quantitativa dos níveis de inóculo dos patógenos e detecção de alelos de resistência a fungicidas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[003] A ferrugem asiática da soja [causada por *Phakopsora pachyrhizi* (*Pp*)] e a brusone do trigo [causada por *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (*PoTI*)] são doenças de extrema importância para a agricultura no Brasil, controladas principalmente pelo uso de fungicidas. Entretanto, resistência generalizada aos principais grupos de fungicidas – esterol demetilase (DMI), quinona externa (QoI) e inibidores da succinato desidrogenase (SDHI) – tem sido relatada no Brasil. A fim de racionalizar as pulverizações de fungicidas (por exemplo, escolha, momento, dose, número de pulverizações e mistura/alternância) para o manejo da ferrugem asiática da soja e brusone do trigo, o novo método presente no atual pedido de patente, permite: (1) monitorar a quantidade de conídios de *Pp* e *PoTI* no ar com base na detecção específica de DNA fúngico, (2) revelar a prevalência de alelos de resistência a fungicidas em populações de aerossóis e determinar a dinâmica de dispersão dos alelos de resistência dos dois patógenos fúngicos. Em conclusão, este sistema forneceu detecção prévia dos níveis de esporos dos patógenos no ar e da prevalência de alelos de resistência a fungicidas.

ESTADO DA TÉCNICA

[004] O documento US7370543B2, refere-se a um aparelho para uso na coleta de partículas transportadas pelo ar compreendendo um recipiente de coleta no qual as partículas são coletadas para análise, o recipiente de coleta compreendendo um tubo de centrifugação tendo uma extremidade aberta que é ortogonal a uma linha que se estende longitudinalmente em relação ao tubo; um conduto de entrada de ar para conduzir o ar para dentro do tubo de centrifugação, o conduto de entrada de ar se estendendo em um ângulo em relação a um plano que é paralelo à extremidade aberta, o conduto de entrada de ar sendo não ortogonal e não paralelo ao referido plano; e um conduto de saída de ar para conduzir o ar para fora do tubo da microcentrífuga; em que o conduto de entrada de ar e o conduto de saída de ar estão situados para fazer com que o ar que flui através do tubo de centrifugação e crie um vórtice, fazendo com que as partículas transportadas pelo ar se separem do ar que flui através do tubo. Após um período de amostragem, o recipiente de coleta pode ser removido para realizar uma ou mais análises nas partículas coletadas. Algumas análises, como análise de PCR, podem ser realizadas na amostra enquanto a mesma estiver no recipiente de coleta.

[005] O documento US7097975B1, refere-se a métodos de PCR para identificação e detecção do patógeno da ferrugem da soja *Phakopsora pachyrhizi*. Foram descobertas sequências de oligonucleotídeos capazes de amplificar fragmentos de DNA específicos para identificação de patógenos quando usados em um ensaio PCR.

[006] O documento “MONITORING *Pyricularia* sp. AIRBORNE INOCULUM IN PASSO FUNDO, RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL”, DANIELLI *et al.*, 2019, refere-se ao monitoramento de inóculo transportados pelo ar de *Pyricularia* sp., agente causador da brusone de trigo. Para coletar os esporos, foram utilizadas armadilhas automáticas e do tipo cata-vento.

[007] Além dos documentos citados, cabe destacar que o IDR-Paraná tem desenvolvido ações de monitoramento da ferrugem-asiática da soja baseado no uso de coletores de esporos, o qual possibilita a detecção dos uredósporos do fungo,

circulante no ar, antes mesmo da manifestação de sintomas em plantas e assim ser uma ferramenta auxiliar no manejo da doença quanto ao momento de fazer a primeira aplicação de fungicida; e que a EMBRAPA Territorial desenvolveu o sistema "Monitora Oeste", em parceria com a Associação Baiana dos Produtores de Algodão (Abapa), cujo intuito de gerar alertas do avanço da mancha de ramulária do algodoeiro e da ferrugem asiática da soja sobre as lavouras do Oeste da Bahia. No entanto, a tecnologia utilizada não é avançada porque utiliza coletores de esporos fabricados com tubos de cano PVC para coleta e contagem manual do número de esporos aéreos em lâminas no microscópio baseado em critérios morfológicos. Também, não existe a detecção molecular dos alelos de resistência/suscetibilidade dos alvos-biológicos ou a quantificação do DNA dos fitopatógenos, o que corrobora com a inventividade da presente invenção.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[008] O objetivo da invenção é desenvolver um novo método de monitoramento da quantidade aérea de DNA dos fitopatógenos e detectar os alelos de resistência aos principais grupos de fungicidas sítios-específicos utilizados no mercado. Adicionalmente, com as informações da quantidade e dos fitopatógenos presentes, em cada dia, poderão ser gerados alertas sobre a necessidade de realização de intervenções para o controle desses fitopatógenos (e das doenças resultantes).

VANTAGENS DA INVENÇÃO

[009] A novidade da tecnologia consiste no aprimoramento do processo de captura automatizada de aerossóis de fitopatógenos, especificamente os alvos-biológicos *Pyricularia oryzae* linhagem Triticum e *Phakopsora pachyrhizi*, e posterior análise (e reanálise) do inóculo por meio da detecção molecular do DNA nas amostras coletadas para o monitoramento e detecção de alelos resistentes à fungicidas, além disso um banco de dados poderá ser obtido para suportar análises preditivas das informações.

[010] A tecnologia de monitoramento e detecção de fitopatógenos pode contribuir para o manejo mais eficiente e sustentável de doenças agrícolas, como a ferrugem

asiática da soja e a brusone do trigo. Ao fornecer informações em tempo real sobre a presença e a quantidade de esporos patogênicos no ar, os agricultores podem tomar decisões mais informadas sobre o momento e a aplicação de medidas de controle, como pulverização de fungicidas, resultando em um uso mais preciso e redução do uso excessivo de produtos químicos.

[011] Através da tecnologia de aerobiologia, é possível reduzir o uso indiscriminado de fungicidas ao fornecer informações precisas sobre a presença e a dinâmica de dispersão de patógenos. Isso pode levar a uma diminuição significativa da quantidade de produtos químicos utilizados na agricultura, reduzindo o impacto ambiental associado à contaminação de solos, água e organismos não alvo.

[012] A detecção de alelos de resistência a fungicidas em populações de aerossóis por meio da tecnologia desenvolvida pode desempenhar um papel fundamental no monitoramento da resistência de patógenos a diferentes grupos de fungicidas. Isso permite que os agricultores e pesquisadores acompanhem a evolução da resistência, ajustem estratégias de manejo e desenvolvam abordagens mais eficazes para controlar as doenças agrícolas.

[013] A plataforma de aerobiologia pode ser uma ferramenta poderosa para a transferência de conhecimento e capacitação de agricultores, extensionistas e outros profissionais do setor agrícola. Ao fornecer dados e informações precisas sobre a presença e o manejo de doenças agrícolas, a tecnologia pode melhorar o conhecimento e a compreensão dos agricultores sobre as melhores práticas de manejo, contribuindo para a adoção de abordagens mais sustentáveis e eficientes.

[014] A tecnologia de monitoramento aerobiológico fornece dados quantitativos e em tempo real sobre a presença e a dinâmica de dispersão de patógenos. Esses dados podem ser integrados a sistemas de informações geográficas (SIG) e outras ferramentas de análise para auxiliar na tomada de decisões baseada em dados. Isso pode ajudar os agricultores a identificar áreas de maior risco, planejar estratégias de manejo e otimizar a alocação de recursos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FIGURAS

[015] A Figura 1A é uma fotografia ilustrando o amostrador de ar tipo ciclone de alto volume, com teto protetor.

[016] A Figura 1B é uma fotografia mostrando a vista frontal da unidade amostradora montada com uma asa impulsionada pelo vento, instalada dentro dos limites de uma estação meteorológica.

[017] A Figura 1C é uma fotografia que exhibe detalhes da unidade de amostragem de esporos descoberta.

[018] A Figura 1D é uma fotografia que exhibe o painel de controle pelo qual os parâmetros do amostrador são definidos.

[019] A Figura 2 é um gráfico que detalha as quantidades médias diárias de DNA de *Pyricularia oryzae* linhagem Triticum (*PoTI*) da brusone do trigo, detectadas por PCR quantitativa em tempo real (qPCR TR) em aerossóis amostrados por um período de 12 horas com um amostrador de ar de ciclone de alto volume. A quantidade média diária de DNA alvo foi determinada a partir dos resultados obtidos após testar 2 µL de amostra em duplicata.

[020] As Figuras 3A, 3B e 3C são gráficos que detalham as quantidades médias diárias de DNA de *Phakopsora pachyrhizi* (*Pp*) da ferrugem asiática da soja detectadas por qPCR TR em aerossóis amostrados por 12 horas com um amostrador de ar de ciclone de alto volume. A quantidade média diária de DNA alvo foi determinada a partir dos resultados obtidos após testar 2 µL de amostra em duplicata. A Figura 3A detalha os resultados da detecção de *Phakopsora pachyrhizi* em amostras de esporos aerossóis em 2019, 2020 e 2021. A Figura 3B detalha os resultados da detecção de *Phakopsora pachyrhizi* em amostras de esporos aerossóis entre o período de janeiro à abril de 2020, já a Figura 3C entre o período de janeiro à abril de 2021.

[021] A Figura 4 exemplifica o monitoramento e ações a serem tomadas para evitar grandes perdas de rendimento das culturas, garantindo que sejam adotadas práticas oportunas e apropriadas de manejo de doenças, permitindo a redução de

pulverizações desnecessárias de fungicidas, aliviando a pressão de seleção para resistência e diminuindo o impacto ambiental.

DESCRIÇÃO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[022] A seguir são descritas as sequências genéticas importantes para a realização da presente invenção:

- ✓ SEQ ID NO: 1 – MoT3_1F. Iniciador direto para qPCR para detecção de *PoTI* visando um amplicon de 146 pb;
- ✓ SEQ ID NO: 2 – MoT3_1R. Iniciador reverso para Qpcr para detecção de *PoTI* visando um amplicon de 146 pb;
- ✓ SEQ ID NO: 3 – MoT3_FAM2. Sonda marcada com 5'FAM e 3'BHQ1 para detecção de *PoTI* visando um amplicon de 146 pb;
- ✓ SEQ ID NO: 4 – Ppm1. Iniciador para detecção de Pp visando um amplicon de 138 pb;
- ✓ SEQ ID NO: 5 – Ppa2. Iniciador para detecção de Pp visando um amplicon de 138 pb
- ✓ SEQ ID NO: 6 – Sonda ASRP1 marcada com fluoróforo FAM na extremidade 5' e com o quencher BHQ1 na extremidade 3', para detecção de Pp visando um amplicon de 138 pb;
- ✓ SEQ ID NO: 7 – cytB PCR inicial - F1. Iniciador direto de amplificação da PCR inicial visando um fragmento cytB de 305 pb;
- ✓ SEQ ID NO: 8 – cytB PCR inicial - R1. Iniciador reverso de amplificação da PCR inicial visando um fragmento cytB de 305 pb;
- ✓ SEQ ID NO: 9 – cytB PCR aninhado - F2. Iniciador direto para a PCR aninhado (*nested PCR*), visando um fragmento de 101 pb;
- ✓ SEQ ID NO: 10 – cytB PCR aninhado - R2. Iniciador reverso para a PCR aninhado (*nested PCR*), visando um fragmento de 101 pb;
- ✓ SEQ ID NO: 11 – Ordem de dispensação para pirosequenciamento dos produtos da PCR aninhado, utilizado para quantificar os alelos mutantes ou selvagens no gene cytB de *PoTI*;

- ✓ SEQ ID NO: 12 – Sequência a ser analisada para pirosequenciamento dos produtos da PCR aninhado, utilizado para quantificar os alelos mutantes ou selvagens no gene *cytB* de *PoTI*;
- ✓ SEQ ID NO: 13 – S1. *cytB* iniciador para pirosequenciamento utilizado para quantificar os alelos mutantes ou selvagens no gene *cytB* de *PoTI*;
- ✓ SEQ ID NO: 14 – SdhC-5224 F. Iniciador direto para reações de PCR em *P. pachyrhizi*;
- ✓ SEQ ID NO: 15 – SdhC-5223. Iniciador reverso para reações de PCR em *P. pachyrhizi*;
- ✓ SEQ ID NO: 16 – KES_2156_86F (A). Iniciador direto usado para detecção e quantificação por PCR quantitativo (qPCR) em tempo real da substituição I86F em amostras populacionais de *Phakopsora pachyrhizi*;
- ✓ SEQ ID NO: 17 – KES_2155_86I (B). Iniciador direto usado para detecção e quantificação por PCR quantitativo (qPCR) em tempo real da substituição I86F em amostras populacionais de *Phakopsora pachyrhizi*;
- ✓ SEQ ID NO: 18 – qPCR-sdhC R (C). Iniciador reverso usado para detecção e quantificação por PCR quantitativo (qPCR) em tempo real da substituição I86F em amostras populacionais de *Phakopsora pachyrhizi*;
- ✓ SEQ ID NO: 19 – Probe – *sdhC*. Sonda usada para detecção e quantificação por PCR quantitativo (qPCR) em tempo real da substituição I86F em amostras populacionais de *Phakopsora pachyrhizi*.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[023] O método de monitoramento aerobiológico de inóculo de fitopatógenos e detecção de resistência a fungicidas é melhor compreendido conforme a seguir.

1. Coleta de populações de esporos de fitopatógenos fúngicos em aerossóis (isto é, esporos transportados pelo ar) usando um dispositivo ciclone automatizado de alto volume para amostragens diárias.

[024] Os esporos de *Pyricularia oryzae* linhagem Triticum (*PoTI*) da brusone do trigo e de *Phakopsora pachyrhizi* (*Pp*) da ferrugem da soja transportados pelo ar foram

coletados diariamente em tubos de 2 mL usando o ciclone automatizado de alto volume (Figura 1). O fluxo de ar coletado foi ajustado de acordo com a configuração padrão do fabricante de 270 L.min⁻¹. Para implementar a plataforma, o amostrador de ar tipo ciclone de alto volume capturou aerossóis no estado do Paraná entre 2019 e 2021, durante 12 horas por dia.

2. Extração de DNA fúngico de amostras de ar e purificação.

[025] Para extração do DNA fúngico total, 0,5 g de esferas de vidro esterilizada (400–455 µm de diâmetro) foram adicionados a cada tubo de 2 mL juntamente com 440 µL de tampão de extração (400 mM Tris-HCl; 50 mM EDTA pH 8; 500 mM de NaCl; 2% de polivinilpirrolidona; 5 mM de mono-hidrato de 1,10-fenantrolina e imediatamente antes do uso, 0,1% de β-mercaptoetanol). Os tubos foram posteriormente transferidos para um homogeneizador FastPrep por três ciclos de 6,0 m.s⁻¹ por 40 s, com 2 min de resfriamento no gelo entre os ciclos. Em seguida, adicionou-se aos tubos um total de 400 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 2%, que foram invertidos várias vezes para homogeneizar a solução, sendo então incubados a 65 °C em banho-maria por 30 min, misturando-se a cada 10 min. Posteriormente, 800 µL de fenol:clorofórmio (1:1) foram adicionados a cada tubo, que foi brevemente agitado em vórtex e então centrifugado a 13 k rpm por 10 min a 4 °C. Para outro conjunto de tubos de centrifugação de 1,5 mL de capacidade, foram adicionamos 30 µL de acetato de amônio 7,5 M, 480 µL de isopropanol e 1 µL do coprecipitante glicoblue a 16 mg.mL⁻¹. O sobrenadante da solução centrifugada foi pipetado para o novo conjunto de tubos e misturado suavemente e colocado em um freezer a -20 °C durante a noite. Os tubos foram então centrifugados a 13 k rpm por 30 min a 4 °C e o pellet foi lavado com 200 µL de etanol 70% e centrifugado a 13 k rpm por 5 min. O pellet de DNA, tornado visível por glicoblue, foi seco ao ar em uma cabine de fluxo laminar (aprox. 30 min) e ressuspensão em 100 µL de 10 mM Tris pH 8,0 e, em seguida, colocado em banho-maria a 65 °C por 5 min para ressuspender totalmente o DNA, antes do armazenamento a -20 °C. O DNA foi purificado usando a coluna

EchoCLEAN DNA CleanUp (BioEcho Life Sciences, Cologne, North Rhine-Westphalia, Germany) de acordo com as instruções do fabricante.

3. Detecção dos fitopatógenos em amostras de ar usando qPCR TR com iniciadores e sondas específicas para os fitopatógenos.

[026] Para extração de DNA, 0,5 g de esferas de vidro estéreis (400-455 µm de diâmetro; Sigma, St Louis, MI, EUA) foram adicionadas a cada tubo de 2 mL. As reações de PCR foram realizadas em uma reação de 15 µL (em placas de PCR de 96 poços tampadas) consistindo em 2 µL de amostra de DNA, 13 µL de solução contendo 7,5 µL de sonda KAPA fast qPCR Master Mix (Biosystem, Foster City, CA, EUA) e 5.425 µL de água destilada estéril contendo iniciadores MoT3_1F (SEQ ID NO: 1) e MoT3_1R (SEQ ID NO: 2), e a sonda marcada com 5'FAM e 3'BHQ1 MoT3_FAM2 (SEQ ID NO: 3) para detecção de *PoTI* visando um amplicon de 146 pb de acordo com Pieck *et al.* [2017]; ou iniciadores Ppm1 (SEQ ID NO: 4) e Ppa2 (SEQ ID NO: 5), e a sonda ASRP1 marcada com 5'FAM e 3'BHQ1 (SEQ ID NO: 6) para detecção de *Pp* visando um amplicon de 138 pb de acordo com Frederick *et al.* [2002]; adicionou-se, também, o corante de referência Rox (Invitrogen; 0,075 µL por reação). As condições de ciclagem incluíram 2 minutos a 98°C, seguidos de 50 ciclos de 10 s a 95°C e 30 s a 60°C. Cada reação foi realizada em duplicata em um sistema de PCR quantitativo em tempo real (qPCR TR) AriaMx (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Em cada execução de qPCR TR, amostras padrão consistindo em quantidades calibradas de DNA alvo de *PoTI* ou de *Pp* (0,02 pg; 0,2 pg; 2 pg; 20 pg; 200 pg; 2000 pg; 20.000 pg; 100 ng; 500 ng) foram incluídas para a curva padrão. Controles (ou seja, água destilada esterilizada) também foram incluídos em todas as execuções de qPCR TR. Os dados foram analisados usando o software Agilent AriaMx.

4. Detecção de alelos de resistência de genes que codificam para a proteína alvo dos fungicidas.

4.1. Pirosequenciamento para quantificação de alelos mutante ou selvagem no gene *cytB* de *PoTI*, que conferem ou não resistência a fungicidas estrobilurinas ou Qol (inibidores da quinona externa).

[027] A frequência do alelo *cytB* A143 em *PoTI* associada à resistência a fungicidas Qol (troca de nucleotídeos G para C na posição 54 do amplicon de PCR aninhado (*nested PCR*) ou na posição 700 da sequência de número de acesso do GenBank AY245424), resultando na substituição de aminoácidos de glicina por alanina na posição 143 da proteína [Castroagudín *et al.* 2015], foi determinada usando um ensaio de pirosequenciamento de detecção de SNP. Antes do pirosequenciamento, um PCR inicial e um segundo ensaio subsequente de PCR aninhado (*nested PCR*) com amplicons das primeiras reações foram realizados para amplificar o fragmento do gene *cytB*, que contém a sequência alvo. A reação de amplificação da PCR inicial visando um fragmento *cytB* de 305 pb foi realizada em um volume total de reação de 25 µL contendo 20 ng de DNA molde, 100 µM de dNTPs, 0,2 µM de cada iniciador (Tabela 1 – SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8), 0,5 U de Taq DNA Polimerase (GoTaq, Promega, Madison, WI, EUA) e tampão GoTaq 1X (3 mM MgCl₂). Um controle negativo (mistura de PCR sem DNA) foi incluído em todos os experimentos de PCR. A reação de amplificação foi realizada em termociclador da seguinte forma: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min, e extensão final a 72 °C por 5 min. Para a PCR aninhado (*nested PCR*), visando um fragmento de 101 pb, foi utilizado o seguinte protocolo, com 15 µL de diluição 1:500 do produto da reação de PCR inicial: 100 µM de dNTPs, 0,2 µM de cada iniciador de PCR aninhado (*nested PCR*) (Tabela 1 – SEQ ID NO: 9 e SEQ ID NO: 10), 0,5 U de Taq DNA Polimerase (GoTaq, Promega, Madison, WI, EUA) e tampão GoTaq 1X (3 mM MgCl₂, Promega, Madison, WI, EUA). A reação de amplificação foi realizada em termociclador da seguinte forma: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min, e extensão final a 72 °C por 5 min.

[028] O pirosequenciamento dos produtos da PCR aninhado (*nested PCR*) biotinilados foi realizada em um instrumento PyroMark Q48 (Qiagen, Hilden, Alemanha) usando TCGTGCTA (SEQ ID NO: 11) como ordem de dispensação e

C/GTGCTACAGTTATTACTAATCTTATT (SEQ ID NO: 12) como sequência a ser analisada. O kit de reagentes de pirosequenciamento (Qiagen, Hilden, Alemanha) contendo tampão de ligação, tampão de recozimento, dNTPs, mistura de substrato (adenosina 5' fosfosulfato e luciferina) e uma mistura de enzimas (DNA polimerase, ATP sulfurilase e luciferase) foram carregados nos cartuchos com volumes definidos de acordo com o software Pyromark. O iniciador de sequenciamento (Tabela 1 - SEQ ID NO: 13) foi adicionado ao cartucho em um volume predeterminado; 10 µL de cada produto de PCR aninhado (*nested PCR*) foram carregados em cada poço de um disco PyroMark Q48 em triplicata e 3 µL de esferas magnéticas PyroMark Q48 (Qiagen, Hilden, Alemanha) foram adicionados a cada reação. Isolados de *PoTI* com e sem *cytB G143A* foram incluídos como controles. O software PyroMark Q48 Autoprep foi usado para quantificar a mutação G para C subjacente, conforme indicado pelas alturas de pico da sequência do gene *cytB* alvo. Os dados finais sobre a frequência dos alelos A143 resistentes a QoI são baseados na média de três reações técnicas replicadas.

Tabela 1. Iniciadores e sonda usados para detecção qPCR em tempo real da linhagem *Pyricularia oryzae* Triticum e iniciadores *cytb* para detecção do alelo A143 associado à resistência QoI usando um ensaio de reação em cadeia da polimerase aninhada (*nested-PCR*) e pirosequenciamento de DNA fúngico extraído de amostras de esporos transportados pelo ar.

SEQ ID	Nome do oligonucleotídeo	Tipo	Sequência e rotulagem de oligonucleotídeos
SEQ ID NO: 1	MoT3_1F	Iniciador direto para qPCR	AGGATGTATGCCCTGACTGG

SEQ ID NO: 2	MoT3_1R	Iniciador reverso para qPCR ¹	CTCGGCGATGCAAAAAGTGAA
SEQ ID NO: 3	MoT3_FA M2	Sonda marcada com 5'FAM e 3'BHQ1	TTCTAACGGTTTGCAATTGCACAAAACAAC
<i>cytb</i> initial PCR			
SEQ ID NO: 7	F1	Iniciador direto	GTTTGAGCTATTGGTACTGTTATATTA
SEQ ID NO: 8	R1	Iniciador reverso	GAAACACCAAGAGGATTGCTT
<i>cytb</i> nested PCR			
SEQ ID NO: 9	F2	Iniciador direto	GGCTATCGGTTTCCTAGGTTATGT
SEQ ID NO: 10	R2	Iniciador reverso ²	TGCCCTATTCAAGGTATAGCACTA
<i>cytb</i> primer for pyrosequencing			
SEQ ID	S1	Iniciador para pirosequencia -mento	GGACAGATGTCATTATGAG

NO:			
13			

¹ Sonda marcada com o fluoróforo FAM na extremidade 5' e com o supressor BHQ1 na extremidade 3'.

² Iniciador marcado com biotina na extremidade 5'.

4.2. qPCR TR com iniciadores e sondas específicas para detecção de alelos mutantes ou selvagem no gene *sdhC* de *Pp*, que conferem ou não resistência a fungicidas inibidores da succinato desidrogenase SDHI.

[029] Antes da detecção quantitativa dos alelos SdhC 86I e I86F, o gene SdhC parcial de *Pp* (381 pb) foi amplificado por PCR convencional para gerar amplicons que foram usados como DNA modelo para a calibração quantitativa da curva padrão nas reações de qPCR TR.

[030] O DNA de dois isolados de *P. pachyrhizi* (PP.SP6 e PP.MG9) foram selecionados para esta etapa inicial do ensaio. As reações de PCR foram conduzidas em um volume final de 30 µL contendo água ultrapura, 50 ng de DNA total, 0,1 µM de cada iniciador (SdhC-5224 F (SEQ ID NO: 14) e SdhC-5223 (SEQ ID NO: 15), conforme Borba, 2020), 0,2 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 3,0 µL de 10 x tampão e 1 U de Taq DNA Polimerase (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA). As amplificações foram realizadas em um termociclador Mastercycler® Nexus (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) usando as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 55 °C de anelamento temperatura por 1 min [43] e 72 °C por 1 min; e extensão final a 72°C por 5 min.

[031] A amplificação positiva dos dois amplicons de PCR foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os produtos de PCR foram purificados com o kit Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EUA) e armazenados para uso posterior. Para a calibração quantitativa das curvas padrão de qPCR TR para cada um dos alelos SdhC, preparou-se diluição seriada de um pool

do DNA molde dos dois isolados para obter as seguintes concentrações em um volume final de reação de 20 µL: 900; 450, 90; 9; 0,9 e 0,09 pg.mL⁻¹.

[032] As reações de qPCR TR foram preparadas com um volume de reação final de 20 µL, contendo 10 µL de 1X Master Mix iTaq Probe (Bio Rad, Hercules, CA, EUA), 1 µL de iniciador direto (KES_2156_86F (A) (SEQ ID NO: 16) ou KES_2155_86I (B) (SEQ ID NO: 17) a 300 nM, 1 µL de iniciador reverso (qPCR-sdhC R (C) (SEQ ID NO:18) a 300 nM, 1 µL da sonda (Probe – sdhC (SEQ ID NO:19) a 150 nM, 3 µL de água deionizada ultrapura e 4 µL de DNA modelo da amostra desconhecida. As reações foram realizadas usando o termociclador qPCR CFX96 (Bio Rad, Hercules, CA, EUA). As seguintes condições de amplificação foram aplicadas: 2 min a 95 °C; (2 - 5 s a 95 °C, 15 - 30 s a 60 °C) por 40 ciclos. Cada reação de qPCR TR foi realizada em duplicata. Os resultados foram analisados usando o software CFX Maestro da Bio Rad.

[033] Esta etapa de detecção por qPCR TR nos permite quantificar a prevalência de cada um dos alelos do gene SdhC codificando para o tipo selvagem SdhC variante 86I (sensível a fungicidas inibidores da succinato desidrogenase SDHI) ou o mutante SdhC 86F (associado com resistência aos SDHI), determinando assim suas frequências relativas em amostras de aerobiologia contendo esporos do patógeno da ferrugem asiática da soja.

Tabela 2: Iniciadores e sonda usados para detecção e quantificação por PCR quantitativo (qPCR) em tempo real da substituição I86F em amostras populacionais de *Phakopsora pachyrhizi*.¹

SEQ ID	Iniciadores e sonda ^{2,3}	Sequência (5' – 3')	Combinação de iniciadores para detecção de alelos específicos
Iniciador direto			

SEQ ID NO: 16	KES_2156 _86F (A)	AAC AGC TAA CTT GGT ATT CCA GG T	SdhC 86F: A + C
SEQ ID NO: 17	KES_2155 _86I (B)	AAC AGC TAA CTT GGT ATT CCA GG A	SdhC 86I: B + C
Iniciador reverso			
SEQ ID NO: 18	qPCR- sdhC R (C)	AAA CCA CCG GAT CAC TGA TGT	
Sonda			
SEQ ID NO: 19	Probe - sdhC ⁴	6-FAM- AACGGGTTGCGCTCTTACAGGAGGTAT TC-BHQ1	

¹Esses iniciadores (primers) amplificam um fragmento SdhC de 103 pb de comprimento Simões *et al.* [2018];

² Primers direto de acordo com Simões et al. Simões *et al.* [2018];

³ Primer reverso de acordo com Borba [2020]; idêntico ao KES_2153 de Simões *et al.* Simões *et al.* [2018];

⁴ FAM = 6-carboxifluoresceína; BHQ1 = *black hole quencher* / extintor de buraco negro 1.

5. Representação descritiva das séries temporais e análises estatísticas e dados finais.

[034] As séries temporais das quantidades diárias de DNA de *PoTI* ou *Pp* detectadas em amostras de aerossóis usando qPCR TR foram resumidas usando os pacotes de software R, dplyr, lubridate, scales, gridExtra, ggthemes, ggplot2 e as funções geom_line, geom_point e facet_wrap.

[035] Com base nos resultados das amostras da curva de calibração que foram testadas em cada execução de qPCR TR, o DNA alvo de *PoTI* foi detectado em 167 das 480 amostras (35%) coletadas e testadas durante o período de 5 de julho de

2019 a 14 de abril de 2021 (Figura 2). A quantidade média de DNA *PoTI* em 2 µL de amostra de DNA foi de 8,9 pg. A maior quantidade de DNA do fungo detectada em todo o período de amostragem de dois anos foi a partir de 5 de setembro de 2019 (1022 ± 13 pg), enquanto valores inferiores a 200 pg de DNA alvo foram detectados em todos os outros dias.

[036] Comparativamente, usando exatamente o mesmo conjunto de amostras de aerobiologia, com base nos resultados das amostras da curva de calibração que foram testadas em cada execução de qPCR TR, o DNA alvo de *Pp* foi detectado em 295 das 480 amostras (61%) coletadas e testadas durante o mesmo período (Figura 3A). A quantidade média de DNA *Pp* em 2 µL de amostra de DNA foi de 628,87 pg. A maior quantidade de DNA do fungo detectada em todo o período de amostragem de dois anos foi a partir de 20 de março de 2021 (115.292 ± 11.576 pg), enquanto valores inferiores a 5.000 pg de DNA alvo de *Pp* em 2020 (Figura 3B) e 63.000 pg em 2021 (Figura 3C) foram detectados em todos os outros dias amostrados.

[037] As séries temporais de um número selecionado de amostras positivas para presença de *PoTI* e *Pp* das quantidades e frequências dos alelos mutantes e selvagem do gene *cytB* de *PoTI* para resistência ou não a fungicidas QoI (dados obtidos por pirosequenciamento), e do gene *sdhC* de *Pp* para resistência ou não a fungicidas SDHI (obtidos por qPCR TR) foram baseados na média de três reações técnicas replicadas.

[038] O fragmento parcial do gene *cytB* representando alelos QoI-resistentes (A143) e/ou QoI-sensíveis (G143) foi amplificado por PCR e pirosequenciado a partir de dez amostras de aerossol *PoTI* positivo que foram coletadas em momentos diferentes durante o período de monitoramento de dois anos. Os alelos A143 que conferem resistência a fungicidas QoI foram detectados em todas as dez amostras de ar testadas, mas houve diferenças nas frequências. Cinco populações de esporos de *PoTI* em aerossóis amostradas durante dezembro de 2019 mostraram uma frequência QoI-R uniforme, entre 52,5 e 74,5%, enquanto frequências mais baixas de 10,1 e 24,6% foram registradas para duas populações amostradas durante junho

de 2020 e frequências entre 14,1 e 91,4% foram detectadas em três amostras coletadas em março de 2021.

[039] O alelo mutante SdhC 86F associado à resistência a SDHI no patógeno da ferrugem asiática da soja foi detectado, por meio de iniciadores específicos de qPCR TR (SdhC 86F: A (SEQ ID NO:16) + C (SEQ ID NO: 18)), em 9 de 13 populações de esporos de *Pp* amostradas no estado do Paraná em 2021, com proporções relativas médias de 46,2%.

6. Divulgação pública, em site da web construído especificamente para orientar tomadores de decisão, dos resultados de aerobiologia, a dinâmica temporal de inóculo, e a detecção de alelos que conferem resistência a fungicidas em populações de esporos de *PoTI* e *Pp*.

[040] Finalmente, propomos, nossa plataforma como uma estratégia antirresistência a fungicida inteligente, como um sistema de alerta baseado em aerobiologia para prever, concomitantemente, epidemias de brusone do trigo e ferrugem asiática da soja e ajudar a minimizar pulverizações de fungicidas (Figura 4). Este sistema implica na detecção direta e prévia dos níveis de inóculo dos patógenos no ar, em combinação com a detecção molecular dos alelos de resistência a fungicidas e patógenos, e pode ser útil para fornecer previsões mais precisas dos riscos de epidemias severas dessas doenças e a propagação de resistência a fungicidas, preferencialmente antes que ocorra, conforme documentado para outros patossistemas importantes. Por exemplo, se altos níveis de inóculo de *PoTI* ou *Pp* no ar coincidirem com o estágio reprodutivo do trigo ou da soja, considerada a fase fisiológica mais suscetível para infecção, pode resultar em infecção foliar severa e altas perdas de rendimento.

[041] Portanto, o monitoramento automatizado do inóculo de *PoTI* ou *Pp* a partir de amostras de aerobiologia, tanto em campos de cultivo, na safra e na entressafra, quanto em escala regional, é um passo muito importante para o desenvolvimento de um modelo de previsão para epidemias de brusone do trigo e ferrugem da soja, baseado em aerobiologia. A aplicação de tal modelo baseado em inóculo evitará

grandes perdas de rendimento das culturas, garantindo que sejam adotadas práticas oportunas e apropriadas de manejo de doenças, permitindo a redução de pulverizações desnecessárias de fungicidas, aliviando a pressão de seleção para resistência e diminuindo o impacto ambiental (Figura 4).

7. Manutenção do ciclo diário de amostragem de esporos e detecção de patógenos fúngicos nas safras e entressafras de soja e de trigo.

[042] Esse sistema de previsão de doenças inteligente e aprimorado, otimizado para monitorar a resistência a fungicidas, individualizado para cada cultura, beneficiará produtores (menor custo de produção), consumidores (segurança alimentar, redução de resíduos em alimentos) e meio ambiente (redução de aplicações de pesticidas), evitando aplicações desnecessárias de fungicidas (sem previsão de epidemia) ou ineficientes (pela ocorrência de altos níveis de resistência) e prolongando a eficácia dos fungicidas.

[043] Para isso, a coleta diária de esporos, a detecção de patógenos fúngicos e o monitoramento molecular da resistência a fungicidas devem ser realizadas continuamente durante as safras e entressafras de soja e trigo para garantir a eficácia contínua do monitoramento dos níveis de inóculo e prevalência da resistência a fungicidas.

REIVINDICAÇÃO

1. MÉTODO DE MONITORAMENTO DE INÓCULO E DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS PARA MANEJO INTEGRADO DA FERRUGEM DA SOJA E DA BRUSONE DO TRIGO, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

- Coleta diária (12 horas/dia), em tubos de 2 mL, de esporos de *Pyricularia oryzae* (*PoTI*) da brusone do trigo e de *Phakopsora pachyrhizi* (*Pp*) da ferrugem da soja, utilizando dispositivo ciclone automatizado de alto volume, com volume de amostragem de 270 litros.min⁻¹;
- Extração e purificação de DNA fúngico das amostras de ar coletadas por método fenólico/clorofórmico e colunas de purificação, em que a cada amostra de ar coletada em tubo de 2 mL foram adicionadas 0,5 g de esferas de vidro esterilizada (400–455 µm de diâmetro) 440 µL de tampão de extração (400 mM Tris-HCl; 50 mM EDTA pH 8; 500 mM de NaCl; 2% de polivinilpirrolidona; 5 mM de mono-hidrato de 1,10-fenantrolina e imediatamente antes do uso, 0,1% de β-mercaptoetanol), em seguida, adicionou-se aos tubos um total de 400 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 2%, que foram invertidos várias vezes para homogeneizar a solução, sendo então incubados a 65 °C em banho-maria por 30 min, misturando-se a cada 10 min, então 800 µL de fenol:clorofórmio (1:1) foram adicionados a cada tubo, que foi brevemente agitado em vórtex e então centrifugado a 13 k rpm por 10 min a 4 °C, para outro conjunto de tubos de centrifugação de 1,5 mL de capacidade, foram adicionamos 30 µL de acetato de amônio 7,5 M, 480 µL de isopropanol e 1 µL do coprecipitante glicoblue a 16 mg.mL⁻¹, o sobrenadante da solução centrifugada foi pipetado para o novo conjunto de tubos e misturado suavemente e colocado em um freezer a -20 °C durante a noite, os tubos foram então centrifugados a 13 k rpm por 30 min a 4 °C e o pellet foi lavado com 200 µL de etanol 70% e centrifugado a 13 k rpm por 5 min, o pellet de DNA, tornado visível por glicoblue, foi seco ao ar em uma cabine de fluxo laminar por 30 min e ressuspenso em 100 µL de 10 mM Tris pH 8,0 e, em seguida,

foi colocado em banho-maria a 65 °C por 5 min para ressuspender totalmente o DNA, antes do armazenamento a -20 °C;

- Detecção dos fitopatógenos em amostras de ar usando qPCR TR, consistindo em 2 µL de amostra de DNA, 13 µL de solução contendo 7,5 µL de sonda KAPA fast qPCR Master Mix e 5.425 µL de água destilada estéril contendo iniciadores MoT3_1F (SEQ ID NO: 1) e MoT3_1R (SEQ ID NO: 2), e a sonda marcada com 5'FAM e 3'BHQ1 MoT3_FAM2 (SEQ ID NO: 3) para detecção de *PoTI* visando um amplicon de 146 pb ou iniciadores Ppm1 (SEQ ID NO: 4) e Ppa2 (SEQ ID NO: 5), e a sonda ASRP1 (SEQ ID NO: 6) marcada com 5'FAM e 3'BHQ1 para detecção de *Pp* visando um amplicon de 138 pb, foi adicionado também o corante de referência Rox (Invitrogen; 0,075 µL por reação);

- Detecção de alelos de resistências a fungicidas nos genes *cytB* de *PoTI* e *sdhC* de *Pp*, sendo o pirosequenciamento utilizado para quantificar os alelos mutantes ou selvagens no gene *cytB* de *PoTI*, a partir do pirosequenciamento dos produtos da PCR aninhado, utilizando TCGTGCTA (SEQ ID NO: 11) como ordem de dispensação e C/GTGCTACAGTTATTACTAATCTTATT (SEQ ID NO: 12) como sequência a ser analisada; enquanto o qPCR com iniciadores (SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 18) e sonda (SEQ ID NO: 19) usado para detectar os alelos mutantes ou selvagens no gene *sdhC* de *Pp*;

- Análise estatística e representação descritiva das séries temporais dos dados, as quantidades diárias de DNA dos fitopatógenos detectados e alelos mutantes e selvagens em amostras de aerossóis foram resumidas e analisadas utilizando software estatístico e pacotes R, dplyr, lubridate, scales, gridExtra, ggthemes, ggplot2 e as funções `geom_line`, `geom_point` e `facet_wrap`.



FIGURA 1A



FIGURA 1B



FIGURA 1C



FIGURA 1D

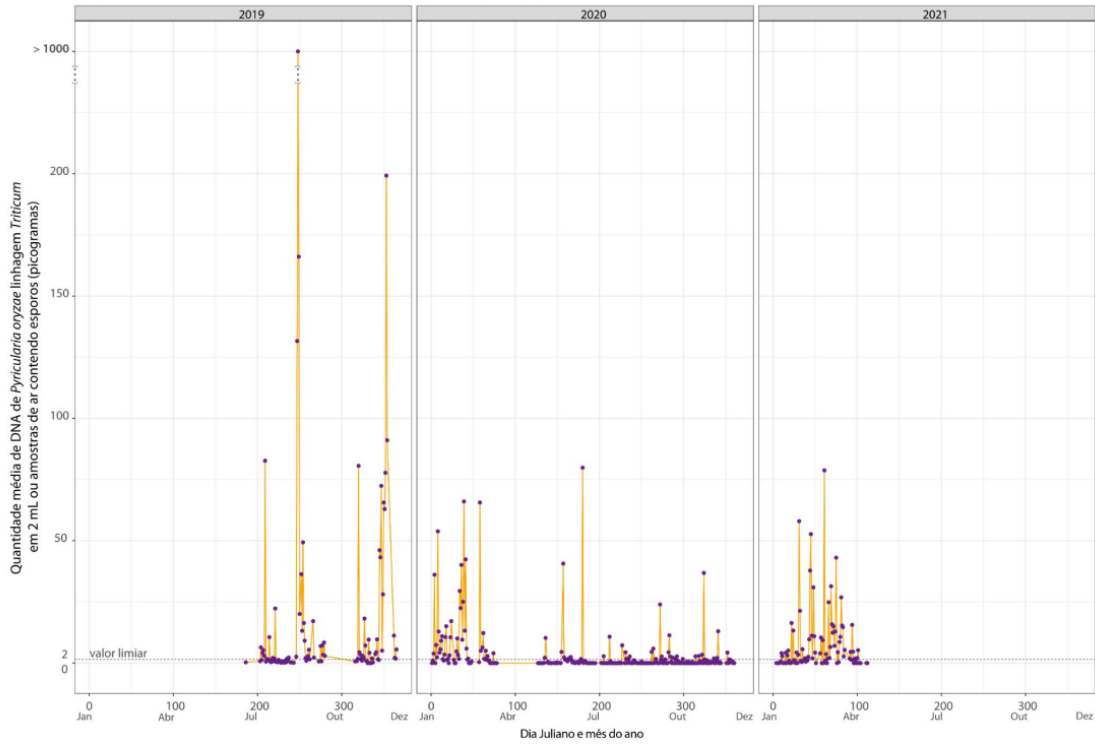


FIGURA 2

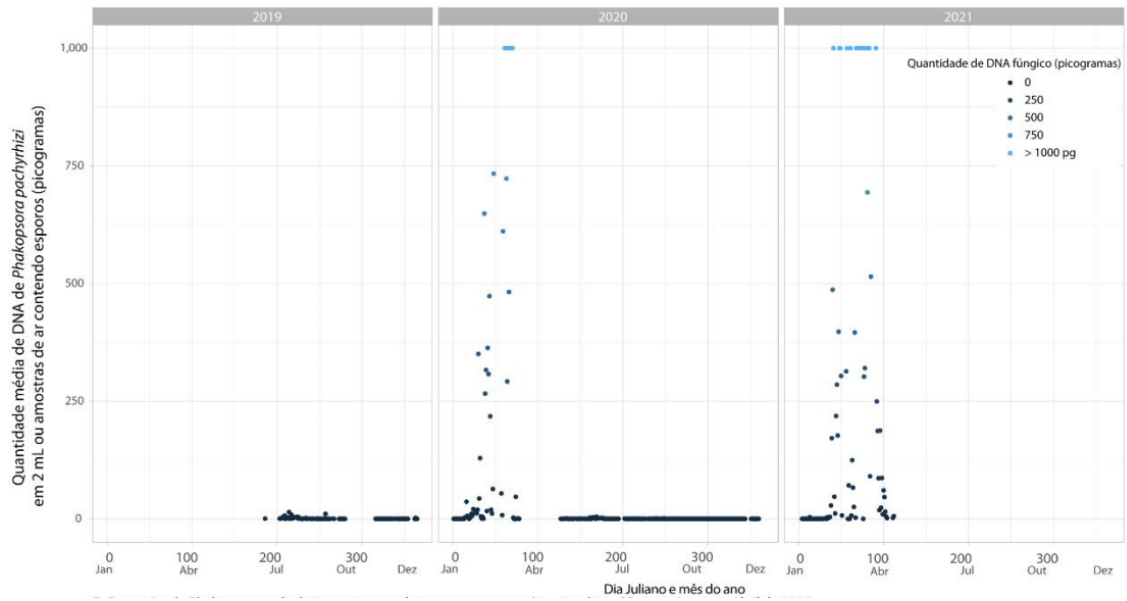


FIGURA 3A

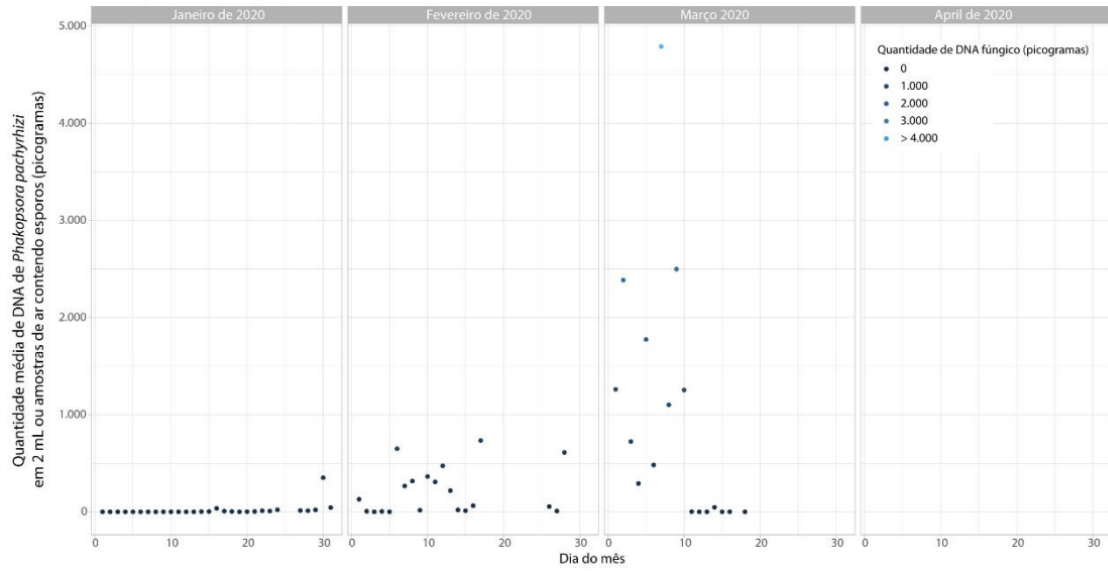


FIGURA 3B

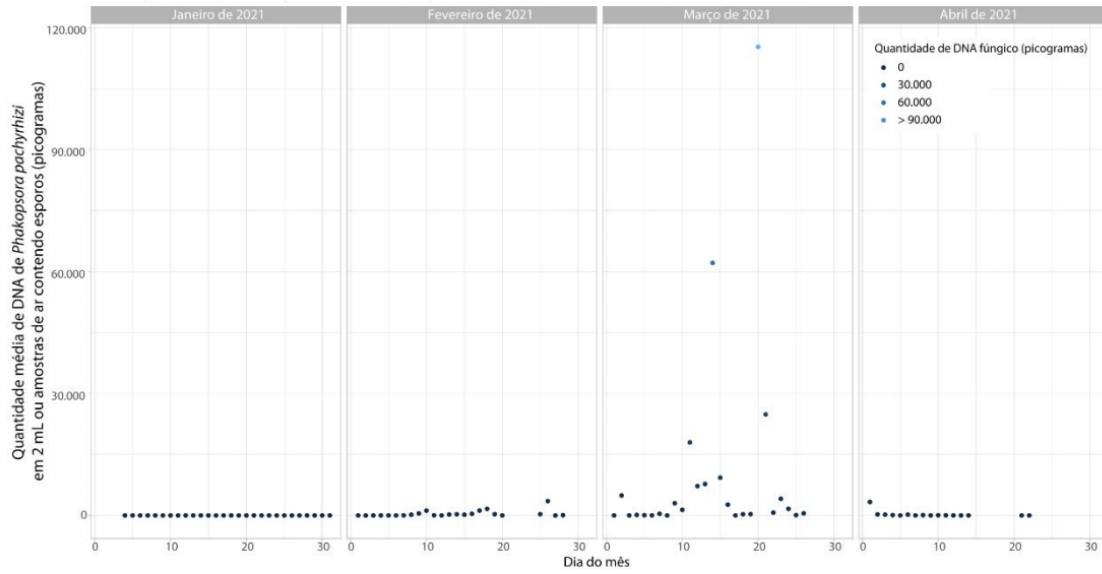


FIGURA 3C

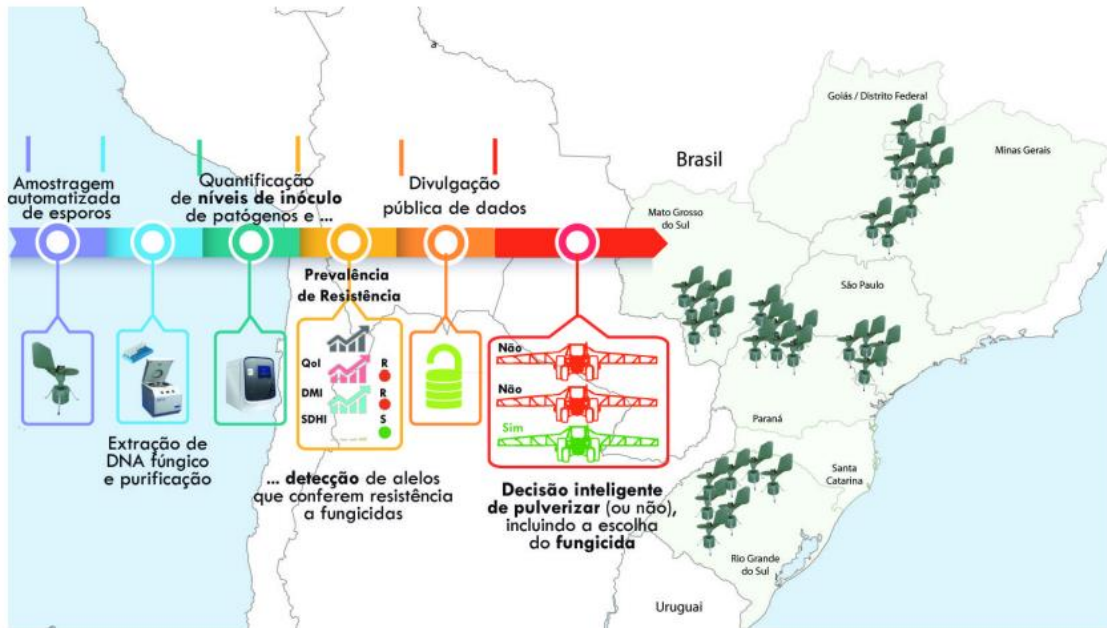


FIGURA 4

RESUMO

MÉTODO DE MONITORAMENTO DE INÓCULO E DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS PARA MANEJO INTEGRADO DA FERRUGEM DA SOJA E DA BRUSONE DO TRIGO

O presente pedido de patente refere-se à um método para monitoramento aerobiológico de inóculo de fitopatógenos e detecção de resistência a fungicidas compreendendo as seguintes etapas: coleta de populações de esporos de fitopatógenos fúngicos em aerossóis usando um dispositivo ciclone automatizado de alto volume para amostragens diárias; extração de DNA fúngico de amostras de ar e purificação; detecção dos fitopatógenos nas amostras de ar usando qPCR em tempo real (qPCR TR) com iniciadores e sondas específicas para os fitopatógenos; detecção de alelos de resistência de genes que codificam para a proteína alvo dos fungicidas; representação descritiva das séries temporais e análises estatísticas e dados finais. Pertencendo ao campo da agricultura e saúde animal, o método permite a detecção precoce de patógenos fúngicos e a identificação de resistência a fungicidas, auxiliando no manejo eficiente de doenças de culturas agrícolas e no desenvolvimento de estratégias sustentáveis de manejo de doenças.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de sequencia _AS
- Data de Geração do Código: 26/04/2024
- Hora de Geração do Código: 16:30:43
- Código de Controle:
 - Campo 1: AB9D8E8B19B3B921
 - Campo 2: 0013D8816EBE2047