

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E**  
**BIOLOGIA MOLECULAR**



**DIVERSIDADE GENÉTICA, TAXONOMIA E PATOGENICIDADE DE**  
*Phytophthora citrophthora* e *P. palmivora*

**MÁRCIA CRISTINA ARAÚJO PAIM**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Junho de 2005**

**MÁRCIA CRISTINA ARAÚJO PAIM**

**DIVERSIDADE GENÉTICA, TAXONOMIA E PATOGENICIDADE DE *Phytophthora*  
*citrophthora* e *P. palmivora***

**Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Santa Cruz,  
como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em  
Genética e Biologia Molecular.**

**MÁRCIA CRISTINA ARAÚJO PAIM**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Junho de 2005**

MÁRCIA CRISTINA ARAÚJO PAIM

DIVERSIDADE GENÉTICA, TAXONOMIA E PATOGENICIDADE DE *Phytophthora*  
*citrophthora* e *P. palmivora*

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Santa Cruz,  
como parte das exigências para obtenção  
do título de Mestre em Genética e Biologia  
Molecular.

APROVADA: 30 de junho de 2005

---

Dr. Álvaro Figueiredo dos Santos  
EMBRAPA/CNPF

---

Dr. José Luiz Bezerra  
CEPLAC/CEPEC

---

Dra. Edna Dora Martins Newman Luz  
CEPLAC – Orientador

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Eliezer Araújo (*in memoriam*) e Maria José Paim Araújo, pelo exemplo de vida, dedico.

À meu irmão Eduardo Paim e a minha orientadora Edna Dora M. N. Luz que me incentivaram a prosseguir na jornada fossem quais fossem os obstáculos, a minha mais profunda gratidão.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me ter proporcionado a vida.

A Dra. Edna Dora M. N. Luz, pela orientação, oportunidade, amizade, ensinamentos, paciência, incentivo, confiança e palavras carinhosas qualidades que somente uma mãe é capaz de proporcionar.

Ao Dr. Jorge Teodoro de Souza pela grande ajuda nas análises moleculares, amizade, companheirismo, presteza e boa vontade.

A CAPES, pelo apoio financeiro na concessão da bolsa de Mestrado, possibilitando o desenvolvimento desta tese.

Aos professores José Luís Pires e Ronan Xavier Correia membros do comitê de orientação pelas preciosas sugestões.

Aos professores do programa de Genética e Biologia Molecular pela dedicação e competência no exercício da docência.

Ao Pesquisador Lindolfo Pereira Santos Filho pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Dr. José Luiz Bezerra pelo incentivo, apoio, amizade, disponibilidade e bons conselhos.

A Dra. Stela Dalva pelas opiniões, sugestões e revisão nesta dissertação.

A Edson Moreira (Michelin), Ângelo Tomás, e aos operários de campo da Seção de Fitopatologia do CEPEC pelo fornecimento de materiais vegetais para os testes de patogenicidade utilizados neste trabalho.

A Dra. Karina Gramacho, Dr. Humberto Zaidan e ao doutorando Ricardo Franco pelas dicas, incentivo e colaboração.

Aos parceiros e cúmplices do laboratório de Fitopatologia: Cenilda Serra, Tita Primo, Lurdinha Alves, Denise Argôlo, Marcos Santos, Magnaldo Nascimento, Joel Feitosa, Eduardo Catarino, Ademilde Cerqueira que me animaram nas horas difíceis, que sorriram para mim, que cooperaram exaustivamente para que tudo desse certo o meu muito obrigado de coração a todos eles.

Ao CFC/ICCO pelo projeto BIOMOL através do qual foi montada a estrutura física do laboratório, no qual trabalhamos.

As pessoas do laboratório de Biologia Molecular: Dr. Milton Macoto Yamada, Cássia Bahia, Brena Farias, Reinaldo Figueiredo e Acassí Flores por terem me concedido o espaço e o apoio.

Ao projeto da World Cacao Foundation (WCF) sob a coordenação da Dra. Edna Dora M. N. Luz por financiar grande parte do material de consumo utilizado nesta pesquisa.

A Fundação Pau Brasil (CEPLAC) e a Nádima Otoniel na aquisição e prestação na entrega dos suprimentos utilizados nesta pesquisa.

A instituição CEPLAC, onde sempre atuei no desenvolvimento de trabalhos de pesquisa, e onde cresci pessoalmente e profissionalmente e a todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste projeto

## ÍNDICE

<b>EXTRATO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
2.1. O gênero <i>Phytophthora</i> .....	4
2.2. <i>Phytophthora citrophthora</i> .....	6
2.3. <i>Phytophthora palmivora</i> .....	9
2.4. Identificação e classificação .....	13
2.5. Estudos moleculares .....	14
2.6. Identificação de novos hospedeiros.....	17
<b>3. CAPÍTULO 1</b>	
<b>PATOGENICIDADE CARACTERIZAÇÃO MORFOBIOLÓGICA E</b>	
<b>MOLECULAR DE <i>Phytophthora</i> sp. EM <i>Anthurium andraeanum</i> NA</b>	
<b>BAHIA</b> .....	18
<b>RESUMO</b> .....	18
<b>ABSTRACT</b> .....	19
3.1. INTRODUÇÃO.....	20
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.2.1. Obtenção e caracterização morfológica do	
isolado.....	21

3.2.2. Produção de oósporos.....	22
3.2.2. Avaliação da patogenicidade.....	23
3.2.3. Extração de DNA.....	23
3.2.4. Sequenciamento e análise filogenética.....	24
3.3. RESULTADOS.....	26
3.3.1. Caracterização morfobiométrica .....	26
3.3.2. Teste de compatibilidade.....	26
3.3.3 Testes de patogenicidade.....	26
3.3.4. Identificação molecular e análise filogenética.....	28
3.4. DISCUSSÃO .....	32
3.5. AGRADECIMENTOS .....	34
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
<b>4. CAPÍTULO 2</b>	
<b>DIVERSIDADE GENÉTICA E TAXONOMIA DE <i>Phytophthora citrophthora</i> e <i>P. palmivora</i> NA BAHIA .....</b>	<b>39</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>39</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>40</b>
4.1. INTRODUÇÃO .....	41
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.2.1. Isolados estudados.....	43
4.2.2. Extração de DNA.....	47
4.2.3. Análise de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	47
4.2.4. Caracterização morfobiométrica.....	48
4.2.5. Avaliação da patogenicidade.....	49
4.2.6. Sequenciamento e análise filogenética.....	49
4.3. RESULTADOS.....	51
4.3.1. Análise de RAPD.....	51
4.3.2. Caracterização morfobiométrica.....	52
4.3.3. Avaliação da patogenicidade.....	53

4.3.4. Análise de diversidade e filogenia com base no sequenciamento de três genes nucleares.....	61
4.3.5. Análise de seqüências da região ITS de rDNA.....	61
4.3.6. Análise de seqüências do fator de alongação 1- $\alpha$ .....	64
4.3.7. Análise de seqüências de $\beta$ -tubulina.....	64
4.3.8. Análise combinada de seqüências da região ITS e fator de alongação 1- $\alpha$ para <i>Phytophthora citrophthora</i> .....	66
4.3.9. Análise combinada de seqüências da região ITS, fator alongação 1- $\alpha$ e $\beta$ -tubulina para <i>Phytophthora citrophthora</i> .....	69
4.3.10. Análise da combinação de seqüências fator de alongação 1- $\alpha$ e $\beta$ -tubulina para <i>Phytophthora palmivora</i> .....	70
4.4. DISCUSSÃO .....	71
4.5. AGRADECIMENTOS .....	75
4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>82</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES .....</b>	<b>84</b>

## EXTRATO

PAIM, Márcia Cristina Araújo, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, junho de 2005. Diversidade genética, taxonomia e patogenicidade de *Phytophthora citrophthora* e *P. palmivora*. Orientadora: Edna Dora Martins Newman Luz. Co-orientador: José Luís Pires. Colaborador: Jorge Teodoro de Souza.

A podridão-parda é a mais importante doença do cacau em termos mundiais. *Phytophthora citrophthora* e *P. palmivora* são as duas mais virulentas espécies que causam podridão-parda no cacau, entre as quatro que foram detectadas na Bahia. Além do cacau, várias outras culturas economicamente importantes são também afetadas por estas espécies. Visando conhecer a diversidade genética dessas espécies, coletas foram realizadas nos municípios da região cacauífera que apresentam maior diversidade de culturas, para ampliar o número de isolados existentes na coleção do CEPEC. Encontrou-se em Ituberá-BA, queima de folhas e flores de antúrio (*Anthurium andraeanum* Lindl.) semelhantes às infecções de *Phytophthora* spp. em outros cultivos. Isolado o patógeno, foram realizados estudos morfológicos, medindo-se 50 esporângios; pareamento com os tipos padrões de compatibilidade A1 e A2 de *P. capsici* e com ele mesmo; e teste de patogenicidade em folhas de antúrio e frutos de cacau. O DNA deste isolado e de outras espécies usadas para comparação foi extraído e seqüenciado para um fragmento da região ITS do rDNA. O patógeno do antúrio foi identificado como *P.*

*citrophthora*. Os estudos de diversidade genética e taxonômica das espécies *P. citrophthora* e *P. palmivora*, principal objetivo deste trabalho, foram realizados com 116 isolados através de RAPD utilizando quatro primers decâmeros (A-13, H-13, H-20 e I-12), estudos morfométricos, testes de patogenicidade e sequenciamento de fragmentos dos mesmos genes acima mencionados. As análises de RAPD distinguiram nitidamente as duas espécies e agruparam os 73 isolados de *P. citrophthora* em 14 subgrupos e os 43 isolados de *P. palmivora* em cinco subgrupos. Representantes de cada um dos subgrupos formados em RAPD foram utilizados para os testes de patogenicidade, estudos morfométricos e sequenciamento. Os testes de patogenicidade foram realizados inoculando-se, sem ferimento os isolados de *P. citrophthora* em frutos de seringueira, cacaueteiro e laranjeira e os de *P. palmivora* em frutos de mamoeiro e cacaueteiro. *Phytophthora citrophthora* apresentou maior diversidade genética que *P. palmivora* tanto nas análises de RAPD quanto nas de sequenciamento. Os isolados de *P. citrophthora* de citros e de cacaueteiro foram geneticamente distintos pelas análises filogenéticas e RAPD apresentando diferenças quanto à formação de clamidósporos e também quanto a patogenicidade, pois, os isolados de cacaueteiro não infectaram frutos de laranja. Os isolados de *P. palmivora* obtidos de cacaueteiro, mamoeiro e pupunheira agruparam-se por hospedeiro em RAPD e  $\beta$ -tubulina e a análise combinada de seqüências desta com o fator de alongação 1- $\alpha$ , diferenciaram os isolados de pupunheira dos demais. Estes isolados apresentaram esporângios maiores e mais alongados que o padrão da espécie *P. palmivora*. Discute-se a classificação dos isolados de cacaueteiro até então identificados como *P. citrophthora* para uma nova espécie e sua provável condição híbrida. Também é discutida a permanência ou não dos isolados de pupunheira na espécie *P. palmivora*.

## ABSTRACT

PAIM, Márcia Cristina Araújo, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Junho de 2005. Genetic diversity, taxonomy, and pathogenicity of *Phytophthora citrophthora* e *P. palmivora*. Advisor: Edna Dora Martins Newman Luz. Committee members: José Luís Pires e Jorge Teodoro de Souza.

Black pod disease of cacao is an economically serious problem in all areas of the world where cacao is grown. *Phytophthora citrophthora* and *P. palmivora* are the most virulent species among the four that cause black pod in Bahia State. Apart from cacao, these species infect other economically important crops in the region. To study the genetic diversity of these species, samples were collected in the cacao-growing region of Bahia State and the isolates obtained were added to the ones in the *Phytophthora* collection located at CEPLAC/CEPEC. Leaves and bracts of *Anthurium andraeanum* showing typical symptoms of *Phytophthora* spp. were found at the municipality of Ituberá-BA. To identify the pathogen obtained from anthurium, morphological studies were done through the measurement of 50 sporangia. Mating studies were conducted by pairing the anthurium pathogen with itself and with standard compatibility types A1 and A2 of *P. capsici* and pathogenicity tests were done on anthurium leaves and cacao pods. DNA from this isolate and isolates from other species used for comparison purposes was extracted and used for sequencing a fragment of the ITS region of the rDNA. The anthurium pathogen was identified as *P. citrophthora* by the combined results of these studies. The genetic diversity and taxonomic studies on *P. citrophthora* and *P. palmivora*, the main objectives of this

work were done with 116 isolates by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) with four 10-mer primers (A-13, H-13, H-20, and I-12), morphological studies, pathogenicity tests, and sequencing of the three nuclear genes mentioned above. RAPD analysis clearly distinguished the two species, grouping the 73 isolates of *P. citrophthora* in 14 subclusters and the 43 isolates of *P. palmivora* in five subclusters. At least one representative of each subcluster was used for pathogenicity tests and sequencing analyses. Pathogenicity tests were done by inoculating *P. citrophthora* on detached cacao pods and on *Citrus* and rubber tree fruits and *P. palmivora* on papaya fruits and cacao pods. *Phytophthora citrophthora* showed a higher genetic diversity than *P. palmivora* according to RAPD and sequencing analyses. The isolates of *P. citrophthora* from *Citrus* and cacao were genetically distinct in RAPD, phylogenetic analyses, chlamydospore formation, and pathogenicity tests on *Citrus* fruits. Isolates of *P. palmivora* from cacao, papaya, and peach palm were grouped according to the host of origin in RAPD, but not by phylogenetic analyses of the ITS region of the rDNA and elongation factor 1- $\alpha$ . However,  $\beta$ -tubulin sequences and sequences from this gene combined with elongation factor 1- $\alpha$  clustered the isolates from peach palm apart from the other *P. palmivora* isolates. These isolates proved to have sporangia longer and narrower than the dimensions established for the species *P. palmivora*. Ultimately, the classification of the isolates from cacao, thus far known as *P. citrophthora* as a new species, their possible hybrid condition, and the taxonomic status of *P. palmivora* from peach palm are discussed.

## INTRODUÇÃO

A podridão-parda é uma das principais enfermidades do cacauero (*Theobroma cacao* L.), estando presente em todos os países do mundo onde o cacau é cultivado. Várias espécies de *Phytophthora* são conhecidas por causar esta doença: *P. palmivora* (Butler) Butler (Griffin 1977), *P. megakarya* Brasier e Griffin (Brasier e Griffin, 1979), *P. capsici* Leonian (Campêlo e Luz, 1981; Zentmyer et al., 1981; Tsao e Alizadeh, 1988), *P. citrophthora* (Smith e Smith) Leonian (Campêlo e Luz, 1981; Bakala, 1981, Mchau e Coffey, 1994; Chowdappa e Chandra Mohanan, 1996), *P. megasperma* Drechsler (Reyes et al., 1972), *P. heveae* Thompson (Turner, 1968; Lozano-Trevino e Romero-Cova, 1984; Luz, 1989) e *P. katsurae* Ko e Chang (Liyanage e Wheeler, 1989). Estas espécies encontram-se distribuídas aleatoriamente nos países onde o cacauero é cultivado, podendo ocorrer, simultaneamente, mais de uma espécie na mesma área (Luz e Silva, 2001).

O gênero *Phytophthora* está amplamente distribuído em todas as áreas geográficas do mundo e é comum o assinalamento de novos hospedeiros para as espécies existentes, principalmente entre plantas nativas ou a observação de novas doenças causadas por estes patógenos em plantas cultivadas (Luz e Matsuoka, 2001).

No Brasil, quatro espécies têm sido associadas com a podridão-parda: *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. palmivora* e *P. heveae*. *Phytophthora capsici*, segundo levantamentos realizados entre 1977 e 1981, era a espécie predominante na Bahia, entretanto, levantamentos recentes mostram tendência de crescimento das populações de *P. palmivora* e *P. citrophthora*, especialmente desta última nas

áreas foco da doença no Estado por ser considerada a espécie mais virulenta ao cacau no país. A espécie *P. hevea* também foi relatada na Bahia, mas é considerada como de patogenicidade moderada. Espécies de *Phytophthora* causam grandes prejuízos nos frutos e atacam também todas as partes vegetativas da planta (Luz et al., 1997). A doença podridão-parda no cacau é um problema economicamente sério em todas as áreas do mundo onde o cacau é cultivado, com perdas anuais que variam de 30 a 90% (Bowers et al., 2001). Estas espécies são reconhecidas como importantes patógenos nos trópicos infectando várias culturas economicamente relevantes, como: cacau, seringueira, pimenta-do-reino, coco, mamão, citros e plantas ornamentais.

Diversas limitações, incluindo o desconhecimento da existência de várias espécies envolvidas na etiologia das doenças causada por *Phytophthora*, as diferenças em virulência das mesmas, e a sua distribuição geográfica, dificultam sobremaneira o manejo dessas doenças. Por isso, o monitoramento das populações de *Phytophthora* spp. nas regiões cacauceiras do Brasil é de extrema importância e deve ser feito constantemente. No entanto, os estudos taxonômicos de espécies de *Phytophthora* de forma clássica, baseados em dados fenotípicos, são dificultados pela plasticidade deste gênero, que possui alguns caracteres de difícil observação em populações naturais, além de, muitas vezes, serem afetados pelo ambiente. Na sistemática do gênero, diversos critérios têm sido adotados, predominando as características morfológicas e biométricas preconizadas pelas chaves de identificação de Waterhouse (1963), Newhook et al., (1978) e Stamps et al., (1990). Entretanto, muitas vezes, tais características tornam-se insuficientes para a classificação. Portanto, é necessário que outros critérios para a identificação das espécies sejam desenvolvidos (Luz e Matsuoka, 1996). De fato, as dificuldades na identificação das espécies de *Phytophthora* têm sido um dos mais sérios entraves para o progresso dos programas de melhoramento de seus hospedeiros no mundo (Luz e Silva, 2001).

Várias técnicas como padrões de proteína totais, isoenzimas e técnicas baseadas em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), incluindo RFLPs (*Random Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), e sequenciamento de diversos genes nucleares e/ou mitocondriais têm sido úteis para determinar diferenças

genéticas ou semelhanças entre as espécies. Dados obtidos através do uso dessas técnicas podem ser combinados aos dados morfológicos para aumentar a confiabilidade dos estudos taxonômicos e/ou de diversidade genética (Sackey et al., 1999). Marcadores genéticos baseados em polimorfismos do DNA têm sido utilizados com sucesso na diferenciação de espécies do gênero *Phytophthora* e entre as vantagens destes marcadores está a menor ambigüidade, a detecção rápida e precisa, a confiabilidade e o fato de não serem influenciados pelas condições ambientais (Goodwin et al., 1989).

Os objetivos deste estudo foram (i) identificar e caracterizar morfológica e molecularmente um isolado obtido de antúrio (*Anthurium andraeanum* Lindl.), durante as coletas para ampliação da coleção de *Phytophthora* do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC); (ii) estudar a diversidade genética de isolados de *P. palmivora* e *P. citrophthora*, por serem as espécies mais patogênicas ao cacau no Brasil; (iii) fazer um estudo taxonômico detalhado das espécies *P. palmivora* e *P. citrophthora* isoladas de diversos hospedeiros, com ênfase em cacau.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O Gênero *Phytophthora*

O gênero *Phytophthora* do Grego (destruidor de plantas) pertencente à classe dos Oomycetes, ordem Pythiales e família *Pythiaceae* foi estabelecido por Anton de Bary em 1876 quando descreveu a espécie *P. infestans* (Mont.) de Barry. Este patógeno, sendo o agente etiológico da requeima da batata (*Solanum tuberosum* L.), que era o principal alimento dos irlandeses nos séculos XVIII e XIX, marcou a história daquele país, pois uma epidemia de requeima dizimou os batatais da Irlanda, causando a morte de aproximadamente um milhão de pessoas e a imigração de um milhão e meio de indivíduos deste país para a América do Norte, entre 1845 e 1846 (Large, 1940). No século XX e também no século XXI as espécies de *Phytophthora* continuaram a sua trajetória marcante como destruidoras de plantas, sendo responsáveis por grandes perdas de árvores nativas, com impacto ecológico negativo em florestas na Austrália, Europa e América do Norte. A espécie *P. cinamomi* Rands se expandiu no sul da Austrália, a partir do início dos anos 60 causando um severo surto de cancro em florestas nativas de eucaliptos (*Eucalyptus marginata* Sm.) provocando consequências catastróficas para o ecossistema da região (Wills, 1993). Recentemente, uma nova doença, conhecida como morte súbita do carvalho, que infecta *Lithocarpus densiflorus* Hook e Arn, *Quercus agrifolia* Nee, *Q. kelloggii* Newberry e *Q. parvula* var. *shrevei* (C. H. Muller) Nixox, na Califórnia, teve seu

agente etiológico identificado como *Phytophthora ramorum* Werres e Coock, uma nova espécie descrita em 2001. Esta doença alcançou proporções epidêmicas nas florestas da Califórnia, onde está associada à alta mortalidade de árvores (Rizzo et al., 2002). Como nos exemplos acima citados, todas as espécies de *Phytophthora* conhecidas, são patogênicas e responsáveis por severos danos em culturas economicamente importantes no Brasil e no mundo. No Brasil, até 2004, haviam sido identificadas 19 espécies de *Phytophthora* causando danos em 68 culturas diferentes (Luz e Matsuoka, 2001; Santos et al., 2004).

No século XX houve consideráveis debates sobre a evolução dos Oomycetes e conseqüentemente sobre sua classificação. Esta classe passou do reino Mycetae (Fungi), para o reino Protista (Margulis, 1990) ou Chromista (Cavalier-Smith, 1986,1989; Barr, 1992; Dick, 1995a, b), e atualmente, segundo Alexopoulos et al., (1996), pertencem ao reino Stramenopila. Os Oomycetes compartilham muitas características ecológicas e biológicas com os verdadeiros fungos, porém, eles são claramente distintos dos Basidiomycetes e Ascomycetes pelos mecanismos reprodutivos e genéticos (Erwin e Ribeiro, 1996). Dentre as características diferenciais, estão variações das rotas metabólicas (Hendrix,1970; Wang e Bartnicki-Garcia 1973; Elliott, 1983); presença de  $\beta$ -glucanas em lugar de quitina nas paredes celulares (Bartnicki-Garcia e Wang 1983); produção de zoósporos móveis possuindo dois flagelos com diferentes formas e comprimentos (Desjardins et al., 1969); e predominância da diploidia dentro do seu ciclo de vida (Erwin e Ribeiro, 1996). Os Oomicetes estão relacionados com as algas diatomáceas e marrons dentro do reino Stramenopila (Deacon, 1997). Os Oomycetes estão incluídos em um único grupo eucariótico de fitopatógenos que evoluiu com a habilidade para infectar plantas, sugerindo que possam ter mecanismos genéticos e bioquímicos distintos dos fungos verdadeiros, para interagir com as plantas (Erwin e Ribeiro, 1996).

O gênero *Phytophthora*, entre outras características marcantes, apresenta quatro tipos de propágulos infectivos, sendo três assexuados (esporângio, zoósporo e clamidósporo) e um sexuado (oósporo) o qual pode ser formado homo ou heterotalicamente. A presença ou ausência e a morfometria destes propágulos são caracteres taxonômicos relevantes. Os esporângios podem germinar diretamente, dependendo da temperatura ambiente, ou liberar os zoósporos

biflagelados, diferenciados na cavidade esporangial, em número médio de 30 a 35 por esporângio, que então irão infectar os hospedeiros disponíveis. Os clamidósporos são esporos de resistência e podem permanecer no solo e em restos de cultura, por até dois anos, dependendo da espécie e das condições ambientais. Os oósporos, que germinam produzindo esporângios, além de serem fontes de inóculo com sobrevivência maior do que os esporângios e zoósporos propiciam a recombinação genética e a hibridização das espécies. Além destes tipos de esporos, o micélio também pode causar infecções (Luz e Matsuoka, 2001).

Atualmente, mais de oitenta diferentes espécies de *Phytophthora* estão referidas na literatura (Ho e Lu, 1997), das quais várias são comprovadamente inválidas e outras precisam ter sua validade confirmada. O certo é que anualmente novas espécies são descritas para acomodar isolados com características distintas das espécies já existentes, em função da variabilidade existente e da complexidade taxonômica do gênero (Luz e Matsuoka, 1996).

*Phytophthora citrophthora* e *P. palmivora* serão estudadas com maiores detalhes neste trabalho.

## **2.2. *Phytophthora citrophthora***

Na sinonímia de *P. citrophthora* estão incluídos os binômios *Pythiacystis citrophthora* Smith e Smith (1906) e *P. imperfecta* var. *citrophthora* (Smith e Smith) Sarejanni (1936). *Phytophthora citrophthora* foi isolada pela primeira vez por Smith e Smith (1906) de limões apodrecidos e desde então é reconhecida como um dos principais patógenos dos *Citrus*, causando podridão da coroa, gomose, podridão fibrosa da raiz, e podridão marrom em frutos.

Na revisão bibliográfica, *P. citrophthora* e *P. terrestris* Sherbakoff = *P. parasitica* Dastur = *P. nicotianae* Breda de Haan são causadoras da gomose do *Citrus* na Califórnia, Estados Unidos, Fawcett (1923). Klotz e Calavan (1978) fizeram uma revisão adicional na diagnose e controle das doenças incitadas em *Citrus* por *P. citrophthora*, e outras espécies (*P. nicotianae*, *P. syringae* (Klebahn) Klebahn e *P. hibernalis* Carne) mencionando uma epidemia destrutiva de gomose que ocorreu, na Espanha no século X. O mesmo autor relata que essa

enfermidade teria sido a causa da destruição de quase todas as árvores cítricas na Sicília, no final do século XIX. A gomose foi observada pela primeira vez na Califórnia em 1875. Como ocorrem em outras culturas, um complexo de espécies de *Phytophthora* infectam as plantas cítricas, destacando-se *P. citrophthora*, que prevalece quando a temperatura média do ar é inferior a 30°C e *P. nicotianae*, quando a temperatura média é superior a 30°C. Há, portanto uma sazonalidade na ocorrência das espécies que atacam citros nas regiões de clima mediterrâneos onde *P. citrophthora* ocorre no período de outono, inverno e primavera e *P. nicotianae* durante o verão (Klotz e Calavan, 1978).

Além de ser um importante patógeno em *Citrus*, *P. citrophthora* foi identificada também em mais de 60 outras espécies vegetais, incluindo plantas ornamentais, arbustos e árvores de grande porte (Erwin e Ribeiro, 1996). Alguns relatos de hospedeiros referem-se só ao Brasil como é o caso de *Anthurium andraeanum* Lindl e *Anthurium* spp. (Pitta et al., 1991). Outros, no entanto são relatados em culturas de grande importância e em vários países, como no cacau onde *P. citrophthora* foi assinalada causando podridão-parda no Brasil (Campêlo e Luz, 1981; Kellam e Zentmyer, 1981 e 1986), no México (Lozano e Romero, 1984), e na Indonésia (Mchau e Coffey, 1994) e da seringueira, na China (Tu et al., 1986), no Brasil (Silveira et al., 1986; Luz et al., 2003), na Costa do Marfim e na Indonésia (Liyanage e Wheeler, 1989).

Entre as espécies que afetam o cacau na Bahia, *P. citrophthora* é a mais virulenta a frutos (Campêlo et al., 1982), raízes e plântulas de cacau (Luz, 1989; Luz e Mitchell, 1994), tendo sido isolada de frutos, troncos (cancro) e de raízes em condições naturais (Campêlo e Luz, 1981; Luz e Mitchell, 1994).

Isolados de frutos de cacau foram patogênicos a frutos, caules, e raízes de cacau, mas não foram patogênicos a citros; reciprocamente, isolados de citros não foram patogênicos a cacau (Kellam e Zentmyer, 1986).

*P. citrophthora* nas chaves de Waterhouse (1963) e Stamps et al. (1990) se encontra classificada no grupo II, juntamente com *P. hevea*, *P. palmivora*, *P. capsisi*, *P. mexicana*, *P. meadii*, *P. boehmeriae*, *P. arecae* e *P. nicotianae*. Essa espécie apresenta micélio cotonoso, os esporângios são papilados ou bipapilados, e não decíduos embora, segundo Stamps et al., (1990), possam ser decíduos em alguns isolados. Mchau e Coffey (1994) quando redescreveram a

espécie informaram que todos os 77 isolados por eles estudados produziram esporângios não decíduos. As formas desses esporângios são extremamente variáveis. Segundo Mchau e Coffey (1994), a maioria dos isolados de citros não formam clamidósporos, porém, os isolados provenientes de cacau sempre produzem essas estruturas. A temperatura mínima de crescimento da espécie é de 5°C, sendo considerada ótima em torno de 24°C a 28°C, e a máxima entre 32°C e 33°C. Em geral, a reprodução sexual com a formação de oósporos não faz parte do ciclo vital de *P. citrophthora*. Não há referência à formação dos gametângios feminino (oogônio) e masculino (anterídio) na descrição original da espécie e nem nas chaves mais recentes (Stamps et al., 1990). No entanto, quatro isolado obtido de cacau do Brasil formou oósporos quando cruzados com um isolado A2 de citros (P318 da Austrália), e um isolado de cacau formou oósporos quando cruzado com P717 (A1), um isolado de *P. citrophthora* de hospedeiro desconhecido da Nova Zelândia (Kellam e Zentmyer, 1986). Nenhum dos isolados de cacau produziu oósporos quando cruzados entre eles, embora alguns tenham sido cruzados com isolados de citros de compatibilidade A1 e com outros do tipo A2. Assim, Kellam e Zentmyer (1986), concluíram que a compatibilidade sexual no sistema de pareamento em *P. citrophthora*, provavelmente é mais complexa que o sistema A1/A2 encontrado habitualmente para as espécies heterotáticas deste gênero.

Mchau e Coffey (1994) relataram que menos de 30% dos 77 isolados de *P. citrophthora* por eles estudados, produziram oósporos quando pareados com um isolado *P. capsici* tipo A2. No Brasil, Campêlo e Luz (1981) relatam a infertilidade dos isolados de *P. citrophthora* de cacau quando cruzados com os tipos compatíveis A1 e A2 de *P. capsici* ou de *P. palmivora*.

Um estudo dos padrões de isoenzimas de 32 isolados de *P. citrophthora* de vários hospedeiros, incluindo de *Citrus* spp., *Theobroma cacao* L., *Actinidia deliciosa* A. Chev., *Hevea brasiliensis* Muell. Arg., *Juglans* spp., *Fragaria* spp., *Pistacia Vera* Linn, *Ficus elástica* Roxb., *Prunus domestica* A. Savat., *Amygdalus communis* Bunge, *Ribes sanguineum* Pursh e *Coptis japonica* Makino, indicou que *P. citrophthora* é geneticamente relacionada com *P. capsici*, tendo sido definidos entre os isolados estudados dois subgrupos, CITR1 e CITR2, com os isolados de citros agrupados em CITR1, e os de cacau no subgrupo CITR2 (Oudemans e

Coffey, 1991). Através da amplificação do DNA ribossômico (rDNA), Lee e Taylor (1992), mostraram uma relação íntima entre os isolados de *P. capsici* obtidos de cacauzeiro [= *P. palmivora* MF4] e *P. citrophthora*.

Mchau e Coffey (1994) classificaram isoenzimaticamente 77 isolados de *P. citrophthora* provenientes de 30 hospedeiros diferenciando-os em três subgrupos: o CTR1 com isolados obtidos de áreas geográficas distintas e de ampla gama de hospedeiros, incluindo citros; o CTR2 exclusivamente composto por isolados de cacauzeiro do Brasil e o CTR3 que incluiu isolados de cacauzeiro da Indonésia.

Ficou evidenciado em todos esses estudos que, muitos aspectos da taxonomia do grupo de isolados de cacau classificados como *P. citrophthora* ainda precisam ser esclarecidos.

### **2.3. *Phytophthora palmivora***

Os sinônimos de *Phytophthora palmivora* incluem *P. omnivora* de Bary (1881), *Pythium palmivorum* Butler (1907), *P. faberi* Maublanc (1909), *P. theobromae* Coleman (1910), *Kawakamia carica* Hara (1918), *P. fici* Hori (1915), *P. carica* Hara (1916), *P. palmivora* var. *piperis* Muller (1936) e *P. palmivora* var. *theobromae* (Coleman) Orellana (1959). No entanto, Butler em 1907, relatou *P. palmivorum* como o agente causal da podridão do broto em palmeiras na Índia, e o renomeou em 1919 como *P. palmivora* (Butler) Butler, epíteto considerado válido para a espécie até os dias atuais (Erwin e Ribeiro, 1996).

*Phytophthora palmivora* é um patógeno amplamente distribuído tanto nas áreas tropicais como subtropicais do mundo (Chee, 1973), infectando mais de 166 espécies vegetais de vários gêneros economicamente importantes, dentre os quais: *Cocos nucifera* L., *Hevea brasiliense* Muel. Arg., *Theobroma cacao* L., *Carica papaya* L., *Piper nigrum* L., e várias espécies do gênero *Citrus*. Esta espécie é também patogênica a plantas ornamentais e diversas fruteiras. Segundo Zentmyer (1988) a espécie provavelmente originou-se na América do Sul ou Central e foi transportada pelo homem, em plantas infectadas, ao redor do mundo.

Como patógeno do cacauzeiro, *P. palmivora* foi assinalada pela primeira vez em 1898, embora a primeira epidemia de podridão-parda que ocorreu no

cacaueiro tenha sido descrita em 1727, em Trinidad, sem ainda conhecer-se a sua causa (Rorer, 1910). Na Bahia, os registros mais antigos de podridão-parda do cacaueiro ocorreram nas viagens de dois naturalistas Zehntner e Torrend à região entre 1914 – 1917 (Campêlo e Luz, 1981). Àquela ocasião o patógeno foi chamado *P. faberi* Maublanc (sinônimo de *P. palmivora*) (Torrend, 1917).

Durante mais de 50 anos *P. palmivora* foi considerada como a única espécie que causava podridão-parda do cacaueiro em todo o mundo, porém, características diferentes em isolados de *P. palmivora* de cacaueiro e de outros hospedeiros já haviam sido descritas por vários pesquisadores. Na realidade no caso do cacaueiro, havia mais de uma espécie envolvida, conforme foi demonstrado posteriormente, baseado no comprimento do pedicelo (Zentmyer et al., 1977; Idosu e Zentmyer, 1978; Kaosiri et al., 1978), morfologia de esporângios e oogônios (Brasier et al., 1981), e no tamanho e número de cromossomos (Sansome et al., 1975). Em 1976 na Inglaterra foi realizado um seminário internacional, onde os isolados foram subdivididos nos grupos MF1, MF2, MF3, e MF4 (Griffin, 1977; Brasier e Griffin, 1979). MF1 foi considerada a forma “típica” denominada *P. palmivora* sensu Butler. MF2, que apresentava esporângios com formas diferentes foi demonstrada por Brasier et al., (1981) que não podia ser aceita como uma espécie válida, devendo ser considerada uma variante de *P. palmivora*. MF3 foi descrito como uma nova espécie, *P. megakarya* Brasier e Griffin, por apresentar núcleos maiores contendo de cinco a seis cromossomos grandes, quando comparados com os nove a 12 cromossomos pequenos de *P. palmivora*. MF4 com esporangióforos mais alongados, caducos e com pedicelos longos, se assemelhava a *P. capsici* e passou a ser assim classificado (Alizadeh, 1983; Campêlo e Luz, 1981; Zentmyer et al., 1981). Tsao e Alizadeh (1988) e Tsao (1991), redescobriram a espécie *P. capsici* para incluir estes isolados do grupo MF4 do cacaueiro.

Portanto, todas as enfermidades de plantas relatadas na literatura mundial anteriormente a 1979 como sendo causadas por *P. palmivora*, tanto em cacaueiro como em outros hospedeiros (pimenta-do-reino, coqueiro, mamoeiro), podem não estar etiologicamente corretas. Em cacaueiro, por exemplo, há muitos isolados que foram designados como *P. palmivora* e agora se sabe que poderiam ser *P. megakarya* ou *P. capsici* (Erwin e Ribeiro, 1996).

*Phytophthora palmivora* foi classificada no grupo II e descrita em detalhes por Waterhouse (1974b) e Stamps (1985). Os esporângios têm formas variáveis, dependendo do isolado, predominando os formatos elíptico e ovóide, são decíduos, caracterizados por pedicelos curtos (inferior a 5 µm) com papilas proeminentes. Os clamidósporos globosos ou subglobosos são terminais ou intercalares na maioria dos isolados. *Phytophthora palmivora* sendo uma espécie heterotática, forma oogônio, anterídio e oósporos quando cruzadas com isolados dos tipos A1 e A2 (Ashby, 1929; Brasier e Griffin, 1979). Os oogônios são esféricos e os anterídios são anfígenos (Waterhouse, 1974b). Na Bahia, foram feitos vários pareamentos entre isolados de *P. palmivora* e *P. capsici* de tipos compatíveis diferentes, resultando na produção de oósporos (Campêlo e Luz, 1981).

Babacauh (1983) cruzou um isolado A2 de *P. palmivora* com um isolado A1 de uma espécie que ele considerou “próxima a *P. citrophthora*”, ambas de cacauero, e notou que a anfígenia dos anterídeos pode ser resultante da habilidade que certas hifas apresentam em diferenciarem-se na extremidade em ambos os gametângios (anterídio ou oogônio).

A temperatura mínima para crescimento desta espécie é de 11°C, a ótima entre 27,5 a 30°C e a máxima, próxima a 35°C (Waterhouse, 1974a).

Em termos de patogenicidade ao cacauero, *P. palmivora* causa em frutos, lesões menores que *P. citrophthora* e maiores que aquelas causadas por *P. capsici* e *P. hevea* (Campêlo et al., 1982; Lawrence et al., 1982). Esta espécie foi isolada de todas as partes da planta incluindo as raízes (Luz e Mitchell, 1994).

Tucker (1931) considerou *P. arecae* e *P. meadii* sinônimos de *P. palmivora*. Oudemans e Coffey (1991b, c) trabalhando com isoenzimas, demonstraram que *P. arecae* e *P. palmivora* estavam geneticamente relacionadas e que provavelmente são sinônimas. Este resultado foi apoiado por Mchau e Coffey, (1994a), que encontrou seis isolados, previamente identificados como *P. arecae*, agrupados com *P. palmivora*. Os isolados de ambas as espécies foram morfológicamente semelhante de acordo com os padrões isoenzimáticos, e que, portanto, *P. arecae* deveria ser sinônimo de *P. palmivora*. Estes autores também sugeriram que *P. palmivora* originou-se do sudoeste da Ásia e não nas Américas como sugerido por Zentmyer (1988).

Estudos empregando isoenzimas em isolados de *P. palmivora* de cacauero mostraram que os isolados estudados eram geneticamente relacionados, porém, um número limitado de isolados obtidos de coco foram geneticamente diferentes dos isolados de *P. palmivora* de cacauero (Oudemans e Coffey, 1991b, c). Um estudo subsequente por Mchau e Coffey (1994a) incluiu 93 isolados de *P. palmivora* de cacauero e de muitos outros hospedeiros, além de seis isolados descritos como *P. arecae* de “arecanut”. Estes isolados foram comparados morfológicamente e através de padrões de isoenzimas. Os padrões de isoenzimas consistiram em 18 tipos eletroforéticos (ETs). A maior diversidade genética foi encontrada entre os isolados de coco e de durian (*Durio zibethinus* Murr), em número de 8 e 5 Ets, respectivamente .

Ortiz-Garcia (1996) trabalhou com 198 isolados de *P. palmivora* de cacauero de diferentes localidades no mundo e encontrou proximidade genética entre os isolados da África e da América Latina. A maior diversidade genética foi obtida entre os isolados do sudeste asiático principalmente da região do norte Sulawesi na Indonésia, onde também se verificou maior diversidade entre os isolados de coco por ele estudado. O autor concluiu que o sudeste da Ásia deve ser o centro de origem da espécie apoiando a sugestão de Mchau e Coffey (1994) e discordando de Zentmyer (1988). No entanto, Ortiz-Garcia (1996) trabalhou com eletroforese de enzimas que pode ser usada na distinção entre proteínas, mas não detecta as substituições de aminoácidos se a carga da proteína não for modificada. Além disso, as enzimas nem sempre representam o genoma. Somente estudos de DNA podem detectar a variabilidade genética existente entre diferentes genótipos (Ducamp et al., 2004). Sackey et al. (1999), estudando isolados de *P. palmivora* e *P. megakarya* da África sugeriram a existência de variação entre e dentro os isolados destas duas espécies, através da técnica de RAPD. A mesma técnica foi usada para estudar 28 isolados de *P. palmivora* obtidos de plantas diversas tendo sido observado que os isolados de bambu, coco, baunilha e mamão separavam-se claramente dos isolados de cacauero e agrupavam-se próximos aos de seringueira e durian (Ducamp et al., 2002). Na Bahia, Faleiro et al. (2004), utilizaram 22 isolados de *P. capsici*, *P. palmivora* e *P. citrophthora* em estudos com marcadores RAPD para diferenciar as espécies e observaram pequena variação intraespecífica entre os isolados de *P. palmivora* e

de *P. citrophthora*. No entanto, o número de isolados utilizados de *P. palmivora* (5) e de *P. citrophthora* (9) foi muito pequeno. Mesmo assim foi possível através desta técnica separar as três espécies estudadas.

#### **2.4. Identificação e Classificação**

Um dos maiores problemas no estudo das espécies de *Phytophthora* reside na taxonomia e sistemática do gênero. A partir da década de 60, com os trabalhos de Waterhouse (1963, 1970a, 1970b e 1983) surgiram as chaves baseadas em critérios morfofisiológicos que vem sendo usados até hoje pelos micologistas e fitopatologistas com certa confiabilidade para estudar as espécies de *Phytophthora* descritas naquelas chaves (Brasier, 1991). A chave taxonômica mais recente é a de Stamps et al., (1990) que consiste numa revisão da chave tabular de Newhook et al. (1978) com os critérios de agrupamento propostos por Waterhouse (1963). Nesta chave 67 espécies de *Phytophthora* são consideradas válidas (Luz e Matsuoka, 1996). Na década de 90 várias outras espécies foram assinaladas. No entanto, como variações nos caracteres morfológicos são freqüentes, há dificuldades na identificação das espécies, principalmente, porque algumas delas são tão variáveis em relação a determinados critérios taxonômicos que torna-se difícil classificá-las com base apenas na morfologia e fisiologia (Brasier et al., 1981; Erwin e Ribeiro, 1996). As dificuldades com estudos taxonômicos no gênero *Phytophthora* são reconhecidas por vários autores (Waterhouse, 1983; Gallegly, 1983; Brasier, 1991; Luz e Matsuoka, 1996). Sabe-se também que são necessários mais conhecimentos sobre a biologia e a genética das espécies para tornar possível, estudos sistemáticos agrupando critérios morfológicos, fisiológicos, patológicos e moleculares para assim, aplicar um enfoque populacional semelhante ao proposto por Brasier (1991, 1992), que tornará possível inclusive o estudo das relações genéticas entre as espécies e da sua evolução (Luz e Matsuoka, 1996).

Entre os critérios morfológicos mais utilizados nas chaves taxonômicas estão a ontogenia e forma dos esporângios ou esporangióforos e suas dimensões, a presença da papila (papilados ou não papilados) e suas dimensões; se os esporângios são persistentes ou decíduos, e se decíduos, se o pedicelo é

curto, médio ou longo; se a fase sexual é homotática (isolado autofértil) ou heterotática (espécie que só forma oósporo quando cruzada com um isolado do tipo compatível A1 com um complementar A2) e, se o tipo de anterídio é parágino ou anfígeno ao oogônio. As medidas dos oósporos e oogônios são também consideradas. Outros critérios secundários adicionais que podem separar algumas espécies são: a natureza unicelular ou bicelular dos anterídios, a taxa de crescimento a diferentes temperaturas, a produção ou não de clamidósporos e a patogenicidade, a um ou vários hospedeiros padrões (Santos e colaboradores, dados não publicados).

A identificação precisa e rápida de espécies de *Phytophthora* em plantas é desejável devido à ocorrência de várias espécies associadas à mesma doença e causando sintomas similares, só identificáveis através do exame direto do patógeno nos tecidos infectados, ou das culturas, após o isolamento (Luz e Matsuoka, 1996).

Avanços em métodos moleculares permitiram o estudo das relações filogenéticas dentro do gênero *Phytophthora*. Várias técnicas moleculares como: padrões de proteínas, isoenzimas, RFLP (*Random Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), e seqüências da região ITS têm sido úteis para determinar diferenças genéticas ou semelhanças entre as espécies, subsidiando, a solução de alguns dos mais graves problemas na sistemática do gênero, podendo em combinação com dados morfológicos, solucionar questões relativas à fusão ou separação de espécies.

## **2.5. Estudos Moleculares**

Análises genéticas modernas em populações de espécies de *Phytophthora* começaram durante meados dos anos 80 quando os primeiros relatos na variação de isoenzimas em *P. cinnamomi* e *P. infestans* foram publicados.

Os padrões eletroforéticos de proteínas foram aplicados com sucesso para a separação de morfoespécies dentro do grupo *P. palmivora* patogênico ao cacauero (Koasiri e Zentemeyer, 1980; Erselius e Shaw, 1982) e comprovaram a uniformidade de isolados dessa espécie provenientes de diferentes regiões do mundo ou de diferentes hospedeiros (Erselius e De Vallavieille, 1984; Brasier et

al., 1989). No entanto, a análise de isoenzimas, apresentou maior potencial para discriminação de táxons do que os padrões de proteínas totais (Brasier, 1991). Com base neste critério Mchau e Coffey (1994a, b) fizeram seus estudos com *P. citrophthora* e *P. palmivora* detectando diferenças entre isolados de diversos hospedeiros e locais, observando a formação de subgrupos dentro destas espécies que os levaram a redescrever *P. citrophthora*.

Como o número de cromossomos e o conteúdo de DNA variam muito entre as espécies de *Phytophthora* o estudo genômico destas espécies é muito importante.

As similaridades entre *P. capsici* e *P. citrophthora* foram demonstrados através de isoenzimas (Oudemans e Coffey, 1991; Ortiz-Garcia, 1996) e análises de seqüência ITS (Forster et al., 1995; Appiah et al., 2003). Os baixos níveis de variação intraespecífica dificultaram a separação das duas espécies (Lee e Taylor, 1992), no entanto, morfologicamente estas duas espécies diferem muito entre si o que levou Oudemans et al. (1994) a questionar se órgãos sexuais e morfologia de esporângios são critérios úteis na construção de modelos filogenéticos como sugerido por Brasier (1983). Existem diversas outras evidências da importância das análises de isoenzimas na detecção de diferenças nos táxons, morfologicamente similares, ou na identificação e distinção de grupos taxonômicos sub-específicos de *Phytophthora* (Luz e Matsuoka, 1996).

Padrões de RFLP distinguiram isolados de espécies bem estabelecidas como *P. palmivora*, *P. parasitica*, *P. citricola* e *P. citrophthora* de *Citrus*. Do mesmo modo isolados de cacaueteiro: *P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. citrophthora* e *P. capsici* foram diferenciados por perfis de RFLP (Forster et al., 1990; Oudemans e Coffey, 1991; Martin e Tooley, 2004).

Faleiro et al. (2003, 2004), usaram marcadores RAPD para diferenciar as espécies de *Phytophthora* que infectam o cacaueteiro e conseguiram observar que era possível identificar isolados desconhecidos usando estes marcadores e que as espécies que causam podridão-parda na Bahia apresentavam padrões diferenciados. No entanto, o uso de marcadores RAPD na taxionomia de espécies pode ser questionável (Jones et al., 1997). Ficou assim evidenciada a necessidade de se obter e estudar um número maior de isolados das espécies

que causam podridão-parda no cacauero, no Brasil, como de outros hospedeiros e conhecer a variabilidade genética dos mesmos.

Usando a variação da região ITS (*Internal transcribed spacer*), Forster et al. (1995) compararam várias espécies de *Phytophthora*. Combinando estes dados aos obtidos através de isoenzimas e estudos de RFLP os autores concluíram que a variabilidade genética de várias espécies, entre elas *P. palmivora* foi limitada e que *P. citrophthora* possui uma variabilidade genética mais ampla que *P. palmivora*. Estes resultados demonstraram que a evolução da região ITS de rDNA não apresenta boa correlação com os critérios morfológicos atualmente utilizados na sistemática das espécies.

Appiah et al. (2003) estudaram a caracterização morfométrica de isolados de *Phytophthora* em cacauero e demonstraram as dificuldades encontradas na identificação de espécies apenas baseando-se no uso dos caracteres morfológicos, apesar, dos resultados obtidos por Brasier e Griffin (1979) em relação a essas espécies. Ao realizarem análises moleculares em 2004, utilizando RFLP e regiões ITS, estes autores, confirmaram a relação íntima entre *P. capsici* e *P. citrophthora* de cacauero e uma relação evolutiva próxima e aparente entre *P. palmivora* e *P. megakarya*. Nestas duas espécies o comprimento da região ITS diferiu por somente dois nucleotídeos (Appiah et al., 2004).

Análises moleculares recentes contribuíram substancialmente para a compreensão das relações filogenéticas entre as espécies de *Phytophthora*, indicando que o uso de seqüências ITS é apropriado para inferências filogenéticas neste gênero (Cooke et al., 2000; Martin e Tooley, 2003).

Kroon et al. (2004) realizaram análise filogenética molecular entre 113 isolados de 48 espécies de *Phytophthora* usando regiões mitocondriais (citocromo oxidase C subunidade 1 e NADH desidrogenase subunidade 1) e seqüências de genes nucleares (fator de alongação 1- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina). Eles concluíram que o gênero *Phytophthora* é monofilético e que o agrupamento taxonômico clássico, descrito por Waterhouse (1963), não reflete verdadeiramente as relações filogenéticas das espécies. Foi possível ainda, usando a redistribuição destas espécies em 8 grupos, inferir, a partir do cladograma gerado, sobre a evolução e a transição dos caracteres morfológicos, de patogenicidade e de reprodução das espécies. Embora não tenham utilizado

fragmentos de genes da região ITS em seu estudo, esses autores observaram que os resultados obtidos por Cooke et al. (2000) e Martin e Tooley (2003) concordam com aqueles que eles obtiveram. Portanto, o uso de seqüências ITS é também por eles referendado para estudos filogenéticos com *Phytophthora*.

## **2.6. Identificação de novos hospedeiros**

Devido ao caráter cosmopolita e polífago das espécies do gênero *Phytophthora*, onde raras são as espécies hospedeiro-específicas (Luz e Matsuoka, 2001), é comum o assinalamento de novos hospedeiros para as espécies existentes ou a observação da ocorrência das doenças por eles causadas em outras áreas geográficas, às vezes, distantes do local de assinalamento anterior das mesmas. É importante para os estudos de diversidade obter-se isolados oriundos de diferentes localidades e de diferentes hospedeiros para efeitos comparativos (Mchau e Coffey, 1994a, b; Ortiz-Garcia, 1996). O ideal seria que isolados de todos os hospedeiros disponíveis para uma determinada espécie, na localidade em que ela estivesse sendo estudada, pudessem ser utilizados. Assim o assinalamento de novos hospedeiros de uma espécie é muito importante.

### 3. CAPÍTULO 1

PATOGENICIDADE, CARACTERIZAÇÃO MORFOBIOLÓGICA E MOLECULAR  
DE *Phytophthora* sp. EM *Anthurium andraeanum* NA BAHIA

MÁRCIA C. A. PAIM<sup>1</sup>, EDNA DORA M. N. LUZ<sup>1</sup>, JORGE T. DE SOUZA<sup>2</sup>,  
ADEMILDE DE O. CERQUEIRA<sup>1</sup>, JOSÉ RONALDO M. LOPES<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>SEFIT; <sup>2</sup>SEGEN; <sup>3</sup>CENEX, Centro de Pesquisas do Cacau, Cx. Postal 07, CEP  
45600-970, Itabuna, BA. E-mail: [marcia-paim@ig.com.br](mailto:marcia-paim@ig.com.br)

(Artigo submetido em inglês ao Australasian Plant Pathology)

#### RESUMO

Em 2004 na costa do dendê precisamente na região de Ituberá-BA foi observada a ocorrência de queima em folhas e inflorescências de *Anthurium andraeanum*. Os sintomas manifestam-se na folha, como manchas necróticas negras com bordos de tecido encharcado e nas espatas e espádices como manchas escuras com podridão da inflorescência. Das lesões foi isolada uma espécie de *Phytophthora* que apresentava esporângios não-caducos medindo 28-119 X 17,5-47,3 µm (média 53,5 x 27,4 µm), com relação comprimento/largura de 1,9, profundidade média da papila de 5,4 µm e poro com 7,3 µm de abertura,

sexualmente infértil. O sequenciamento de um fragmento da região ITS aliado aos dados morfobiométricos permitiu a identificação do patógeno como *Phytophthora citrophthora*. Testes de patogenicidade realizados com *P. citrophthora* de antúrio e com isolados de *P. palmivora*, *P. citrophthora* e *P. tropicalis* obtidos de cacauero foram positivos a ambos os hospedeiros. Este é o primeiro registro da infecção natural de *P. citrophthora* em antúrio no estado da Bahia, e da infecção experimental de *P. palmivora* e *P. tropicalis* no mesmo hospedeiro, no Brasil. Esses resultados demonstram a suscetibilidade e o perigo potencial de infecções cruzadas por espécies patogênicas a esses hospedeiros devido à proximidade com que são cultivados na Bahia.

**Palavras chave:** *Phytophthora citrophthora*, antúrio, taxonomia, filogenia molecular.

## ABSTRACT

In 2004 the occurrence of *Anthurium andraeanum* leaf and inflorescence blight was observed in the municipality of Ituberá-BA. Necrotic lesions with black borders on leaves and inflorescences were the typical symptoms. From these lesions, a *Phytophthora* species with non-caducous sporangia measuring an average of 53.5 X 27.4  $\mu\text{m}$ , length/width ratio 1.9:1, depth of the papillae 5.4  $\mu\text{m}$  and pore exit 7.3  $\mu\text{m}$  was isolated. According to the pairing tests the isolate was sexually sterile. Sequencing of fragment from the ITS (Internal Transcribed Spacer) region of the rDNA combined with the morphological characteristics allowed the identification of the isolate obtained from *A. andraeanum* as *P. citrophthora*. Patogenicity tests done with *P. citrophthora* from anturium and *P. citrophthora*, *P. tropicalis*, and *P. palmivora* obtained from cacao were positive to both anthurium leaves and cacao pods. This is the first report of *P. citrophthora* as a pathogen on *A. andraeanum* in Bahia State and *P. palmivora* and *P. tropicalis* as potential pathogens of anthurium in Brazil. These results demonstrate the susceptibility and the potential risk of cross infections by pathogens common to these hosts due to the proximity that they are cultivated in Bahia.

Keywords: *Phytophthora citrophthora*, anthurium, taxonomy, molecular phylogeny.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O cultivo de plantas ornamentais é hoje um dos segmentos de importância crescente e altamente competitivo dentro da atividade agrícola do Brasil e do mundo. A participação brasileira no mercado mundial é de 0,3%, segundo dados da Frupe (2003), porém o volume de exportações tem crescido consideravelmente. Alguns estados brasileiros se destacam nesta atividade como São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Pernambuco, Paraná e Goiás, sendo o Vale da Ribeira, no Estado de São Paulo a principal região produtora do país, onde estima-se existirem 1,7 milhão de plantas em cultivo.

O estado da Bahia tem grande potencial para a produção de flores e plantas ornamentais dispondo de recursos naturais, como clima, solo e recursos hídricos, compreendidos em domínios ecológicos caracterizados por microclimas propícios à atividade da floricultura. O clima varia desde o semi-árido passando pelo cerrado, até o úmido e sub-úmido adequado ao cultivo de espécies tanto de clima tropical como de clima temperado. A produção de flores, em franca expansão na Bahia, tem se desenvolvido, especialmente, nos municípios de Ituberá, Maracás, Ilhéus, Camaçari, Amélia Rodrigues, Morro do Chapéu, Vitória da Conquista e Mata de São João, dentre outros (Farias, 1996).

No mercado global, entre as flores tropicais de corte o antúrio é o segundo em produção, suplantado apenas pelas orquídeas (Galinsky e Laws, 1996). No Brasil é uma planta ornamental muito apreciada e atualmente é comercializada em grande escala pelo valor de suas inflorescências, que comumente são conservadas na água e empregadas em arranjos florais. Durante todo o ano, o antúrio produz flores que emergem da base de cada nova folha. A seqüência folha, flor, folha, flor é mantida durante toda a vida da planta. A primeira flor aparece após um ano de cultivo, e para atingir o padrão comercial são necessários dois anos. Suas "flores" constituem-se de uma folha modificada, colorida, denominada espata e de uma inflorescência comprida em espiga, a espádice e são especialmente vistosas, com cores que vão do branco a diversas variações de cor-de-rosa e de vermelho (Tombolato et al., 2002).

Em muitas plantas ornamentais cultivadas comercialmente, são freqüentes os prejuízos, em consequência de doenças incitadas por *Phytophthora*. A maioria dessas espécies causa necroses em raízes, ramos, folhas e inflorescências. Algumas dessas espécies ocorrem somente em uma ou duas espécies vegetais próximas, mas outras podem causar doença em diferentes famílias de plantas. No Brasil, segundo Mendes et al., (1998), até o momento, foram assinaladas as seguintes espécies e respectivos hospedeiros: *Phytophthora cactorum* (*Cattleya* sp.); *P. cinnamomi* (*Pinus patula*); *P. citrophthora* (*Anthurium andraeanum*, *Anthurium* spp.); *P. colocasia* (*Colocasia esculenta*); *P. nicotianae* = *P. nicotianae* var. *parasitica* (*Euphorbia pulcherrima*, *Saintpaulia ionantha*) e *Phytophthora* spp. (*Chrysanthemum* spp., *Colocasia esculenta*, *Rhododendron* spp., *Pinus* spp.).

Em 2004, foi observada em um viveiro de antúrio na Fazenda Myamoto, na região de Ituberá-BA, a ocorrência de manchas necróticas em folhas com bordos de tecido encharcado, com sintomas semelhantes aos causados por *Phytophthora* em outras culturas.

O objetivo deste trabalho foi identificar e determinar a patogenicidade e caracterizar morfológicamente e molecularmente o patógeno.

## **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1. Obtenção e caracterização morfológica do isolado**

A partir de folhas de antúrio coletadas de um viveiro em Ituberá-BA apresentando queima nas folhas, espádice e espatas (Figura 1) foi efetuado em placas de Petri contendo meio seletivo PARPH (Kannwischer e Mitchell, 1978) a incubação de pedaços de tecidos retirados dos bordos das lesões, após a desinfestação com hipoclorito de sódio a 5% durante 1 min. As placas foram mantidas no escuro a uma temperatura de 25°C por quatro a cinco dias. Discos de meio seletivo com micélio foram transferidos para placas de Petri com meio cenoura-ágar (CA) e incubadas a uma temperatura de 25°C sob luz contínua. No quinto dia, observou-se o aspecto morfológico das colônias e ao microscópio a presença de clamidósporos e esporângios. Foram então preparadas lâminas e com o auxílio de um micrômetro ocular, efetuaram-se as medidas de comprimento

e largura dos esporângios, abertura do poro e profundidade das papilas de 50 esporângios. Verificou-se ainda a caducidade dos



**Figura 1** – Manchas necróticas em folha (a), espádice (b) e espata (c) de antúrio.

esporângios colocando-se água nas culturas. Como comparação foram utilizados três isolados obtidos de cacauero, pertencentes à coleção de *Phytophthora* do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), sendo um isolado de *P. citrophthora* (62), um de *P. palmivora* (252) e o outro de *P. tropicalis* (450).

### 3.2.2. Produção de oósporos

Para observar se a cultura do isolado de antúrio era heterotática, homotática ou sexualmente infértil foi feito o pareamento desse isolado com os seguintes isolados: 252 de *P. palmivora*, 62 de *P. citrophthora*, com ele mesmo e com os dos dois tipos compatíveis A<sub>1</sub> (446 e 156) e A<sub>2</sub> (229) de *P. capsici*. O pareamento consistiu na superposição de discos de cultura (7mm de diâmetro) tirados das colônias dos isolados-teste, colocando-se entre eles um disco de meio cenoura-ágar, de acordo com o método sanduíche (Luz e Silva, 2001). As placas devidamente identificadas para cada cruzamento contendo cinco sanduíches foram incubadas a 25°C por 4 dias, no escuro. Após o período de incubação, o disco de CA entre os discos dos isolados em teste foi transferido para uma lâmina, avaliando-se ao microscópio a formação de oósporos.

### 3.2.3. Avaliação da patogenicidade

Os ensaios para verificação da patogenicidade do isolado obtido de antúrio foram realizados mediante a inoculação, sem ferimento, em inflorescências (espatas e espádices) e folhas inteiras de *A. andraeanum* e em frutos de cacauero. Além do isolado de antúrio os isolados 62, 252 e 450 obtidos de cacauero também foram usados nos testes de patogenicidade em folhas de antúrio e frutos de cacauero comum para um estudo comparativo. Para obtenção do inóculo, os patógenos foram cultivados em CA por 5 dias. Discos da cultura (0,5 cm de diâmetro) foram inoculados na superfície do tecido sadio de folhas, espatas, espádices de antúrio e frutos de cacauero. Em seguida, os discos foram cobertos com algodão umedecido, que permaneceu sobre os mesmos até o início do aparecimento dos sintomas. As testemunhas receberam o mesmo tratamento sem o patógeno. Todo material inoculado foi mantido em laboratório, dentro de caixas plásticas com espuma esterilizada e umedecida para formar uma câmara úmida e sob luz contínua e temperatura de 25°C. Após 3 dias e 5 dias foi realizada a avaliação dos sintomas e registro do diâmetro das lesões. Três folhas de antúrio e três frutos de cacauero foram usados nas inoculações, sendo que cada um recebeu o inóculo em dois pontos opostos. As espatas e espádices só foram inoculadas com o isolado do antúrio. Igual número de folhas de antúrio, espatas, espádices e frutos de cacauero foi usado como testemunha.

Os diâmetros médios das lesões obtidos para cada isolado foram comparados pelo teste de Duncan a 5% para cada hospedeiro.

### 3.3.4. Extração de DNA

Para extração do DNA genômico a massa micelial dos isolados foi produzida em placas de Petri contendo o meio líquido de cenoura. Após a liofilização o micélio foi macerado em cadinho de porcelana em contato com N<sub>2</sub> líquido. Em seguida, aproximadamente 20 mg do macerado foi colocado em tubos eppendorf de 2,0 ml, aos quais foram adicionados 800 µl de um tampão constituído por: Tris-HCl 200 mM, pH 8,0, EDTA 0,5M, pH 8,0, NaCl 5M, SDS 10% e β- mercaptoetanol 1%. O macerado foi misturado ao tampão e os tubos

mantidos em banho-maria (70°C) por 1 h, sendo agitados a cada 20 min. Após a incubação, foi realizada a precipitação das proteínas, adicionando-se 700 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Em seguida as amostras foram agitadas, por suaves inversões, por 10 min e centrifugados a 14000 rpm, por 10 min a 4°C. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos eppendorf de 2,0 ml limpos.

Para a precipitação do DNA, foi adicionado ao sobrenadante 14 µl de NaCl 5M e 500 µl de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a -80°C por meia hora e, a seguir, centrifugados novamente por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 70% gelado e seco à temperatura ambiente na câmara asséptica por meia hora. Posteriormente, os ácidos nucléicos totais foram ressuspensos em 100 µl de água contendo RNase na concentração de 40 µg/ml e colocados em banho-maria por meia hora a 37°C para a completa ressuspensão.

Bandas de DNA genômico total, separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, foram usadas para a quantificação e como indicadores da integridade do DNA extraído.

### **3.2.5. Sequenciamento e análise filogenética**

Para a identificação molecular e análises filogenéticas, foram utilizados os primers ITS1 e ITS4 (White et al., 1990), para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 700-pb do DNA ribossomal (rDNA) incluindo o gene 5.8S e a região intergênica ITS1 e 2 (*Internal transcribed spacers*). As amplificações de PCR foram realizadas em um volume total de 50 µl contendo 50mM de KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200mM de cada dNTP (Promega, Madison, WI, USA), 20 pmol de cada primer, 6 µl de DNA genômico (10ng. µl<sup>-1</sup>), e 2 U de Taq DNA polimerase (Promega). Todas as amplificações de PCR foram feitas em um termociclador PTC-100 (MJ Research Inc., Watertown, MA). As amplificações consistiram de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 min, 10 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento de primer a 62°C por 1 min, diminuindo 1°C a cada ciclo sucessivo, alongamento a 72°C por 2 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 52°C por 1 min, alongamento a 72°C por 2 min e

uma extensão final de 72°C por 5 min. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose de baixo ponto de fusão (NuSieve) a 1,5%. Em seguida as bandas foram cortadas do gel, congeladas a -80°C por 1h e centrifugadas por 15 min a 1400 rpm em uma microcentrífuga. O sobrenadante foi usado diretamente para o sequenciamento com os primers anteriormente utilizados para a amplificação. O sequenciamento foi feito com o BigDye Deoxy terminator sequencing kit (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante, em um volume total de 5 µl, contendo 0,5 µl de BigDye, 1 µl de tampão de sequenciamento (5X), 2 pmol de primer e 30 ng de DNA. As reações de sequenciamento foram feitas em um termociclador PTC-100 e consistiram de 40 ciclos de uma desnaturação inicial a 94°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1min e extensão a 60°C por 4 min. Após a reação de sequenciamento, as amostras foram precipitadas com 20 µl de isopropanol 65% e a seguir permaneceram no escuro em temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente foram centrifugadas por 40 min a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida sobre papel toalha. Acrescentou-se 100 µl de etanol 60% e centrifugou-se à mesma velocidade por 8 min. O etanol foi descartado e a placa foi centrifugada sobre o papel toalha a 700 rpm por 10s para remover o excesso de etanol. Após seca, a temperatura ambiente por 15 min, foi adicionado 10 µl de formamida a cada amostra e a placa colocada no termociclador para a desnaturação a 94°C por 3 min. Após essa etapa, a placa foi encaminhada ao Seqüenciador Automático de DNA, modelo ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer. Para a análise das seqüências provenientes dos dois primers (forward e reverse), foi utilizado o programa BioEdit versão 5.0.9 (Hall, 1999) para unir as seqüências. Os alinhamentos foram feitos com o programa clustalW versão 1.8 (Thompson et al., 1997). O programa BLAST (Altschul et al., 1997) foi usado para comparar as seqüências de cada isolado com aquelas encontradas nos bancos de dados públicos. Para fins de comparação e para estudos das relações filogenéticas entre as espécies patogênicas ao cacauero, foram obtidas as seguintes seqüências para a região ITS do banco de dados públicos: AY228573 (*P. citrophthora*), AY423300 (*P. palmivora*) e AY207010 (*P. tropicalis*).

As análises filogenéticas foram feitas com o programa Mega 2 (Kumar et al., 2001) usando o método Neighbour-Joining com os parâmetros de Jukes-Cantor e análise de bootstrap com 1000 repetições.

### **3.3. RESULTADOS**

#### **3.3.1. Caracterização morfobiométrica**

O isolado obtido de antúrio apresentou colônias com aspecto petalóide, micélio superficial muito denso e cotonoso, esporângios medindo 28,0–119,0 X 17,5–47,3  $\mu\text{m}$  (média 53,5 x 27,4  $\mu\text{m}$ ) com relação comprimento/largura 1,9, profundidade média da papila 5,4  $\mu\text{m}$  e abertura do poro 7,3  $\mu\text{m}$ , de formas variáveis, distorcidos, algumas vezes bipapilados e não decíduos. Foram observados clamidósporos em abundância, tanto terminais como intercalares. As dimensões dos esporângios do isolado de antúrio são comparáveis àquelas obtidas para *P. citrophthora* (Tabela 1).

#### **3.3.2. Testes de compatibilidade**

Não foi observado formação de oósporos nos pareamentos do isolado de antúrio com qualquer um dos isolados testados, inclusive com ele mesmo, podendo-se afirmar tratar-se de uma cultura sexualmente infértil. Obtiveram-se oósporos (anterídios anfígenos) pareando os isolados A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> de *P. capsici*. O isolado 62 de *P. citrophthora* do cacauero também foi infértil.

#### **3.3.3. Testes de patogenicidade**

Manchas de cor castanho escura foram observadas 3 dias após a inoculação com o isolado 521 nas espatas e folhas de antúrio, evoluindo para lesões com bordos de aspecto encharcado 5 dias após a inoculação (Figura 3a, b). Todas as folhas e espatas inoculadas apresentaram lesões enquanto as testemunhas permaneceram sadias. O patógeno foi reisolado das lesões. O isolado de *P. citrophthora* de antúrio foi também patogênico a frutos de cacauero (Figura 3c,d). *Phytophthora citrophthora* (62), *P. palmivora* (252) e *P. tropicalis*

**Tabela 1** – Médias de comprimento, largura, dimensões da papila e pedicelo de 50 esporângios dos isolados de *Phytophthora* spp.

Espécie	Isolado	Origem	Esporângio			Papila		Pedicelo
			Comp. ( $\mu\text{m}$ )	Larg. ( $\mu\text{m}$ )	Comp/larg ( $\mu\text{m}$ )	Prof. ( $\mu\text{m}$ )	Poro ( $\mu\text{m}$ )	Comp. ( $\mu\text{m}$ )
<i>P. citrophthora</i>	521	antúrio	53,5 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	27,4 $\pm$ 0,7	1,9:1	5,4 $\pm$ 0,2	7,3 $\pm$ 0,2	– <sup>b</sup>
<i>P. citrophthora</i>	62	cacaueiro	49,8 $\pm$ 2,8	28,2 $\pm$ 1,2	1,7:1	5,6 $\pm$ 0,3	7,4 $\pm$ 0,3	–
<i>P. palmivora</i>	252	cacaueiro	47,3 $\pm$ 0,9	35,1 $\pm$ 0,5	1,3:1	7,1 $\pm$ 0,2	7,1 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,2
<i>P. tropicalis</i>	450	cacaueiro	44,0 $\pm$ 1,0	33,5 $\pm$ 0,8	1,3:1	5,2 $\pm$ 0,2	9,0 $\pm$ 0,2	31,3 $\pm$ 2,3

<sup>a</sup> Erro padrão da média, calculada com base em 50 esporângios por isolado.

<sup>b</sup> – Isolados não decíduos.

(450) isolados de cacau foram patogênicos a ambos os hospedeiros (Figuras 4 - 6). Não houve diferença no diâmetro das lesões incitadas em antúrio pelas espécies testadas, porém, em frutos de cacau, *P. citrophthora* isolada de antúrio mostrou-se mais virulenta enquanto que, *P. tropicalis*, apresentou as menores lesões ( $P=0.05$ ) (Tabela 2).

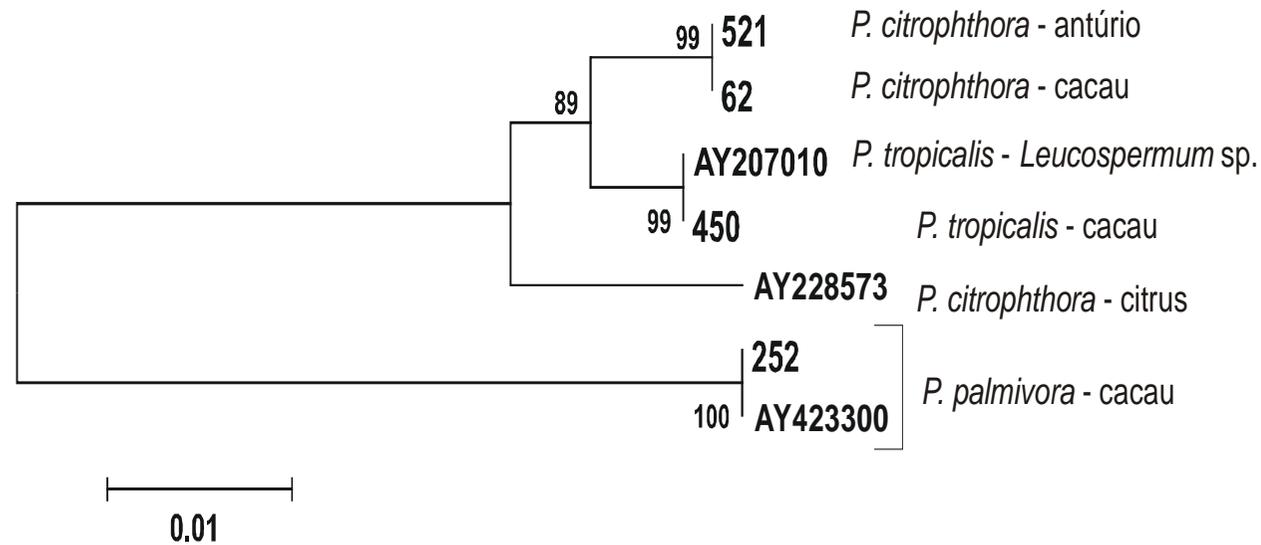
**Tabela 2** – Diâmetro médio das lesões causadas por *Phytophthora* sp. em folhas de antúrio e frutos de cacau 3 e 5 dias após a inoculação.

Espécie	Isolado	Origem	3 dias		5 dias	
			antúrio	cacau	antúrio	cacau
<i>P. citrophthora</i>	521	antúrio	1,8 a	4,7 a	2,9 a	9,1 a
<i>P. citrophthora</i>	62	cacau	1,7 a	3,6 b	3,0 a	8,2 b
<i>P. palmivora</i>	252	cacau	0,6 a	3,0 bc	1,0 a	8,2 b
<i>P. tropicalis</i>	450	cacau	0,3 a	2,7 c	1,3 a	2,9 c

Médias seguidas pela mesma letra (colunas) não diferiram estatisticamente pelo teste de Duncan ( $P=0,05$ ).

### 3.3.4. Identificação molecular e análise filogenética

A análise das seqüências obtidas para a região ITS, fator de alongação 1- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina confirmaram a identificação do patógeno de antúrio como *P. citrophthora*. As seqüências foram depositadas no GenBank sob os números DQ087412 (*P. citrophthora* 521), DQ087413 (*P. citrophthora* 62), DQ087414 (*P. tropicalis* 450) e DQ087415 (*P. palmivora* 252). A análise filogenética feita com seqüências da região ITS contendo 742-pb nucleotídeos alinhados mostrou que os isolados de *P. citrophthora* de antúrio e de cacau são idênticos (Figura 2), apresentando seqüências com identidade de 100% entre si enquanto que a identidade entre as seqüências de *P. citrophthora* de cacau e antúrio com *P. tropicalis* foi de 98,7%, e, a identidade entre *P. citrophthora* de citros e os isolados de cacau e antúrio foi de 96,4% (Tabela 3). Portanto, *P. citrophthora* de cacau e antúrio apresentam-se mais próximas de *P. tropicalis* que de *P. citrophthora* obtida de citros. *Phytophthora palmivora* diferenciou-se

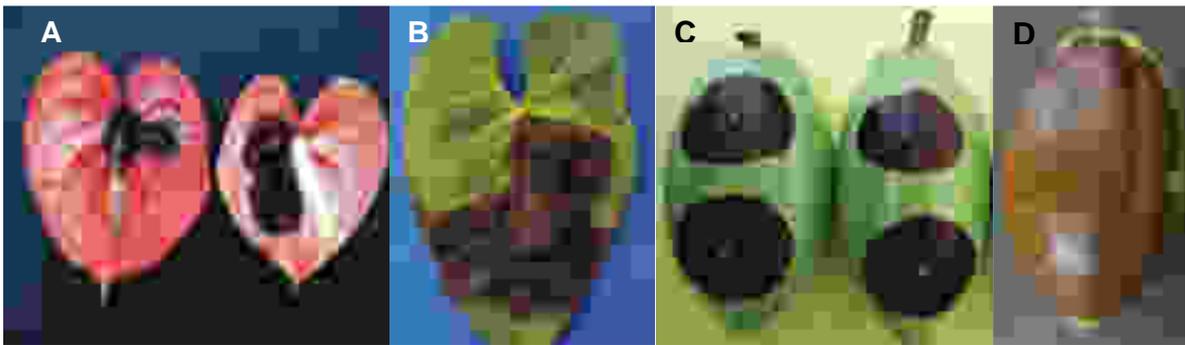


**Figura 2** – Filograma genético das relações entre espécies de *Phytophthora* baseado em 742-pb de nucleotídeos alinhados da região ITS do rDNA. O filograma foi construído utilizando-se o método Neighbour-Joining com os parâmetros de Jukes-Cantor. Os valores apresentados nas ramificações do filograma correspondem ao bootstrap, e foram calculados com base em 1000 repetições. A escala indica o número de substituições de nucleotídeos por sítio.

**Tabela 3** – Percentagem de identidade de seqüências da região ITS do rDNA de espécies de *Phytophthora*.

Espécie	Isolado	Origem	521	62	AY228573	AY207010	450	252	AY423300
<i>P. citrophthora</i>	521	antúrio	100						
<i>P. citrophthora</i>	62	cacaueiro	100	100					
<i>P. citrophthora</i>	AY228573*	<i>Citrus</i> sp.	96,4	96,4	100				
<i>P. tropicalis</i>	AY207010*	<i>Leucospermum</i> sp.	98,7	98,7	96,7	100			
<i>P. tropicalis</i>	450	cacaueiro	98,7	98,7	96,7	100	100		
<i>P. palmivora</i>	252	cacaueiro	91	91	90	91,3	91,3	100	
<i>P. palmivora</i>	AY423300*	cacaueiro	91	91	90	91,3	51	100	100

\* Número de acesso do banco de dados



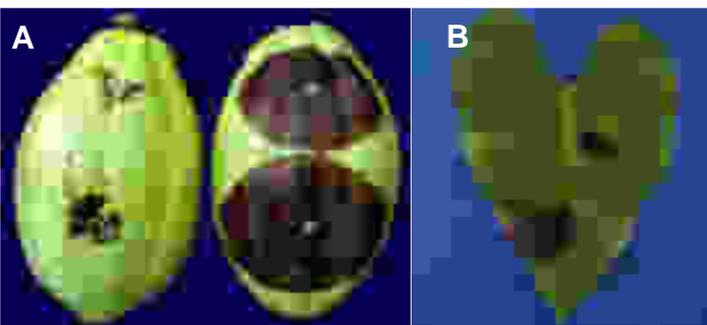
**Figura 3** – Espatas (a) e folhas (b) de antúrio e frutos de cacau (c, d) inoculadas com *Phytophthora citrophthora* de antúrio.



**Figura 4** – Frutos de cacau (a) e folha de antúrio (b) inoculados com *Phytophthora citrophthora* de cacau.



**Figura 5** – Frutos de cacau (a) e folha de antúrio (b) inoculadas com *Phytophthora palmivora* de cacau.



**Figura 6** – Frutos de cacau (a) e folha de antúrio (b) inoculada com *Phytophthora tropicalis*.

consideravelmente das demais espécies, com seqüências de 91%, 90% e 91,3% de identidade para *P. citrophthora* de cacaueteiro e antúrio, *P. tropicalis* e *P. citrophthora* de citros, respectivamente (Figura 2 e Tabela 3). Os valores de bootstrap para todas as ramificações foram altamente significativos (Figura 2), indicando a robustez da análise.

### 3.4. DISCUSSÃO

O patógeno de antúrio foi classificado como *P. citrophthora* com base nas características morfológicas e no sequenciamento de fragmentos da região ITS, fator de alongação 1- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina. As características morfológicas desse isolado enquadram-se nas descritas para *P. citrophthora* nas chaves de classificação de Waterhouse (1963,1970) e Stamps et al., (1990). As seqüências da região ITS, fator de alongação 1- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina de *P. citrophthora* do isolado de antúrio (521) apresentaram 100% de identidade em relação ao isolado obtido de cacaueteiro (62) (Tabela 2). As análises filogenéticas com a região ITS do rDNA demonstraram que *P. citrophthora* de antúrio e cacaueteiro são mais próximas de *P. tropicalis* do que de *P. citrophthora* de citros (Figura 2). Esta discrepância já havia sido apontada por outros autores (Goodwin et al., 1990; Forster et al., 1990 e 2000; Oudemans e Coffey, 1991; Oudemans et al., 1994; Mchau e Coffey, 1994 e Ortiz-Garcia, 1996) que empregaram estudos de isoenzimas, mtDNA RFLP e análises de seqüências ITS. As análises da região ITS aqui apresentadas sugerem que *P. citrophthora* isolada de antúrio e cacaueteiro podem representar uma nova espécie, apesar de compartilharem características morfológicas indistinguíveis das de *P. citrophthora* de citros (Tabela 1). Mais estudos taxonômico deverão ser realizadas para esclarecer as relações filogenéticas de *P. citrophthora* de cacaueteiro e antúrio e espécies afins.

A ocorrência de *P. citrophthora* em antúrio no Brasil já havia sido relatada no Vale do Ribeira, no estado de São Paulo por Pitta et al., (1991). No entanto, este trabalho constitui o primeiro relato de *P. citrophthora* como patógeno de antúrio no estado da Bahia. *Phytophthora citrophthora*, *P. palmivora*, e *P. tropicalis* de cacaueteiro também foram patogênicas ao antúrio, sugerindo que

estas espécies representam um perigo potencial para o cultivo de antúrio na região. Este é o primeiro relato de *P. palmivora* e *P. tropicalis* como patógenos de antúrio no Brasil em condições experimentais. *Phytophthora tropicalis* foi relatada como patógeno de antúrio no Havaí (Aragaky e Uchida, 2001). Como as espécies *P. citrophthora*, *P. palmivora* e *P. capsici* estão associadas à podridão-parda do cacau na Bahia (Campêlo e Luz, 1981) e também a requeima das folhas e ao cancro do painel da seringueira (Santos et al., 2001; Luz et al., 2003), culturas prevalentes na região sudeste da Bahia e extensamente cultivadas em Ituberá, é possível que *P. palmivora* também venha a infectar naturalmente o antúrio naquela região.

Para o preparo dos viveiros de antúrio há incorporação de matéria orgânica aos substratos para melhorar a aparência e acelerar o crescimento das mudas, sendo que as camadas superiores do solo (horizontes A e B), das áreas cultivadas com cacau, ricas em matéria orgânica, são bastante utilizadas para este fim, em mistura com outros componentes. Sabe-se que *Phytophthora* spp. são patógenos de raízes e sobrevivem no solo associadas a seus hospedeiros (Luz e Matsuoka, 2001) e que as espécies *P. palmivora* e *P. citrophthora* colonizam as raízes do cacau que se transformam em repositório de inóculo para as infecções na parte aérea do cacau (Luz e Mitchell, 1994). É, portanto, possível inferir que o solo de áreas de cacau contaminadas por *P. citrophthora* pode ter sido a fonte primária de inóculo para o antúrio.

As condições dos viveiros de antúrio em Ituberá-BA são propícias à disseminação de *P. citrophthora* apesar das pulverizações periódicas com fungicidas a base de cobre. Folhas velhas e flores que não atingem o tamanho adequado para comercialização são deixadas no solo para se decompor e serem reutilizadas pelas plantas. Com o emprego da irrigação por aspersão, os respingos de água contendo partículas do substrato podem carrear esporângios de *P. citrophthora* para as folhas e flores jovens onde causam novas lesões como ocorre em outras culturas (Luz e Silva, 2001). Deve-se, portanto, atentar para o risco de *P. citrophthora* tornar-se um sério problema fitopatológico para a cultura do antúrio no sudeste da Bahia.

### 3.5. AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado ao primeiro autor. A Ângelo Tomás, produtor de flores tropicais, pela doação de flores e folhas de antúrio destinadas aos testes de patogenicidade e a Lindolfo Pereira dos Santos Filho pela assessoria nas análises estatísticas. Ao pessoal do laboratório de *Phytophthora* do CEPEC pelo auxílio precioso nos trabalhos de rotina e pela amizade gratificante.

### 3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. e LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.

ARAGAKI, M. e UCHIDA, J. Y. Morphological distinctions between *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* sp. Nov. **Mycologia**, v. 93, n. 1, p. 137–145, 2001.

CAMPÊLO, A.M.F.L. e LUZ, E.D.M.N. Etiologia da podridão-parda do cacauero nos Estados da Bahia e Espírito Santo, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 313–321, 1981.

DUFOUR, L. e GUÉRIN, V. Growth, developmental features and flower production of *Anthurium andraeanum* Lind. in tropical conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 98, p. 25–35, 2003.

DUFOUR, L. e GUÉRIN, V. Nutrient solution effects on the development and yield of *Anthurium andraeanum* Lind. In tropical soilless conditions. **Scientia Horticulture**. In press (2005).

ERWIN, D.C. e RIBEIRO, O.K. (Eds.) *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul. APS Press, 1996.

FARIAS, A.J.N. Mercado de flores de corte e plantas ornamentais. **Revista Bahia Agrícola**, v. 1, n. 2, p. 38–43, Outubro 1996.

FORSTER, H.; OUDEMANS, P. e COFFEY, M. D. Mitochondrial and nuclear DNA diversity within six species of *Phytophthora*. **Experimental Mycology**, v. 14, p. 18-31, 1990.

FORSTER, H.; CUMMINGS, M. P. e COFFEY, M. D. Phylogenetic relationships of *Phytophthora* species based on ribosomal ITS I DNA sequence analysis with emphasis on Waterhouse groups V and VI. **Mycological Research**, v. 9, p. 1055-1061, 2000.

GALINSKY, R. e LAWS, N. *Anthurium* market. **RAP Market Information Bulletin**, n. 11, 1996.

GOODWIN, P. H.; KIRKPATRICK, B. C. e DUNIWAY, J. M. Identification of *Phytophthora citrophthora* with cloned DNA probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 669–674, 1990.

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

KANNWISCHER, M.E. e MITCHELL, D.J. The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. **Phytopathology**, v. 68, p. 1760–1765, 1978.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B. e NEI, M. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. **Bioinformatics**, v. 17, p. 1244–1245, 2001.

LUZ, E. D. M. N. e MITCHELL, D. J. Influence of soil flooding on cacao root infection by *Phytophthora* spp. Ilhéus, BA. **Agrotrópica**, v. 6, n. 2, p. 53–60, 1994.

LUZ, E.D.M.N. e SILVA, S.D.V.M. Podridão-parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacaueiro. In: Luz, E.D.M.N.; Santos, A.F. dos; Matsuoka, K. e Bezerra, J.L. (eds) **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**, Campinas, Livraria Rural, p.175–265, 2001.

LUZ, E. D. M. N. e MATSUOKA, K. *Phytophthora*: Fungo Protista ou Chromista?, In: Luz, E.D.M.N.; Santos, A.F. dos; Matsuoka, K. e Bezerra, J.L. (eds) **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**, Campinas, Livraria Rural, p. 1–22, 2001.

LUZ, E.D.M.N.; OLIVEIRA, M. L.; MARQUES, J. R. B. e ALMEIDA, O. C. *Phytophthora citrophthora* em seringueira no estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28 (supl.), p. S215, 2003.

MCHAU, G.R.A. e COFFEY, M.D. An integrated study of morphological and isozyme patterns found within a worldwide collection of *Phytophthora citrophthora* and a redescription of the species. **Mycological Research**, v. 98, p. 1291-1299, 1994.

MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L.; DIANESE, J. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTOS, C. E. N.; NETO, E. G.; URBEN, A. F. e CASTRO, C. Fungos em plantas no Brasil. Brasília: **EMBRAPA-SPI/EMBRAPA – Cenargen**, 596p, 1998.

ORTIZ – GARCIA, C. F. Etude de la diversité génétique de populations de *Phytophthora* pathogènes du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) et du cocotier

(*Cocos nucifera* L.). **PhD Thesis**, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 85p, 1996.

OUDEMANS, P. e COFFEY, M.D. A revised systematics of twelve papillate *Phytophthora* species based on isozyme analysis. **Mycological Research**, v. 95, p. 1025-1046, 1991.

OUDEMANS, P.; FORSTER, H. e COFFEY, M.D. Evidence for distinct isozyme subgroups within *Phytophthora citricola* and close relationships with *P. capsici* and *P. citrophthora*. **Mycological Research**, v. 98, p. 189-199, 1994.

PITTA, G. P. B.; de SOUZA, T. M. W. e FEICHTENBERGER, E. Podridão negra em inflorescência e folha de *Anthurium andraeanum* causada por *Phytophthora citrophthora*. **Summa Phytopathologica**, v. 17, p. 159–163, 1991.

SANTOS, A. F.; GASPAROTTO, L. e PEREIRA, J. C. R. Doenças da seringueira causadas por *Phytophthora*. In: Luz, E. D. M. N.; Santos, A. F. Dos; Matsuoka, K. e Bezerra, J. L. (eds) **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas, Livraria Rural, p. 629–677, 2001.

SANTOS, A. M.; ARAÚJO, J. S. de P. e CARMO, M. G. F. do. Doenças de plantas ornamentais causadas por *Phytophthora*. In: Luz, E. D. M. N.; Santos, A. F. Dos; Matsuoka, K. e Bezerra, J. L. (eds) **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas, Livraria Rural, p. 590–608, 2001.

STAMPS, D.J.; WATERHOUSE, G.M.; NEEHOOK, F.J. e HALL, G.S. Revised tabular key to the genus *Phytophthora*. Wallingford CAB International **Mycology Papers**, 162p., 1990.

TOMBOLATO, A. F. C.; RIVAS, E. B.; COUTINHO, L. N.; BERGMANN, E. C.; IMENES, S. D. L.; FURLANI, P. R.; CASTRO, C. E. F.; MATTHES, L. A. F.; SAES, L. A.; COSTA, A. M. M.; TAGLIACOZZO, G. M. D. e LEME, J. M. O cultivo de antúrio: Produção Comercial. Campinas, Instituto Agrônômico. **Boletim Técnico IAC**, n. 194, 47p., 2002.

THOMPSON J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. e HIGGINS D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876–4882, 1997.

WATERHOUSE, G.M. Key to the species of *Phytophthora* de Bary Kew, Commonwealth Mycological Institute. **Mycology Papers**, 92p., 1963.

WATERHOUSE, G.M. The genus *Phytophthora* de Bary. Diagnoses (or descriptions) and figures from the original papers. Kew. Commonwealth Mycological Institute. **Mycology Papers**, 122p., 1970.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S. e TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. e White, T.J. (Eds.) PCR Protocols : a guide to methods and applications, **Academic Press**, San Diego, p. 315–322, 1990.

## 4. CAPÍTULO 2

### DIVERSIDADE GENÉTICA E TAXONOMIA DE *Phytophthora citrophthora* e *P. palmivora* NA BAHIA

MÁRCIA C. A. PAIM<sup>1</sup>, EDNA DORA M. N. LUZ<sup>1</sup> e JORGE T. DE SOUZA<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>SEFIT, <sup>2</sup>SEGEN, Centro de Pesquisas do Cacau, Caixa Postal 07, CEP 45600-970, Itabuna, BA. E-mail: [marcia-paim@iq.com.br](mailto:marcia-paim@iq.com.br)

(Artigo a ser submetido)

#### RESUMO

*Phytophthora citrophthora* e *P. palmivora* são as duas espécies mais virulentas que causam a podridão-parda do cacau e atacam também outros importantes hospedeiros na Bahia. Objetivou-se nesse trabalho avaliar a diversidade genética dessas espécies e realizar estudos taxonômicos com 116 isolados através de análises de RAPD e das seqüências de fragmentos de três genes nucleares (região ITS do rDNA, fator de alongação 1- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina), aliados a caracteres morfométricos e testes de patogenicidade. As análises de RAPD distinguiram nitidamente as duas espécies e agruparam os 73 isolados de *P. citrophthora* em 14 subgrupos e os 43 isolados de *P. palmivora* em 5 subgrupos. Representantes de cada um desses subgrupos foram utilizados para os testes de patogenicidade e sequenciamento. *Phytophthora citrophthora*

apresentou maior diversidade genética que *P. palmivora* tanto nas análises de RAPD quanto através do sequenciamento de todos os três genes e da análise combinada destes. Os isolados de *P. citrophthora* de citros e de cacauero foram geneticamente distintos e apresentaram diferenças quanto à formação de clamidósporos e a patogenicidade, pois, os isolados de cacauero não causaram lesões em frutos de laranja. Os isolados de *P. palmivora* obtidos de cacauero, mamoeiro e pupunheira agruparam-se por hospedeiro na análise de RAPD, porém, o sequenciamento do fragmento do gene fator de alongação 1- $\alpha$  e ITS não mostrou nenhum agrupamento, enquanto que seqüências do gene  $\beta$ - tubulina e a combinação deste com o fator de alongação 1- $\alpha$  diferenciaram os isolados de pupunheira dos demais. Estes isolados apresentaram diferenças de tamanho e formato dos esporângios em relação aos padrões definidos para a espécie *P. palmivora*. Discute-se a classificação dos isolados de cacauero até então identificados como *P. citrophthora* como uma nova espécie e sua provável condição híbrida. Também é discutida a permanência ou não dos isolados de pupunheira na espécie *P. palmivora*.

Palavras chaves: filogenia, morfologia, patogenicidade, RAPD, sequenciamento e taxonomia.

## **ABSTRACT**

Among the causal agents of black pod disease of cacao, *P. citrophthora* and *P. palmivora* are the species with the highest virulence. These species are also pathogenic to other hosts in Bahia State. Our objectives in this work were to study the genetic diversity of these species and conduct taxonomic and phylogenetic studies on 116 isolates obtained from cacao and other hosts. The techniques employed included RAPD (Random Amplified polymorphic DNA) and sequence analyses of fragments from three nuclear genes (ITS region of the rDNA, elongation factor 1- $\alpha$ , and  $\beta$ -tubulina) combined with the analyses of morphological characters and pathogenicity tests. RAPD analysis clearly distinguished the two species and separated the 73 isolates of *P. citrophthora* in 14 subclusters and the 43 isolates of *P. palmivora* in five subclusters.

Representatives of each subcluster were used in pathogenicity tests and sequence analyses. *Phytophthora citrophthora* showed more genetic diversity than *P. palmivora* according to RAPD and sequencing analyses. The isolates of *P. citrophthora* obtained from *Citrus* and cacao were genetically distinct and also showed differences on chlamydospore formation and pathogenicity to *Citrus* fruits. Isolates of *P. palmivora* from cacao, papaya and peach palm were separated in RAPD analysis, but not on sequence analyses of the ITS region and elongation factor 1- $\alpha$ . On the other hand,  $\alpha$ -tubulin and the combination of elongation factor 1- $\alpha$  and  $\alpha$ -tubulin sequences clustered the peach palm isolates apart, fact that was corroborated by the morphological characters, which distinguished them from *P. palmivora*. The classification of the isolates from cacao, thus far known as *P. citrophthora* as a new species, their possible hybrid condition, and the taxonomic status of *P. palmivora* from peach palm are discussed.

Keywords: morphological analysis, pathogenicity, phylogeny, RAPD, sequence analysis, taxonomy.

#### 4.1. INTRODUÇÃO

Membro da classe dos Oomycetes, o gênero *Phytophthora*, que significa destruidor de plantas, foi apropriadamente assim denominado por Anton de Bary em 1886, pois agrupa espécies que realmente destroem plantas de grande expressão econômica no mundo. *Phytophthora citrophthora* (Smith e Smith) Leonian e *P. palmivora* (Butl.) Butler, espécies pertencentes ao grupo II de acordo com os caracteres morfológicos e fisiológicos estabelecidos por Waterhouse (1963) e Stamps et al. (1990), são importantes patógenos do cacau e de outras culturas tropicais e subtropicais economicamente importantes no Brasil e no mundo. Como patógeno do cacau, *P. palmivora* está disseminada em todos os países em que o cacau é cultivado, e *P. citrophthora* ocorre no Brasil, no México e na Índia (Erwin e Ribeiro, 1996). *Phytophthora citrophthora* é bastante estudada como patógeno das plantas cítricas causando gomose, uma importante enfermidade deste cultivo. Na Bahia, essas espécies causam a podridão-parda e o cancro do cacau além, de estarem associadas a outros hospedeiros. Dentre

as espécies detectadas como patógenos do cacauero *P. citrophthora* e *P. palmivora* são as mais virulentas (Campêlo e Luz, 1981; Campêlo et al., 1982; Lawrence et al., 1982; Luz, 1989).

Segundo levantamentos realizados entre 1977 e 1981 (Campêlo e Luz, 1981), *P. capsici* era a espécie predominante na Bahia e no Espírito Santo. Entretanto, levantamentos posteriores mostraram tendências de crescimento das populações de *P. palmivora* e *P. citrophthora* (Luz et al., 1997), notadamente desta última espécie nas amostras coletadas até 2002 (Luz et al., 2003). As variações na dinâmica populacional dessas espécies, provavelmente em função da distribuição mais regular de chuvas e as baixas temperaturas médias verificadas na região nos meses de maio a setembro, período de maior incidência da podridão-parda do cacauero (Luz e Silva, 2001) tem contribuído para aumentar as perdas causadas por esta enfermidade, com reflexos nas safras de 2002/2003 e 2003/2004 (Luz et al., 2005). Sendo assim há a necessidade do monitoramento constante das populações dessas espécies e para tanto, conhecimentos de taxonomia e diversidade tornam-se essenciais.

O conhecimento da diversidade genética de *P. palmivora* e *P. citrophthora* é também importante para os estudos de resistência do cacauero a estes patógenos, pois, se houver variabilidade dentro das espécies o material genético terá que ser testado com todas as variantes dos patógenos.

No caso de *P. palmivora*, que é uma espécie heterotática, há predominância do tipo de compatibilidade A2 na região e, além disso, existem outros hospedeiros e outras espécies heterotáticas cohabitando o mesmo nicho ecológico, havendo possibilidade de recombinação sexual tanto com isolados de outros hospedeiros, como de outras espécies, principalmente, *P. capsici*, na qual predomina o tipo de compatibilidade A1 (Campêlo e Luz, 1981; Cerqueira et al., 1999).

As modernas técnicas moleculares têm se mostrado eficientes no estudo da diversidade das espécies de *Phytophthora* em geral (Cooke e Duncan, 1997; Forster et al., 2000; Appiah et al., 2004) e representam ainda uma excelente ferramenta para estudos taxonômicos quando combinadas aos dados morfológicos, fisiológicos e de patogenicidade (Cooke et al., 2000; Martin e Tooley, 2003; Kroon et al., 2004). Isolados de *P. palmivora* e *P. citrophthora* do Brasil, utilizados em estudos por alguns pesquisadores (Oudemans e Coffey,

1991; Mchau e Coffey, 1994; Ortiz-Garcia, 1996) demonstraram pouca variabilidade entre si. Entretanto, o número reduzido de isolados incluídos nestes estudos pode ter influenciado os resultados.

Historicamente, os critérios morfológicos e fisiológicos têm sido utilizados para identificar as espécies de *Phytophthora* (Waterhouse, 1963; Newhook et al., 1978; Stamps et al., 1990). No entanto a variabilidade dos principais caracteres morfológicos ocasionados por diferenças no modo de preparo dos meios de cultura, idade das colônias, condições de incubação, entre outros fatores, podem trazer problemas para a correta identificação e classificação de isolados (Erwin, 1983; Waterhouse et al., 1983; Cerqueira et al., 1999). Somando-se aos caracteres morfobiométricos, outras técnicas têm sido utilizadas com sucesso na identificação de *Phytophthora* a nível de espécie, destacando-se os padrões de proteínas totais, isoenzimas, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), RFLPs (*Random Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), e sequenciamento de diversos genes nucleares e/ou mitocondriais (Forster et al., 1990; Oudemans e Coffey, 1991; Cooke e Duncan, 1997; Ristaino et al., 1998; Sackey et al., 1999; Faleiro et al., 2003, 2004).

As recentes análises moleculares realizadas por Cooke et al., (2000); Martin e Tooley (2003) e Kroon et al., (2004) contribuíram para o enriquecimento do conhecimento das relações filogenéticas entre as espécies de *Phytophthora*, ajudando a solucionar antigos problemas taxonômicos para algumas espécies.

Objetivou-se neste trabalho avaliar a diversidade genética de *P. citrophthora* e *P. palmivora* através do uso de marcadores RAPD, do sequenciamento de fragmentos de três genes nucleares, de caracteres morfométricos e de patogenicidade e realizar estudos taxonômicos e filogenéticos com os isolados disponíveis no Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC).

## **4.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1. Isolados estudados**

Foram utilizados neste trabalho 116 isolados, 70 obtidos da coleção de *Phytophthora* da micoteca do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/CEPLAC)

e 46 obtidos de novas coletas na região, entre junho e setembro de 2004. Os isolados da coleção do CEPEC são principalmente, provenientes da região cacauera da Bahia e alguns dos Estados do Espírito Santo e Pará, bem como de outros países da América do Sul e Central (Tabela 1). Todos os isolados foram obtidos em meio seletivo PARPH (Kanmwischer e Mitchell, 1978) e posteriormente cultivados em meio cenoura-ágar (CA) a 25°C sob luz contínua por cinco dias para as identificações morfológicas. Dentre os isolados estudados, 73 foram classificados como *P. citrophthora* e 43 como *P. palmivora*, com base em caracteres morfológicos. Todos os isolados foram armazenados em água esterilizada na micoteca de *Phytophthora* para estudos posteriores.

**TABELA 1** – Isolados de *Phytophthora citrophthora* e *P. palmivora* utilizados neste estudo.

<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Local e ano</b>
<i>P. citrophthora</i>	6	Solo/cacauero	CEPEC, Ilhéus – BA/1980
<i>P. citrophthora</i>	7	Solo/cacauero	CEPEC, Ilhéus – BA/1981
<i>P. citrophthora</i>	62	Caule/ cacauero	Faz. Santa Helena, Ilhéus - BA/1979
<i>P. citrophthora</i>	101	Fruto/ cacauero	Faz. Putunijú, Jussari – BA/1981
<i>P. citrophthora</i>	162	Fruto/ cacauero	Lomanto Júnior - BA/1983
<i>P. citrophthora</i>	171	Fruto cacauero	Escritório local, Taperoá - BA/1983
<i>P. citrophthora</i>	189	Fruto/ cacauero	Faz. Unacau, Buerarema - BA/1984
<i>P. citrophthora</i>	203	Fruto/ cacauero	Escritório local, Itajuípe – BA/1989
<i>P. palmivora</i>	205	Solo/ cacauero	Faz. São Miguel, Uruçuca - BA/1990
<i>P. palmivora</i>	206	Raíz/ cacauero	Faz. São Miguel, Uruçuca - BA/1991
<i>P. citrophthora</i>	211	Raíz/eritrina	CEPEC, Ilhéus – BA/1989
<i>P. palmivora</i>	216	Fruto/cacauero	Benevides – PA
<i>P. citrophthora</i>	219	Fruto/ cacauero	Belém – PA
<i>P. citrophthora</i>	220	Fruto/ cacauero	DEPEA P/25 – AM
<i>P. palmivora</i>	224	Fruto/ cacauero	DEPEA P/27 – AM
<i>P. palmivora</i>	226	cacauero	República de Honduras/1989
<i>P. palmivora</i>	245	Fruto/mamoeiro	Faz. Santo Antônio, Gandú - BA/1997
<i>P. palmivora</i>	249	Fruto/cacau bicolor	Faz. Santo Antônio, Gandú - BA/1997
<i>P. palmivora</i>	250	Fruto/ mamoeiro	Faz. Deus Dará, Eunapólis - BA/1999
<i>P. palmivora</i>	252	Fruto/ cacauero	Ipiáú - BA/1999
<i>P. citrophthora</i>	255	Fruto/ cacauero	Belmonte - BA/1999
<i>P. palmivora</i>	256	Fruto/ cacauero	Faz. Ilhéus, Ilhéus - BA/1999
<i>P. palmivora</i>	257	Fruto/ cacauero	Faz. Ilhéus, Ilhéus - BA/1999
<i>P. citrophthora</i>	258	Fruto/ cacauero	Faz. Rainha do Sul, Camacan – BA/1999
<i>P. citrophthora</i>	260	Fruto/ cacauero	Faz. S.José, S. José da Vitória - BA/1999
<i>P. palmivora</i>	261	Tronco/ cacauero	CEPEC, Ilhéus – BA
<i>P. palmivora</i>	262	Fruto/ cacauero	Faz. Piruna, Una - BA/1999
<i>P. citrophthora</i>	266	Fruto/ cacauero	Faz. Nova Tranquilidade, Ilhéus - BA/1999

continua

Tabela 1 - continuação

<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Local e ano</b>
<i>P. citrophthora</i>	268	Fruto/ cacaueteiro	CEPEC, Ilhéus - BA/1999
<i>P. citrophthora</i>	270	Fruto/ cacaueteiro	Faz. S. José, S. José da Vitória - BA/1999
<i>P. citrophthora</i>	276	Tronco/cacaueteiro	Faz. Santa Cruz, Anuri -BA/1999
<i>P. citrophthora</i>	277	Fruto/ cacaueteiro	Faz. Piquenita, Itajuípe – BA/1999
<i>P. citrophthora</i>	283	Fruto/ cacaueteiro	Faz. Reun. Vale da Juliana, Ituberá - BA
<i>P. citrophthora</i>	286	Fruto/ cacaueteiro	Belmonte – BA
<i>P. citrophthora</i>	289	Fruto/ cacaueteiro	Uruçuca - BA/2000
<i>P. citrophthora</i>	290	Fruto/ cacaueteiro	Una - BA/2000
<i>P. citrophthora</i>	291	Fruto/ cacaueteiro	Faz. Oriente, Uruçuca - BA/2000
<i>P. citrophthora</i>	292	Fruto/cacaueteiro	Ubatã - Ba/2000
<i>P. citrophthora</i>	293	Folha/cacaueteiro	Viveiro da ESARM/2002
<i>P. citrophthora</i>	299	Fruto/ cacaueteiro	Faz. Lagoa Pequena, Uruçuca – BA/2001
<i>P. citrophthora</i>	300	Fruto/ cacaueteiro	Faz. Lagoa Pequena, Uruçuca – BA/2001
<i>P. palmivora</i>	301	Fruto/ cacaueteiro	Tingo Maria – Peru/2000
<i>P. palmivora</i>	302	Fruto/ cacaueteiro	Tingo Maria – Peru/2000
<i>P. palmivora</i>	304	Fruto/ cacaueteiro	Faz. Logoa Grande, Canavieiras - Ba/2003
<i>P. palmivora</i>	305	Fruto/ cacaueteiro	Tingo Maria – Peru/2001
<i>P. citrophthora</i>	310	Fruto/mexerica	EMCAPER - ES/2001
<i>P. palmivora</i>	311	Fruto/ cacaueteiro	Faz. Logoa Grande, Canavieiras - Ba/2003
<i>P. citrophthora</i>	312	Fruto/ cacaueteiro	Escritório Local, Jusari – BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	313	Fruto/cacaueteiro	Faz. Lagoa Pequena, Uruçuca - BA/2001
<i>P. citrophthora</i>	341	Folha/cacaueteiro	Sítio Laís, Ilhéus - BA/2002
<i>P. palmivora</i>	343	Fruto/cacaueteiro	Camacan - Ba, 2002
<i>P. palmivora</i>	344	Caule/pupunheira	Embrapa Floresta, Curitiba - PR/2002
<i>P. citrophthora</i>	349	Fruto/ cacaueteiro	Faz. Catalunha/2003
<i>P. palmivora</i>	350	Fruto/ cacaueteiro	Faz. Catalunha/2003
<i>P. palmivora</i>	351	Fruto/ cacaueteiro	Faz. Piruna, Una - BA/2003
<i>P. palmivora</i>	353	Fruto/ cacaueteiro	Faz. Piruna, Una - BA/2003
<i>P. palmivora</i>	354	Fruto/cacaueteiro	Faz. Piruna, Una - BA/2003
<i>P. palmivora</i>	356	Raiz/mamoeiro	Faz. Mucuri, Mucuri – BA/2003
<i>P. palmivora</i>	357	Raiz/mamoeiro	Faz. Mucuri, Mucuri – BA/2003
<i>P. palmivora</i>	358	Caule/ mamoeiro	Faz. Mucuri, Mucuri – BA/2003
<i>P. palmivora</i>	359	Fruto/ mamoeiro	Faz. Mucuri, Mucuri – BA/2003
<i>P. palmivora</i>	360	Raiz/mamoeiro	Faz. Lembranças, Itabela - BA/2003
<i>P. palmivora</i>	361	Raiz/mamoeiro	Faz. Guairá, Itamarajú – BA/2003
<i>P. palmivora</i>	363	Raiz/mamoeiro	Faz. Guairá, Itamarajú – BA/2003
<i>P. palmivora</i>	401	Pupunheira	INACERES, Uruçuca – BA/2003
<i>P. citrophthora</i>	455	Fruto/cacaueteiro	Faz. Novo Horizonte, Belmonte - BA/2003
<i>P. palmivora</i>	460	Fruto/cacaueteiro	Faz. Catalunha, Camacan – BA/2003
<i>P. palmivora</i>	461	Fruto/cacaueteiro	Faz. Catalunha, Camacan – BA/2003
<i>P. palmivora</i>	462	Fruto/cacaueteiro	Faz. Catalunha, Camacan – BA/2003
<i>P. palmivora</i>	471	Fruto/cacaueteiro	Faz. Lagoa grande, Canavieiras - BA/2003
<i>P. palmivora</i>	503	Fruto/cacaueteiro	Faz. Piruna, Una - BA/2004
<i>P. palmivora</i>	504	Fruto/cacaueteiro	Faz. Piruna, Una - BA/2004
<i>P. palmivora</i>	514	Fruto/cacaueteiro	CEPEC, Ilhéus – BA/2004
<i>P. palmivora</i>	515	Caule/cacaueteiro	Faz. São José, Ilhéus – BA/2004

continua

Tabela 1 - continuação

<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Local e ano</b>
<i>P. citrophthora</i>	516	Fruto/cacaueiro	Faz. São José, Ilhéus – BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	517	Fruto/cacaueiro	Faz. Sto Antônio, Aurelino Leal - BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	518	Fruto/cacaueiro	Faz. Camacan, Buerarema – BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	519	Fruto/cacaueiro	Faz. São José, Ilhéus – BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	520	Fruto/cacaueiro	Faz. Copa 70, Ibirapitanga – BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	522	Folha/antúrio	Faz. Myamoto, Ituberá – BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	523	Fruto/cacaueiro	Faz. Myamoto, Ituberá – BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	524	Fruto/cacaueiro	Faz. Myamoto, Ituberá – BA/2004
<i>P. palmivora</i>	525	Pupunheira	INACERES, Uruçuca – BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	526	Fruto/cacaueiro	Faz. Morro Alto, Ituberá - BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	527	Fruto/cacaueiro	Faz. Ondulada, Ituberá – BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	528	Fruto/cacaueiro	Faz. Porto Seguro, Uruçuca - BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	529	Fruto/cacaueiro	Faz. Porto Seguro, Uruçuca - BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	529	Fruto/cacaueiro	Faz. Porto Seguro, Uruçuca - BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	530	Fruto/cacaueiro	Faz. Porto Seguro, Uruçuca - BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	531	Fruto/cacaueiro	Faz. Morro Alto, Ituberá - BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	532	Fruto/cacaueiro	Faz. Morro Alto, Ituberá - BA/2004
<i>P. palmivora</i>	539	Fruto/cacaueiro	Faz. Morro Alto, Ituberá - BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	540	Fruto/cacaueiro	Faz. Porto Seguro, Uruçuca - BA/2004
<i>P. palmivora</i>	541	Fruto/cacaueiro	Faz. Conj. Bom Jesus, Maraú - BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	542	Fruto/cacaueiro	Faz. Bolandeira, Una – Ba/2004
<i>P. citrophthora</i>	543	Fruto/cacaueiro	Faz. Bolandeira, Una – Ba/2004
<i>P. citrophthora</i>	544	Fruto/cacaueiro	Faz. Bolandeira, Una – Ba/2004
<i>P. citrophthora</i>	545	Fruto/cacaueiro	Faz. Bolandeira, Una – Ba/2004
<i>P. citrophthora</i>	547	Fruto/cacaueiro	Faz. Porto Seguro, Uruçuca - BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	552	Fruto/cacaueiro	Faz. Porto Seguro, Uruçuca - BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	553	Fruto/cacaueiro	Faz. Bolandeira, Una – Ba/2004
<i>P. citrophthora</i>	554	Fruto/cacaueiro	Faz. Porto Seguro, Uruçuca - BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	557	Fruto/cacaueiro	Faz. Bolandeira, Una – Ba/2004
<i>P. citrophthora</i>	559	Fruto/cacaueiro	Faz. Porto Seguro, Uruçuca - BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	560	Fruto/cacaueiro	Faz. Bolandeira, Una – Ba/2004
<i>P. citrophthora</i>	561	Fruto/cacaueiro	Faz. Bolandeira, Una – Ba/2004
<i>P. citrophthora</i>	562	Fruto/cacaueiro	Faz. Bolandeira, Una – Ba/2004
<i>P. citrophthora</i>	563	Fruto/cacaueiro	Faz. Bolandeira, Una – Ba/2004
<i>P. citrophthora</i>	564	Fruto/cacaueiro	Faz. Porto Seguro, Uruçuca - BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	565	Fruto/cacaueiro	Faz. Bolandeira, Una – Ba/2004
<i>P. citrophthora</i>	566	Fruto/cacaueiro	Faz. Bolandeira, Una – Ba/2004
<i>P. citrophthora</i>	567	Fruto/cacaueiro	Faz. Ondulada, Ituberá – BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	569	Fruto/cacaueiro	Faz. Bolandeira, Una – Ba/2004
<i>P. citrophthora</i>	571	Fruto/cacaueiro	Faz. Bolandeira, Una – Ba/2004
<i>P. citrophthora</i>	572	Fruto/cacaueiro	Faz. Bolandeira, Una – Ba/2004
<i>P. citrophthora</i>	573	Fruto/cacaueiro	Faz. Porto Seguro, Uruçuca - BA/2004
<i>P. citrophthora</i>	577	citros	Capela do Alto – SP/2002
<i>P. nicotianae</i>	513	morango	Espírito Santo - ES, 2004

#### **4.2.2. Extração de DNA**

Para a extração de DNA os isolados foram cultivados em meio cenoura líquido por 5 dias sob luz contínua a uma temperatura de 25°C. A massa micelial de cada um dos isolados foi coletada e liofilizada por aproximadamente 18 horas. O micélio foi macerado em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido. Em seguida o macerado foi colocado em tubo eppendorf de 2,0 ml, ao qual foi adicionado 800 µl de tampão constituído por: Tris-HCl 200mM, pH 8,0, EDTA 0,5M, pH 8,0, NaCl 5M, SDS 10% e β- mercaptoetanol 1%. O macerado foi misturado ao tampão e os tubos mantidos em banho-maria (70°C) por 1 h, sendo agitados a cada 20 minutos. Após a incubação, foi realizada a desproteíntização, adicionando-se 700 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Em seguida as amostras foram agitadas, por suaves inversões, por 10 min e centrifugados a 14000 rpm por 10 min. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos eppendorf de 2,0 ml limpos. Para a precipitação do DNA, foi adicionado ao sobrenadante 14 µl de NaCl 5M e 500 µl de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a -80°C por meia hora e, a seguir, centrifugados novamente por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 70% gelado e seco à temperatura ambiente em câmara asséptica por 30 min. Posteriormente, os ácidos nucléicos totais foram ressuspensos em 100 µl de água contendo RNase na concentração de 40µg/mL e colocados em banho-maria por 30 min a 37°C para a completa ressuspensão. Bandas de DNA genômico total, separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, foram usadas para a quantificação e como indicadoras da integridade do DNA extraído.

#### **4.2.3. Análise de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)**

Amostras de DNA de cada isolado foram amplificadas pela técnica PCR-RAPD. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 µl, contendo Tris-HCl 10mM, (pH 8,3), MgCl<sub>2</sub> 2mM, 200mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) [Promega, Madison, WI, USA], 40 pmol de primer (Operon Technologie Inc., Alameda, CA, EUA), 1 U da Taq polimerase, e 30 ng de DNA. Os primers decâmeros: OPA-13, OPH-13, OPH-20 e OPI-12 foram selecionados

e utilizados neste trabalho para obtenção dos marcadores RAPD. As amplificações foram efetuadas em termociclador, programado com a seguinte seqüência: 94°C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 30s, anelamento de primers a 35°C e 90s de extensão a 72°C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 7 min a 72°C e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4°C. Após a amplificação, foram adicionados a cada amostra, 3 µl de uma mistura de azul de bromofenol 0,25% e glicerol 60% em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,5%) contendo Brometo de Etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90mM, EDTA 1mM). A separação eletroforética foi de 3 h a 100 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta. Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram calculadas distâncias genéticas baseadas no coeficiente de Jaccard com o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with the Arithmetic mean algorithm*) utilizando-se o programa FreeTree (Hampl et al., 2001). A análise de bootstrap foi feita com 1000 repetições.

#### **4.2.4. Caracterização morfobiométrica**

Efetuaram-se estudos morfobiométricos de 7 isolados sendo um de cacau (62) e um de citros (310) da espécie *P. citrophthora* e, 5 da espécie *P. palmivora* dos seguintes hospedeiros: um de cacau (252), dois de mamoeiro (245 e 356) e dois de pupunheira (344 e 524) pertencentes a coleção de *Phytophthora* do CEPEC. Os isolados foram transferidos para placas de Petri com CA e incubadas a uma temperatura de 25°C sob luz contínua. No quinto dia, observou-se o aspecto morfológico das colônias e ao microscópio a presença de clamidósporos e esporângios. Foram preparadas lâminas e com o auxílio de um micrômetro ocular (Carl Zeiss Inc., Germany), efetuaram-se as medidas de comprimento e largura dos esporângios, bem como a abertura do poro e a profundidade das papilas de 50 esporângios. Verificou-se ainda a presença ou ausência de clamidósporos e a caducidade dos esporângios.

#### 4.2.5. Avaliação da patogenicidade

Os ensaios para verificação da patogenicidade foram realizados com os isolados de *P. citrophthora* (7, 62, 171, 203, 211, 220, 258, 260, 266, 270, 276, 277, 310, 312, 313, 455, 522, 525, 530, 542, 559, 565, 577) e de *P. palmivora*, (224, 226, 245, 250, 252, 262, 305, 344, 351, 356, 359, 361, 401, 460, 471, 503, 524). Frutos de cacaueteiro, laranjeira e seringueira foram inoculados com os isolados de *P. citrophthora* e frutos de mamoeiro e cacaueteiro com isolados de *P. palmivora*, sendo estes sem fermento. Discos de micélio (0,5 cm de diâmetro) de culturas em CA com 5 dias de idade foram inoculados na superfície dos frutos. Em seguida, os discos foram cobertos com algodão umedecido, que permaneceu sobre os mesmos até o início do aparecimento dos sintomas. Três frutos de cacauete da variedade comum, três frutos de seringueira dos clones FX2784 e FX3899 suscetíveis a *Phytophthora*, três frutos de mamoeiro da variedade Havaí e três frutos de laranja d'água (*Citrus sinensis* (L) Osbeck) foram inoculados com cada um dos isolados. Em cada fruto foram feitos dois pontos opostos de inoculação, enquanto para os frutos trilobados de seringueira foram usados três pontos de inoculação/fruto/isolado. Igual número de frutos de cacaueteiro, seringueira e mamoeiro foram usados como testemunha e receberam o mesmo tratamento sem o patógeno.

O material inoculado de seringueira foi mantido, dentro de caixas plásticas com espuma esterilizada e umedecida para formar uma câmara úmida e os frutos de cacaueteiro e mamoeiro foram colocados dentro de sacos plásticos transparentes, contendo pequena quantidade de água em seu interior para também formar uma câmara úmida. Sacos e caixas contendo o material inoculado foram mantidos em laboratório em condições de luz contínua e temperatura a 25°C, e examinados após 3 e 5 dias (cacaueteiro, laranja e seringueira) e 5 e 7 dias (mamoeiro) para avaliação dos sintomas e registro do diâmetro das lesões.

#### 4.2.6. Sequenciamento e análise filogenética

Para o sequenciamento de *P. citrophthora* e *P. palmivora* foram utilizados os primers ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990), para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 700-pb do DNA ribossomal (rDNA) incluindo o gene 5.8S e

a região intergênica ITS1 e 2 (*Internal Transcribed Spacers*). Os pares de primers ELONGF1/ELONGR1 e TUBUF2/TUBUR1, foram usados para amplificar um fragmento de aproximadamente 860-pb do gene que codifica uma proteína chamada fator de alongação 1- $\alpha$  e um fragmento de aproximadamente 900-pb do gene  $\beta$ -tubulina respectivamente (Kroon *et al.*, 2004). As amplificações de PCR foram realizadas em um volume total de 50  $\mu$ l contendo 50mM de KCl, 1,5mM  $MgCl_2$ , 200mM de cada dNTP (Promega), 20 pmol de cada primer, 6  $\mu$ l de DNA genômico (10ng.  $\mu$ l<sup>-1</sup>), e 2 U de Taq DNA polimerase (Promega). Todas as amplificações de PCR foram feitas em um termociclador PTC-100 (MJ Research Inc., Watertown, MA). As amplificações consistiram-se de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 min, 10 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento de primer a 62°C por 1 min, diminuindo 1°C a cada ciclo sucessivo, alongamento a 72°C por 2 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 52°C por 1 min, alongamento a 72°C por 2 min e uma extensão final de 72°C por 5 min. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose de baixo ponto de fusão (NuSieve) a 1,5%, cortados do gel, congelados a -80°C por 1h e centrifugados por 15 min a 1400 rpm em uma microcentrífuga. O sobrenadante foi usado diretamente para o sequenciamento com os primers anteriormente utilizados para a amplificação. O sequenciamento foi feito com o BigDye Deoxy terminator sequencing kit (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante, em um volume total de 5  $\mu$ l, contendo 0,5  $\mu$ l de BigDye, 1  $\mu$ l de tampão de sequenciamento (5X), 2 pmol de primer e 30 ng de DNA. As reações de sequenciamento foram feitas em um termociclador PTC-100 e consistiram-se 40 ciclos de uma desnaturação inicial a 94°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1min e extensão a 60°C por 4 min. Após a reação de sequenciamento, o DNA foi precipitado com 20  $\mu$ l de isopropanol 65%, a seguir permaneceu no escuro em temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente foi centrifugada por 40 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida sobre papel toalha. Acrescentou-se 100  $\mu$ l de etanol 60% e centrifugou-se à mesma velocidade por 8 minutos. O etanol foi descartado e a placa foi centrifugada sobre o papel toalha a 700 rpm por 10s para remover o excesso de etanol. Após seca, a temperatura ambiente por 15 minutos, foi adicionado 10  $\mu$ l de formamida a cada amostra e a placa encaminhada para o

termociclador para a desnaturação a 94°C por 3 min. Após essa etapa, a placa foi encaminhada para o Seqüenciador Automático de DNA, modelo ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer. Para a análise do sequenciamento proveniente dos dois primers (forward e reverse), foi utilizado o programa BioEdit versão 5.0.9 (Hall, 1999) para unir as seqüências. Os alinhamentos foram feitos com o programa clustalW versão 1.8 (Thompson et al., 1997). O programa BLAST (Altschul et al., 1997) foi usado para comparar as seqüências de cada isolado com os presentes nos bancos de dados públicos.

As análises filogenéticas foram feitas com o programa Mega 2 (Kumar et al., 2001) com o método Neighbour-Joining com os parâmetros de Jukes-Cantor e análise de bootstrap com 1000 repetições.

### **4.3. RESULTADOS**

Entre os 46 isolados coletados de cacauero no sudeste da Bahia em 2004, apenas sete foram de *P. palmivora* e todos os demais de *P. citrophthora* confirmando a predominância desta espécie nos últimos anos.

#### **4.3.1. Análise de RAPD**

A amplificação do DNA dos 116 isolados, pela técnica de PCR-RAPD com quatro primers decâmeros (A-13, H-13, H-20 e I-12) gerou um total de 82 bandas. A análise permitiu a separação de *P. citrophthora* em dois grupos, sendo um deles formado pelos isolados de cacauero e eritrina (*Erithrina glauca*) e o outro por isolados de citros, enquanto que *P. palmivora* formou apenas um grupo principal (Figura 1). Os isolados de *P. citrophthora* de cacauero e eritrina foram divididos em 12 subgrupos, com similaridade entre eles variando de 41 a 100%, enquanto que os 2 representantes de *P. citrophthora* de citros formaram dois subgrupos com similaridade de 52,4%. A similaridade entre os isolados de *P. citrophthora* de cacauero e eritrina com os obtidos de citros variou de 10 a 29%. Para o grupo de *P. palmivora*, cinco subgrupos puderam ser distintos com os coeficientes de similaridade entre os 43 isolados dessa espécie variando entre 43 a 100%. Os agrupamentos entre os isolados de *P. palmivora* mostraram uma correspondência com os hospedeiros de origem. Os nove isolados de mamoeiro

formaram um único subgrupo, para os 31 isolados de cacau, dois subgrupos um com apenas o isolado (224) e outro com os demais 30; os três isolados de pupunha também formaram dois subgrupos. A diversidade intra-específica de *P. citrophthora* foi maior que a de *P. palmivora*, pois somente entre os isolados obtidos de cacauzeiro 11 subgrupos foram formados.

Não se observou distinção dentro da mesma espécie para isolados obtidos a partir de diferentes partes da planta ou de solo, e de diferentes localidades geográficas. Isto pode ser observado para os dois grandes subgrupos de isolados de cacauzeiro tanto de *P. citrophthora* (70 isolados) como de *P. palmivora* (com 31 isolados), provenientes de diferentes partes da planta e regiões geográficas, incluindo outros países (Tabela 1).

O isolado de *P. nicotianae* utilizado como controle ficou distante geneticamente dos grupos formados pelas outras espécies, apresentando coeficientes de similaridade de 0 a 3.8% com *P. citrophthora* e de 3.3 a 4% com os isolados de *P. palmivora*.

Em função do grande número de isolados de *P. citrophthora* e *P. palmivora* usados neste estudo (Tabela 1), foram selecionados representantes de todos os grupos RAPD para os testes de patogenicidade e sequenciamento.

#### **4.3.2. Caracterização morfobiométrica**

Para a caracterização morfobiométrica visando a confirmação da identidade das espécies estudadas, foram selecionados sete isolados, sendo dois da espécie *P. citrophthora* e cinco de *P. palmivora* (Tabela 2).

Os isolados de *P. citrophthora* apresentaram colônias com aspecto petalóide, micélio superficial muito denso e cotonoso, os esporângios de formas variáveis, distorcidos, algumas vezes bipapilados, não decíduos e presentes tanto no isolado de cacauzeiro como no de citros. No entanto, as dimensões dos esporângios do isolado de cacauzeiro ( $49,8 \pm 2,8 \times 28,2 \pm 1,2 \mu\text{m}$ ) foram ligeiramente maiores que as do isolado de citros ( $32,1 \pm 0,6 \times 20,91 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ) ambos, no entanto estão dentro dos padrões descritos por Waterhouse (1963); Stamps et al., (1990) e Mchau e Coffey (1994), para a espécie *P. citrophthora*. Foram observados clamidósporos em abundância, tanto terminais como intercalares para o isolado

de cacauero, enquanto raros clamidósporos foram visualizados para o isolado de citros em meio de cenoura líquido.

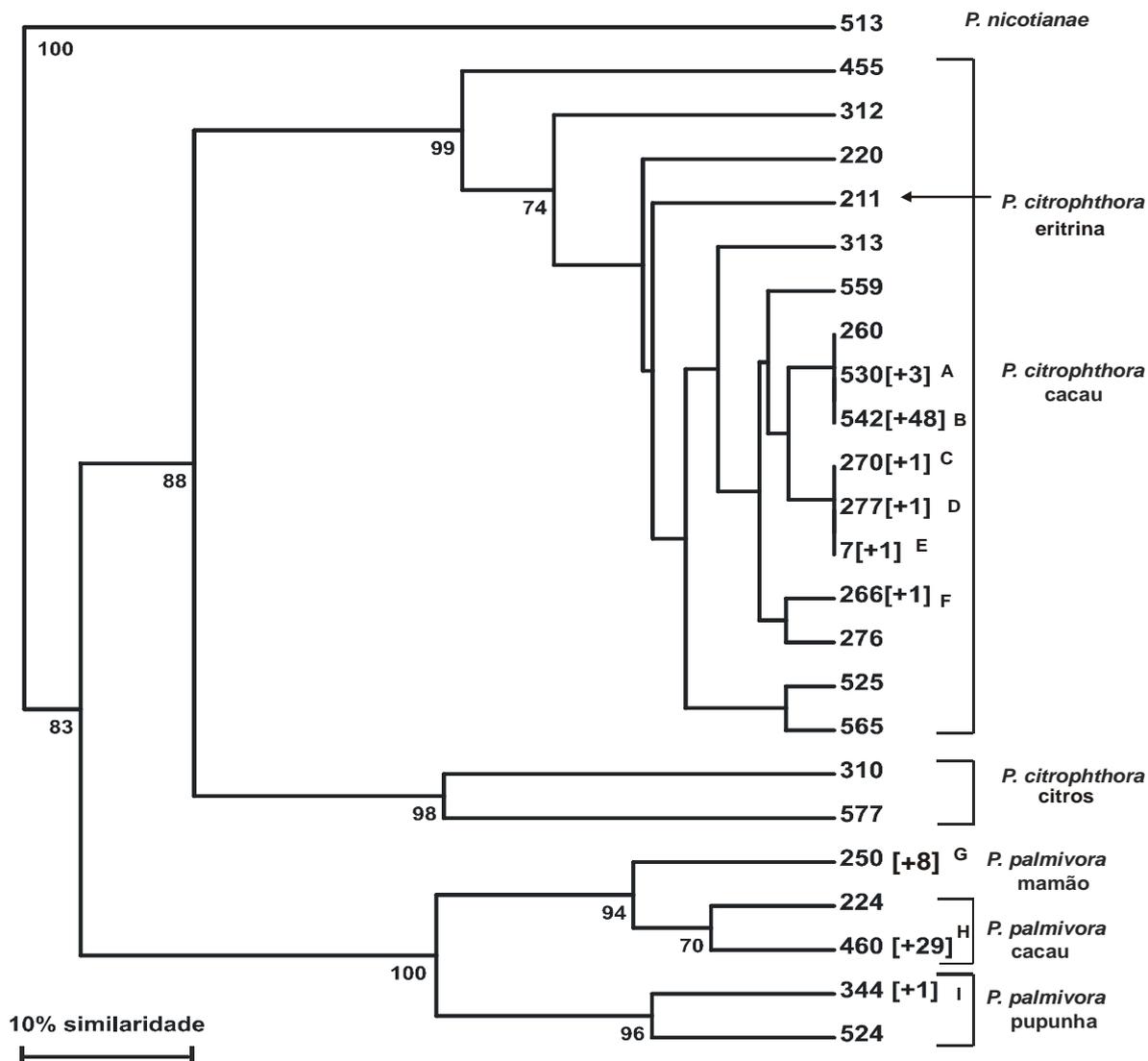
Os cinco isolados de *P. palmivora* utilizados neste estudo apresentaram colônias petalóide com micélio superficial ralo, e com presença de abundantes esporângios em CA e cenoura líquida. Os esporângios, predominantemente ovóides nos isolados de cacauero e mamoeiro, foram mais alongados nos isolados de pupunheira, com relação comprimento/largura variando de 1,8 a 2,1 estando fora dos padrões da espécie estipulada nas chaves acima mencionadas e também do padrão dos isolados da espécie para a Bahia (Cerqueira et al., 1999). Os esporângios de todos os isolados de *P. palmivora* foram caducos e apresentaram pedicelos inferiores a 5 µm. Houve abundante formação de clamidósporos terminais e intercalares para os 5 isolados dessa espécie, independente do hospedeiro do qual foram obtidos.

#### **4.3.3. Avaliação da patogenicidade**

Os isolados selecionados para o teste de patogenicidade representaram todos os grupos obtidos na análise de RAPD (Figura 1, Tabelas 3 e 4).

Todos os 23 isolados de *P. citrophthora* testados foram patogênicos a frutos de cacauero e seringueira, não sendo patogênicos a frutos de citros (Tabela 3). Tanto em cacauero como em seringueira, aos 3 dias da inoculação, já eram vistas as manchas de cor castanho escuras que evoluíram para lesões maiores aos 5 dias e, no caso dos frutos de seringueira, já era possível visualizar a formação de micélio e esporângios na superfície das lesões (Figura 2). O diâmetro médio das lesões provocadas em frutos de cacauero três dias após a inoculação por isolados provenientes deste hospedeiro variou de 1,1 a 4,4 cm para os frutos de cacauero e de 1,1 a 3,8 cm para os frutos de seringueira (Tabela 3). O isolado de eritrina (211) causou lesões nos dois hospedeiros (Figura 3); enquanto o isolado de citros (310) apresentou lesões bem menores que os dos demais isolados em frutos de cacauero, e, em frutos de seringueira as lesões só surgiram cinco dias após a inoculação. Entretanto, o isolado 310 de citros foi o único a incitar lesões no hospedeiro de origem (Figura 4). O outro isolado de citros (577) causou lesões similares às dos isolados mais patogênicos de cacauero.

Todos os 17 isolados de *P. palmivora* usados nos testes de patogenicidade infectaram frutos de cacau e as lesões, aos três dias após a inoculação, variaram de 1,9 a 3,1 para os isolados de cacau, de 2,2 a 3,5 cm para os de mamoeiro, e de 1,6 a 2,0 cm para os de pupunheira (Tabela 4). Em frutos de mamão, 5 isolados de cacau (224, 503, 262, 460 e 351) não causaram lesões 5 dias após a inoculação, porém, apenas o isolado 262 não causou lesão 7 dias após a inoculação. O diâmetro médio das lesões causadas pelos isolados de cacau em fruto de mamoeiro variou de 0,8 a 3,4 cm aos cinco dias. Dos três isolados de pupunheira testados (344, 401, 525), apenas o isolado 401 não causou lesão no fruto de mamoeiro aos cinco dias, porém, aos sete dias da inoculação, as lesões deste isolado se desenvolveram. As variações dos tamanhos de lesões dos isolados de pupunheira em fruto de mamoeiro, aos cinco dias da inoculação, variaram de 1,7 a 2,4 cm. Os isolados de mamoeiro, como era esperado, foram todos patogênicos à frutos de mamoeiro e as lesões, aos cinco dias, mediam entre 2,3 a 3,8 cm. Nos frutos de mamoeiro, aos 7 dias e nos de cacau aos 5 dias havia formação de micélio e esporângios de *P. palmivora* na superfície dos frutos (Figuras 5 a 7). Os frutos de todos os hospedeiros utilizados como testemunhas não apresentaram lesões.



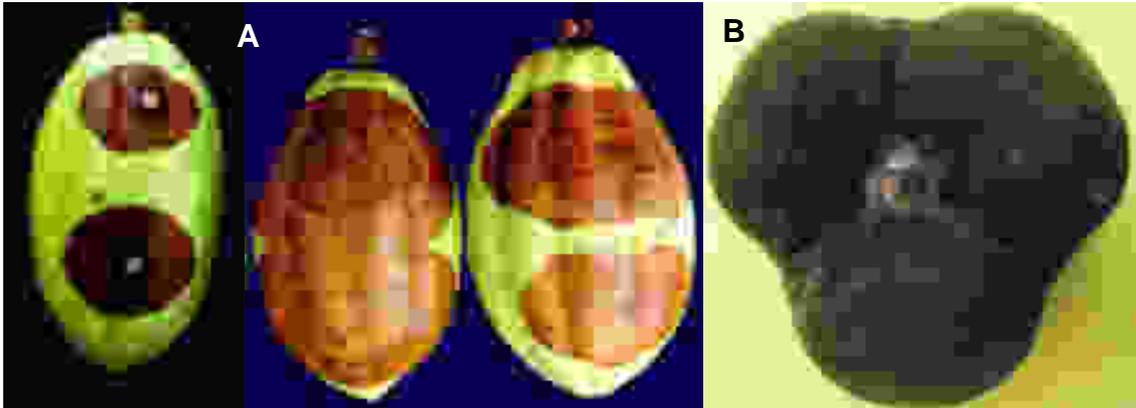
**Figura 1** – Dendrograma de espécies de *Phytophthora* baseado em marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Os coeficientes de similaridade de Jaccard foram agrupados através do método UPGMA. Os grupos foram definidos com base em 100% de similaridade. Os números entre parênteses representam o número adicional de isolados em cada grupo e são descritos pelas letras subscritas a seguir: <sup>A</sup>518, 519, 522; <sup>B</sup>6, 62, 101, 162, 189, 203, 219, 255, 268, 283, 286, 289, 290, 291, 292, 293, 299, 300, 341, 349, 516, 517, 520, 523, 526, 527, 528, 529, 532, 540, 543, 544, 545, 547, 552, 553, 554, 557, 560, 561, 562, 563, 566, 567, 569, 571, 572, 573; <sup>C</sup>564; <sup>D</sup>258; <sup>E</sup>171; <sup>F</sup>531; <sup>G</sup>245, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 363; <sup>H</sup>205, 206, 216, 226, 249, 252, 256, 257, 261, 262, 301, 302, 304, 305, 311, 343, 350, 351, 353, 354, 461, 462, 471, 503, 504, 514, 515, 539, 541; <sup>I</sup>401. Análise de bootstrap foi feita com base em 1000 repetições.

**Tabela 2** – Dimensões dos esporângios de isolados de *Phytophthora* spp. de diferentes hospedeiros.

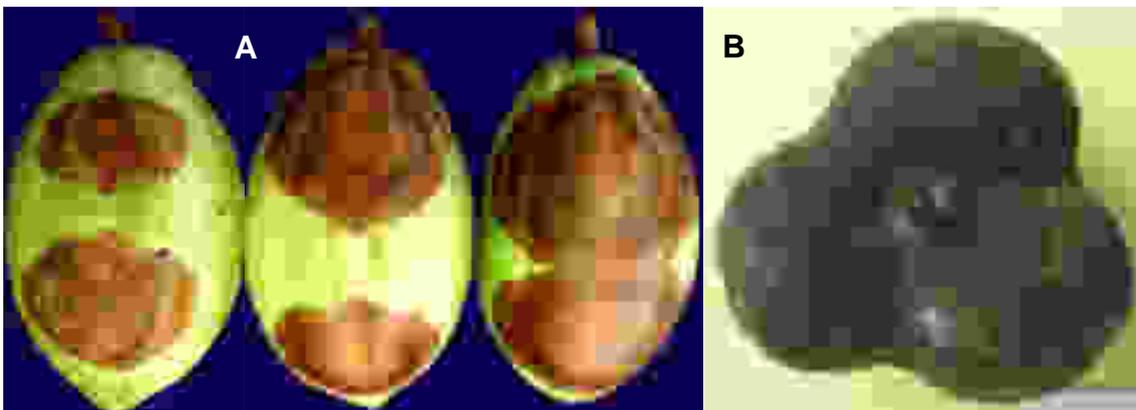
Espécie	Isolado	Hospedeiro	Dimensões dos Esporângios (µm)					
			Comp.	Larg.	Relação Comp/larg	Papila		Pedicelo Comp.
						Profund.	Abertura do poro	
<i>P. citrophthora</i>	62	cacaueiro	49,8±2,8 <sup>a</sup>	28,2±1,2	1,7:1	5,6±0,3	7,6±0,3	– <sup>b</sup>
<i>P. citrophthora</i>	310	citros	32,1±0,6	20,9±0,5	1,5:1	5,5±0,2	5,3±0,2	–
<i>P. palmivora</i>	245	mamoeiro	43,5±0,8	33,1±0,5	1,3:1	6,4±0,3	7,4±0,2	4,1±0,2
<i>P. palmivora</i>	356	mamoeiro	45,4±0,8	28,4±0,4	1,6:1	6,6±0,2	7,2±0,2	4,7±0,2
<i>P. palmivora</i>	252	cacaueiro	47,3±0,9	35,1±0,5	1,3:1	7,1±0,2	7,1±0,2	3,1±0,1
<i>P. palmivora</i>	344	pupunheira	40,6±0,9	18,9±0,2	2,1:1	5,7±0,2	5,9±0,1	3,5±0,2
<i>P. palmivora</i>	524	pupunheira	33±1,2	18±0,3	1,8:1	5,1±0,2	5±0,1	3,9±0,2

<sup>a</sup> Erro padrão da média, calculada com base em 50 esporângios por isolado.

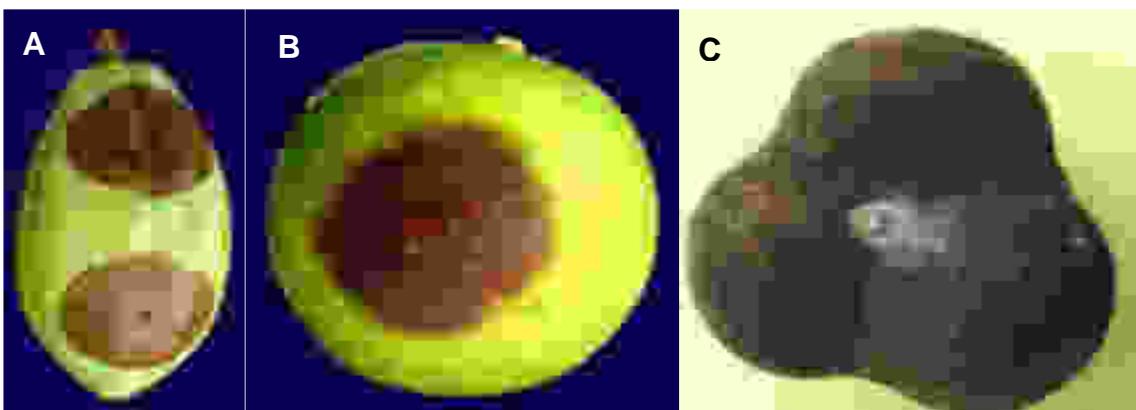
<sup>b</sup> – Isolado não caduco.



**Figura 2** – Lesões de *Phytophthora citrophthora* de cacau em fruto de cacau (a) e seringueira (b)



**Figura 3** – Lesões de *Phytophthora citrophthora* de eritrina em fruto de cacau (a) e seringueira (b)



**Figura 4** – Lesões de *Phytophthora citrophthora* de citros em fruto de cacau (a), citros (b) e seringueira (c)

**Tabela 3** – Diâmetro médio das lesões (cm) provocadas por *Phytophthora citrophthora* em cacaueteiro, seringueira e citros 3 e 5 dias após a inoculação.

Hospedeiro	Isolado	Diâmetro (cm) <sup>a</sup>				
		cacaueteiro		seringueira		citros
		3 dias	5 dias	3 dias	5 dias	5 dias
cacaueteiro	7	2,7	9	1,1	4,9	0,0
cacaueteiro	62	3,7	8,2	2,6	5,8	0,0
cacaueteiro	171	3,2	6,9	1,1	4,3	0,0
cacaueteiro	203	4,0	8,1	1,1	2,1	0,0
cacaueteiro	220	2,7	6,3	1,4	4,9	0,0
cacaueteiro	258	4,3	8,4	1,0	4,5	0,0
cacaueteiro	260	3,5	8,2	1,2	4,9	0,0
cacaueteiro	266	1,1	4,8	1,2	2,3	0,0
cacaueteiro	270	1,1	5,8	1,7	2,6	0,0
cacaueteiro	276	2,1	5,3	1,4	5,1	0,0
cacaueteiro	277	3,6	8,4	1,2	4,6	0,0
cacaueteiro	312	3,0	8,1	3,8	5,6	0,0
cacaueteiro	313	4,2	8,3	2,7	5,0	0,0
cacaueteiro	522	4,1	9,3	4,6	6,2	0,0
cacaueteiro	525	1,2	5,4	1,4	2,8	0,0
cacaueteiro	530	3,7	8,0	1,2	6,0	0,0
cacaueteiro	542	3,7	8,2	1,0	5,7	0,0
cacaueteiro	559	1,4	5,1	1,5	2,1	0,0
cacaueteiro	565	4,4	7,8	1,3	2,7	0,0
citros	310	0,9	1,2	0,0	3,3	2,9
citros	577	2,3	4,8	1,8	5,5	– <sup>b</sup>
eritrina	211	4,0	8,6	0,9	4,1	0,0

<sup>a</sup>média de 6 pontos de inoculação por isolado e hospedeiro

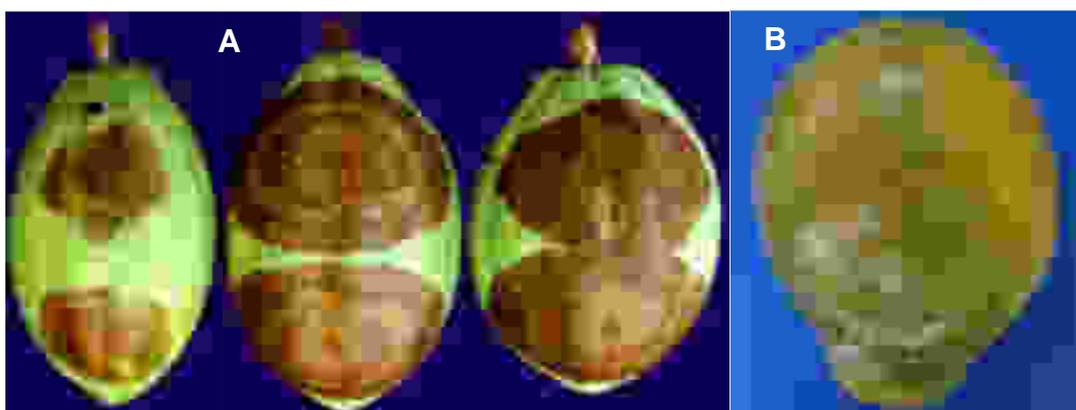
<sup>b</sup>não inoculado



**Figura 5** – Lesões de *Phytophthora palmivora* de cacaueiro em frutos de cacau (a) e mamão (b)



**Figura 6** – Lesões de *Phytophthora palmivora* de pupunheira em frutos de cacau (a) e mamão (b)



**Figura 7** – Lesões de *Phytophthora palmivora* de mamoeiro em frutos de cacau (a) e mamão (b)

**Tabela 4** – Diâmetro médio das lesões (cm) provocado por *Phytophthora palmivora* em frutos de cacaueteiro (3 e 5) dias e mamoeiro (5 e 7) dias após a inoculação.

Hospedeiro	Isolado	Diâmetro (cm) <sup>a</sup>			
		cacaueteiro		mamoeiro	
		3 dias	5 dias	5 dias	7 dias
cacaueteiro	224	1,9	3,1	0,0	0,6
cacaueteiro	226	2,5	6,1	0,8	2,7
cacaueteiro	252	3,0	8,2	3,4	4,5
cacaueteiro	262	2,0	3,8	0,0	0,0
cacaueteiro	305	2,1	5,6	3,2	4,1
cacaueteiro	351	3,1	8,0	0,0	2,1
cacaueteiro	460	2,9	7,9	0,0	2,1
cacaueteiro	471	3,1	8,2	3,3	3,9
cacaueteiro	503	2,7	7,8	0,0	2,0
mamoeiro	245	2,2	3,6	2,3	3,3
mamoeiro	250	2,7	6,5	3,5	4,6
mamoeiro	356	3,5	7,6	2,9	4,3
mamoeiro	359	3,5	7,9	3,8	4,8
mamoeiro	361	2,7	6,6	3,8	4,5
pupunheira	344	1,6	2,7	1,7	3,8
pupunheira	401	1,8	3,8	0,0	3,0
pupunheira	524	2,0	4,7	2,4	3,1

<sup>a</sup>média de 6 pontos de inoculação por isolado e hospedeiro

#### **4.3.4. Análise de diversidade e filogenia com base no sequenciamento de três genes nucleares**

Estudos de diversidade e filogenia foram feitos através do sequenciamento de fragmentos de três genes nucleares, incluindo a região ITS (*Internal Transcribed Spacers*) do DNA ribossomal, fator de alongação 1- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina. Os isolados usados nos estudos de diversidade e filogenia foram selecionados com base nas análises de RAPD, de modo a representar todos os grupos formados (Tabela 5).

#### **4.3.5. Análise de seqüências da região ITS do rDNA**

As seqüências da região ITS do DNA ribossômico dos 23 isolados de *P. citrophthora* e dos 17 isolados de *P. palmivora* analisados foram baseados em 742-pb de nucleotídeos alinhados. O filograma mostrou nítida diferenciação entre as espécies estudadas (Figura 8). Os isolados de *P. citrophthora* de cacau e eritrina formaram um grupo que apresentou identidade de seqüências de 100% entre si, de 96% quando comparados com *P. tropicalis* de cacau, de 96,6% quando comparado ao isolado 310 de *P. citrophthora* de citros e 95,6% ao isolado 577 de citros. Portanto, os isolados de *P. citrophthora* de cacau estão mais próximos do isolado de *P. tropicalis* do que dos isolados de *P. citrophthora* de citros.

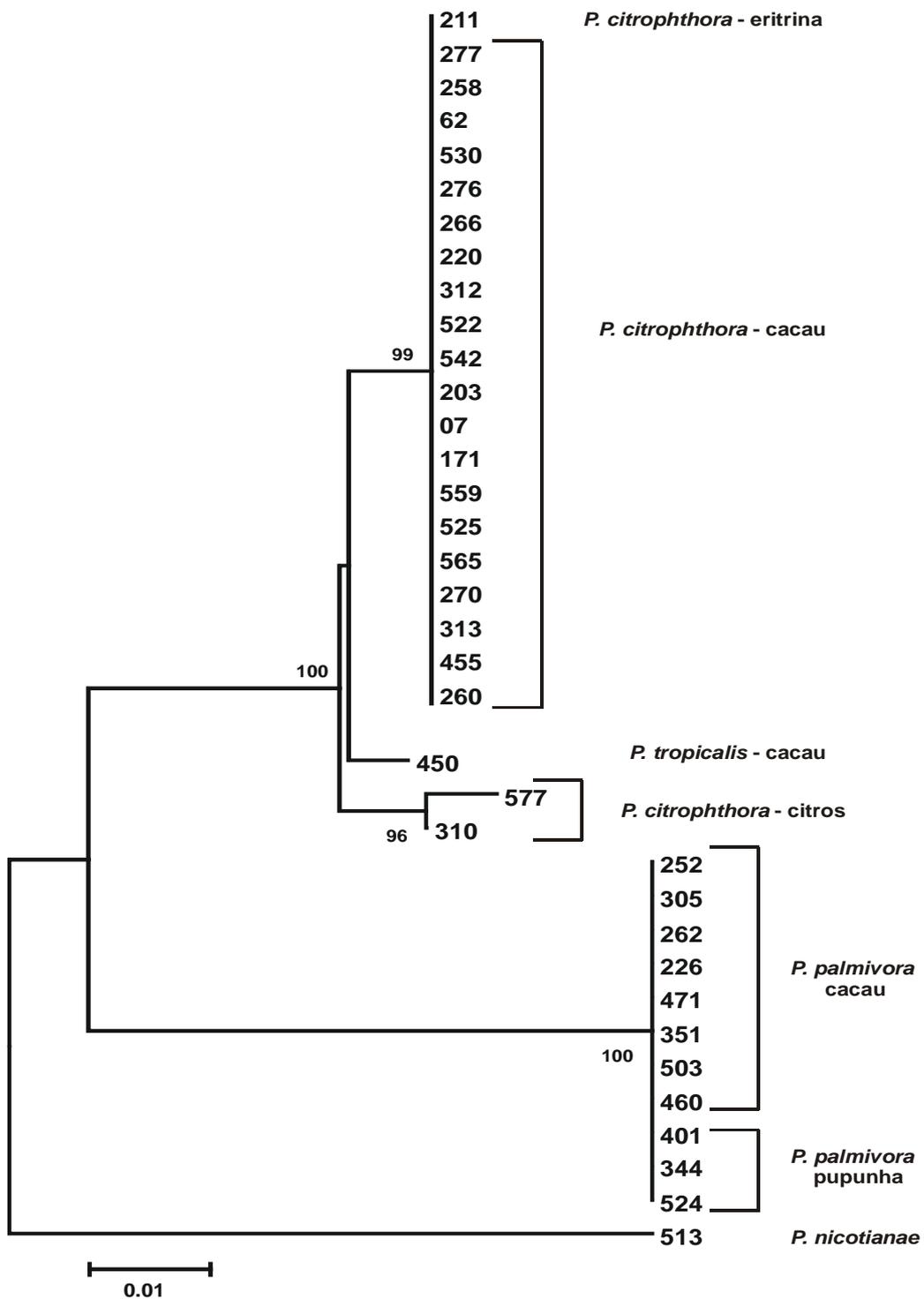
A região ITS de todos os isolados de *P. palmivora* de cacau e pupunheira foram seqüenciadas, mas, não foi possível, por motivo ainda desconhecido, obter seqüências dos isolados provenientes de mamoeiro para esta região. Os isolados de *P. palmivora* apresentaram identidade de seqüências de 100% entre si, de 89,4% com *P. citrophthora* de cacau, de 88,7% com *P. tropicalis* e com *P. citrophthora* de citros, 88% para o isolado 577 e 88,3% para o isolado 310. *P. nicotianae* apresentou 87,4% e 87,3% de identidade de seqüências com os isolados de *P. citrophthora* de cacau e *P. palmivora*, respectivamente.

Não se observou agrupamento dos isolados de *P. citrophthora* e *P. palmivora* em relação aos hospedeiros e as regiões geográficas de origem.

**Tabela 5** – Isolados selecionados e genes para os quais foram seqüenciados.

<i>Espécies</i>	Isolados	Hospedeiros	ITS <sup>a</sup>	EL 1- $\alpha$ <sup>b</sup>	$\beta$ -TUBU <sup>c</sup>
<i>P. citrophthora</i>	07	cacaueiro	X <sup>d</sup>	X	– <sup>e</sup>
<i>P. citrophthora</i>	62	cacaueiro	X	X	–
<i>P. citrophthora</i>	171	cacaueiro	X	X	–
<i>P. citrophthora</i>	203	cacaueiro	X	X	–
<i>P. citrophthora</i>	220	cacaueiro	X	X	–
<i>P. citrophthora</i>	258	cacaueiro	X	X	–
<i>P. citrophthora</i>	260	cacaueiro	X	X	X
<i>P. citrophthora</i>	266	cacaueiro	X	X	–
<i>P. citrophthora</i>	270	cacaueiro	X	X	–
<i>P. citrophthora</i>	276	cacaueiro	X	X	–
<i>P. citrophthora</i>	277	cacaueiro	X	X	–
<i>P. citrophthora</i>	312	cacaueiro	X	X	–
<i>P. citrophthora</i>	313	cacaueiro	X	X	–
<i>P. citrophthora</i>	455	cacaueiro	X	X	X
<i>P. citrophthora</i>	522	cacaueiro	X	X	–
<i>P. citrophthora</i>	525	cacaueiro	X	X	–
<i>P. citrophthora</i>	530	cacaueiro	X	X	–
<i>P. citrophthora</i>	542	cacaueiro	X	X	X
<i>P. citrophthora</i>	559	cacaueiro	X	X	–
<i>P. citrophthora</i>	565	cacaueiro	X	X	–
<i>P. citrophthora</i>	310	citros	X	X	X
<i>P. citrophthora</i>	577	citros	X	X	–
<i>P. citrophthora</i>	211	eritrina	X	X	–
<i>P. palmivora</i>	224	cacaueiro	–	X	X
<i>P. palmivora</i>	226	cacaueiro	X	X	X
<i>P. palmivora</i>	252	cacaueiro	X	X	–
<i>P. palmivora</i>	262	cacaueiro	X	X	X
<i>P. palmivora</i>	305	cacaueiro	X	X	–
<i>P. palmivora</i>	351	cacaueiro	X	X	X
<i>P. palmivora</i>	460	cacaueiro	X	X	X
<i>P. palmivora</i>	471	cacaueiro	X	X	–
<i>P. palmivora</i>	503	cacaueiro	X	X	–
<i>P. palmivora</i>	245	mamoeiro	–	X	X
<i>P. palmivora</i>	250	mamoeiro	–	X	X
<i>P. palmivora</i>	356	mamoeiro	–	X	X
<i>P. palmivora</i>	359	mamoeiro	–	X	X
<i>P. palmivora</i>	361	mamoeiro	–	X	X
<i>P. palmivora</i>	344	pupunheira	X	X	X
<i>P. palmivora</i>	401	pupunheira	X	X	–
<i>P. palmivora</i>	524	pupunheira	X	X	X
<i>P. tropicalis</i>	450	cacaueiro	X	X	X
<i>P. nicotianae</i>	513	morango	X	X	X

<sup>a</sup> região ITS do rDNA<sup>b</sup> fator de alongação 1- $\alpha$ <sup>c</sup>  $\beta$ - tubulina<sup>d</sup> X gene seqüenciado<sup>e</sup> – não seqüenciado



**Figura 8** – Filograma genético das relações entre as espécies de *Phytophthora* baseado em 742-pb de nucleotídeos alinhados da região ITS do rDNA. O filograma foi construído utilizando-se o método Neighbour-Joining com os parâmetros de Jukes-Cantor. Os valores apresentados nas ramificações do filograma correspondem às percentagens da análise de bootstrap, que foram calculados com base em 1000 repetições. A escala indica o número de substituições de nucleotídeos por sítio.

#### 4.3.6. Análise de seqüências do fator de alongação 1- $\alpha$

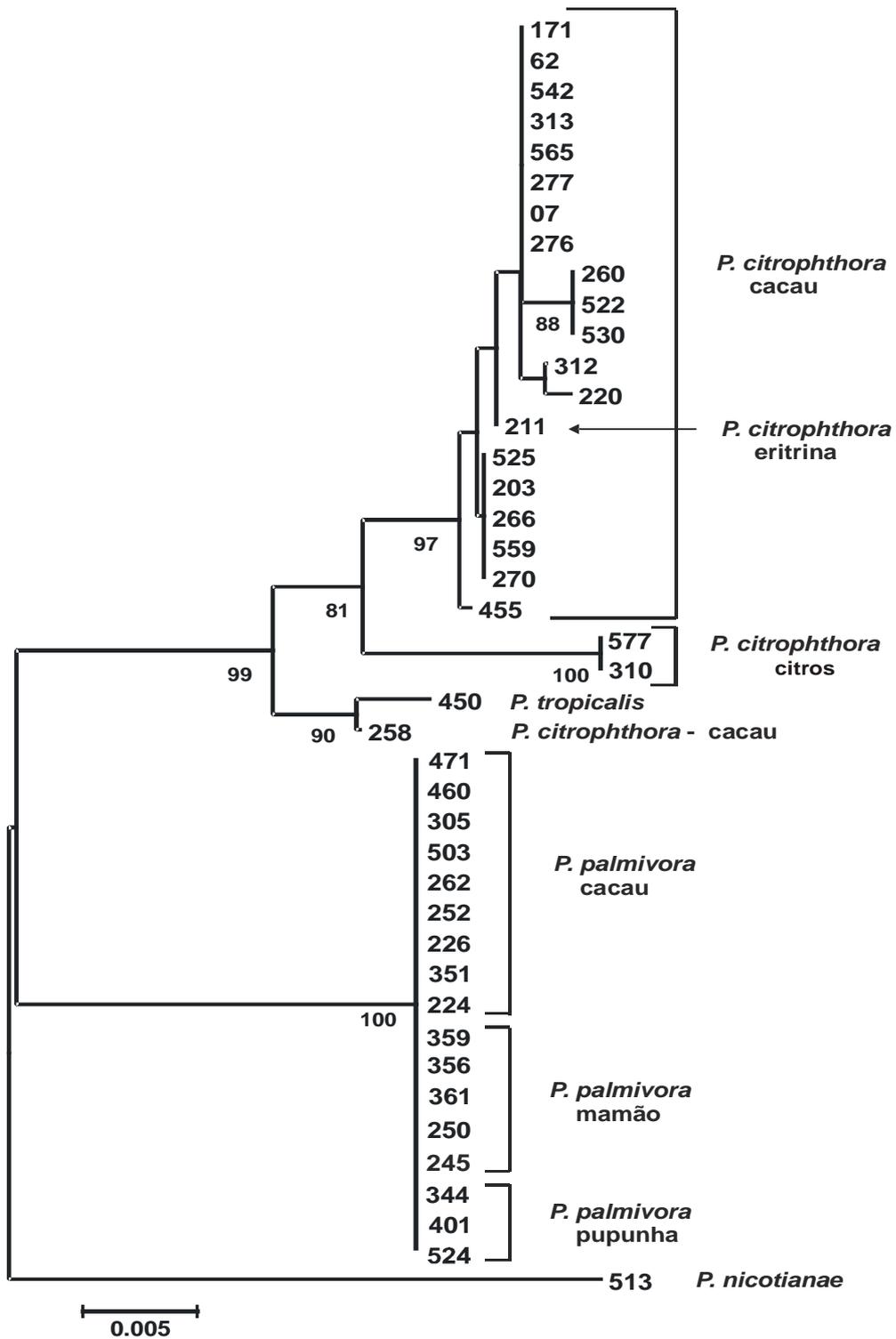
Os estudos de diversidade e filogenia baseados em seqüências do fator de alongação 1- $\alpha$  dos isolados de *P. citrophthora* e *P. palmivora* foram baseados em 899-pb de nucleotídeos alinhados. Os isolados de *P. citrophthora* de cacauero formaram seis grupos (Figura 9), com identidade de seqüências variando de 96 a 100%. O isolado de eritrina formou um grupo independente, porém, próximo aos grupos de cacauero. O isolado 258 de cacauero apresentou-se mais próximo de *P. tropicalis* (99% de identidade de seqüências) do que de *P. citrophthora* de citros (98%) e dos isolados de cacauero e eritrina (98.3 a 98.8%). Isto indica uma possível relação com *P. tropicalis* ou outra espécie próxima a esta. Os dois isolados de citros formaram um grupo distinto com identidade de seqüência de 100%. As identidades de seqüências para estes isolados quando comparados aos outros isolados de cacauero e eritrina variaram de 96 a 98%, enquanto a dos isolados de citros comparados à *P. tropicalis* foi de 98%.

Os isolados de *P. palmivora* formaram um grupo único com identidades de seqüência de 100%, independente do hospedeiro e da origem geográfica. A identidade das seqüências de *P. palmivora* quando comparada com as de *P. citrophthora* de cacauero, eritrina e citros variou de 96 a 97%.

A identidade das seqüências de *P. citrophthora* e *P. palmivora* com relação a *P. nicotianae* variou de 95 a 96%.

#### 4.3.7. Análise de seqüências de $\beta$ -tubulina

O filograma genético das relações entre os 16 isolados seqüenciados para o fragmento deste gene foi baseado em 914-pb de nucleotídeos alinhados (Figura 10). Os isolados de *P. palmivora* de cacauero e mamoeiro formaram 2 grupos, um com nove isolados e outro apenas com o isolado 224 de cacauero, com identidade de seqüência entre eles de 99,8%. Os isolados de *P. palmivora* de pupunheira formaram um grupo independente com bootstrap de 99% e identidade

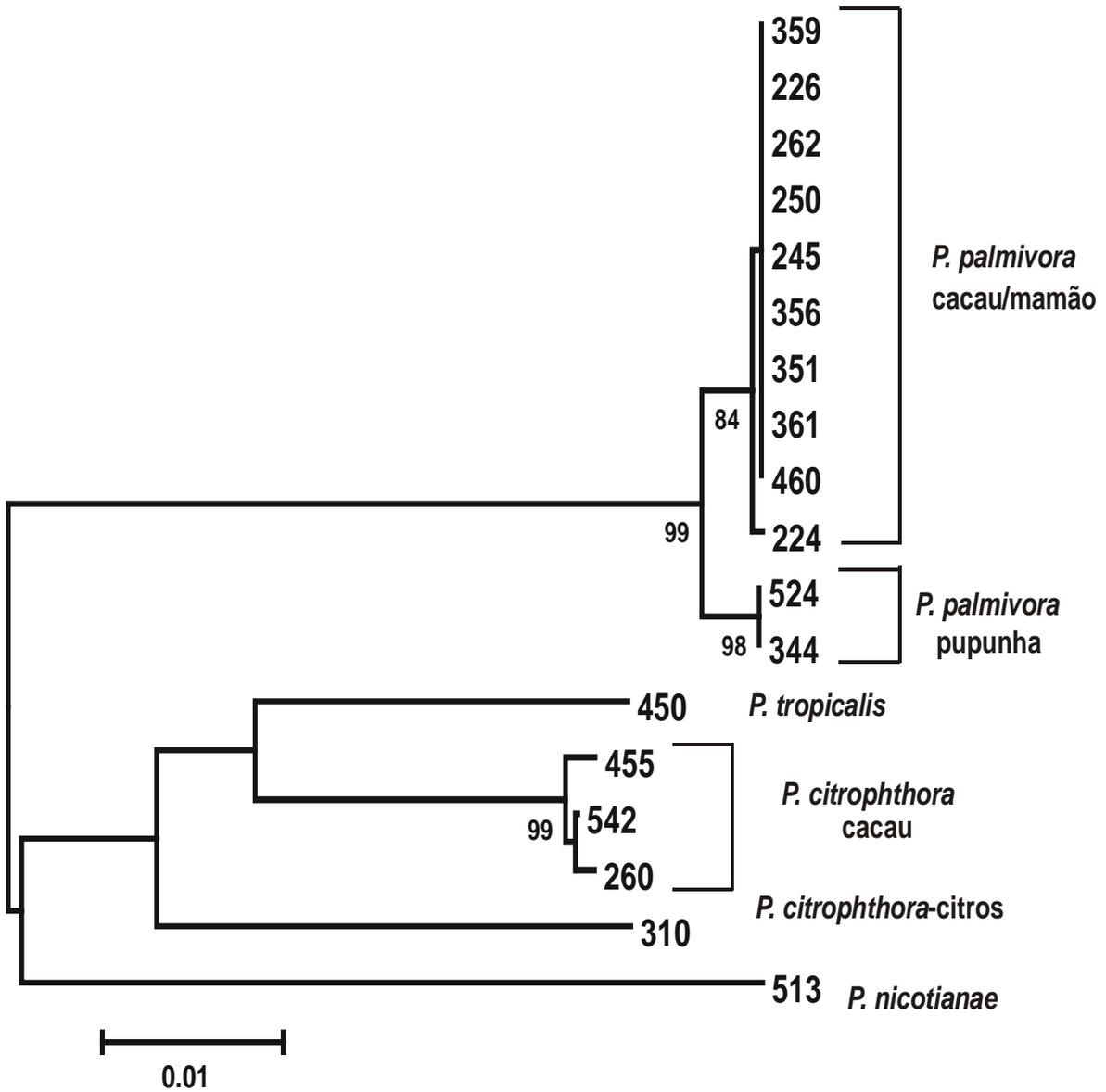


**Figura 9** – Filograma genético das relações entre espécies de *Phytophthora* baseado em um fragmento de 899-pb de nucleotídeos alinhados do gene fator alongação 1- $\alpha$ . O filograma foi construído utilizando-se o método Neighbour-Joining com os parâmetros de Jukes-Cantor. Os valores apresentados nas ramificações do filograma correspondem ao bootstrap dados em porcentagem e calculados com base em 1000 repetições. A escala indica o número de substituições de nucleotídeos por sítio.

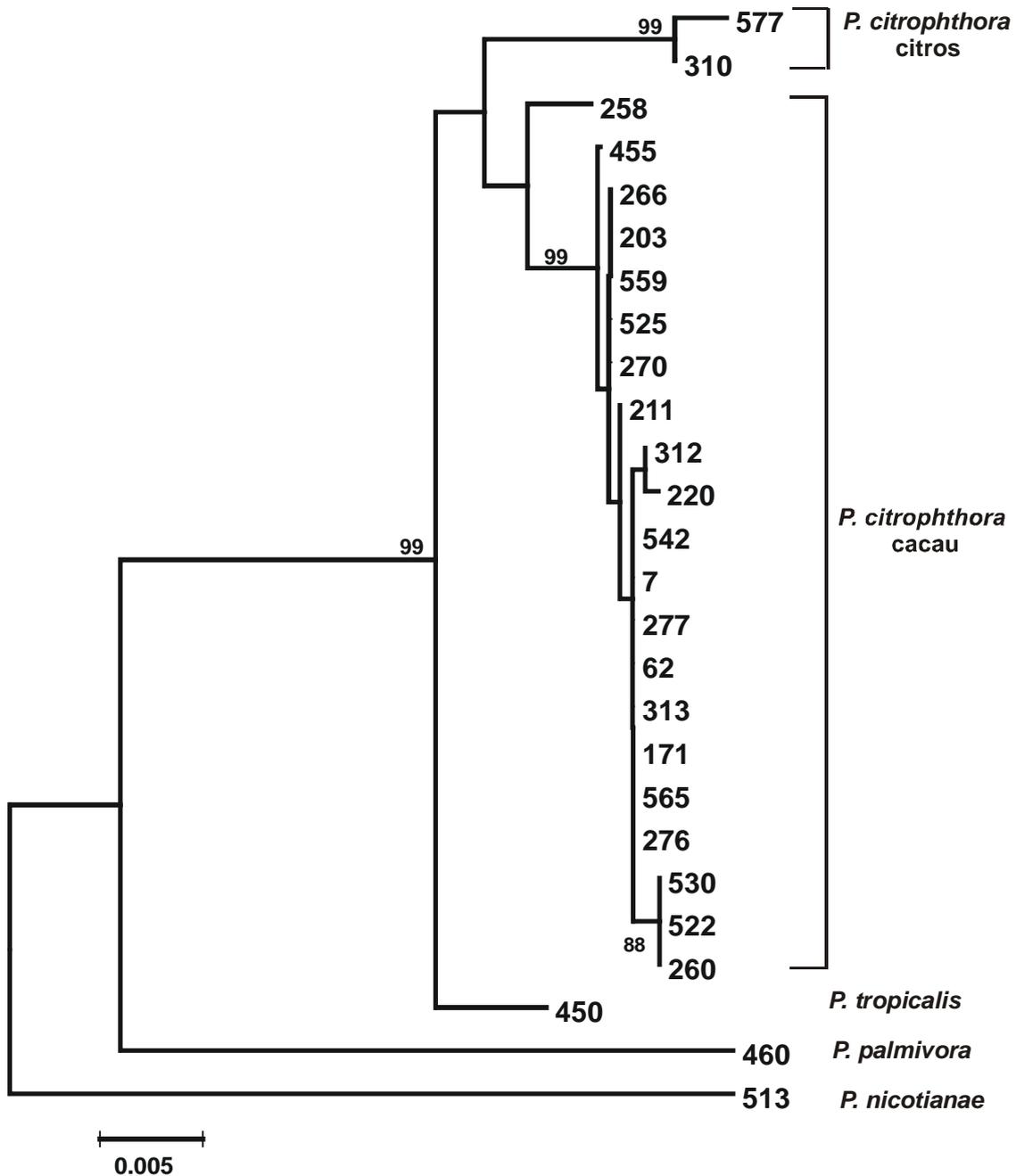
de seqüência de 99,3 a 99,4% em comparação com os isolados de cacauero e mamoeiro. Novamente não foram observadas diferenças por localização geográfica e hospedeiro para os isolados de cacauero e mamoeiro. Observou-se também neste filograma maior proximidade dos isolados de *P. citrophthora* de cacauero com *P. tropicalis* do que com *P. citrophthora* de citros. A identidade das seqüências de *P. citrophthora* de cacauero com *P. tropicalis* variou de 96,1 a 96,2% enquanto com *P. citrophthora* de citros variou de 95,2 a 95,4%.

#### **4.3.8. Análise combinada de seqüências da região ITS e fator de alongação 1- $\alpha$ para *Phytophthora citrophthora***

Os dois genes, região ITS e fator de alongação 1- $\alpha$  foram combinados para a construção do filograma genético para a espécie *P. citrophthora* (Figura 11). Foram usados 19 isolados de cacauero, um de eritrina, dois de citros e como controle um isolado de cada uma das seguintes espécies: *P. palmivora* (460), *P. tropicalis* (450) e *P. nicotianae* (513). Os isolados de *P. citrophthora* de cacauero formaram seis grupos e o isolado de eritrina formou outro grupo. As identidades de seqüências entre estes grupos variaram de 99,1 a 99,9% e tenderam a seguir os agrupamentos verificados para o fator de alongação 1- $\alpha$  (Figura 9), uma vez que o gene ITS agrupou estes isolados todos juntos. Como nos filogramas anteriores, as identidades de seqüências dos isolados de cacauero e eritrina foram mais próximas do isolado de *P. tropicalis* (variaram de 97,1 a 98%) do que dos 2 isolados de *P. citrophthora* de citros para os quais a variação de identidade de seqüências foi de 96,4 a 97%.



**Figura 10** – Filograma genético das relações entre espécies de *Phytophthora* baseado em 914-pb de nucleotídeos alinhados do gene  $\beta$ -tubulina. O filograma foi construído utilizando-se o método Neighbour-Joining com os parâmetros de Jukes-Cantor. Os valores apresentados nas ramificações do filograma correspondem ao bootstrap dados em porcentagem e foram calculados com base em 1000 repetições. A escala indica o número de substituições de nucleotídeos por sítio.

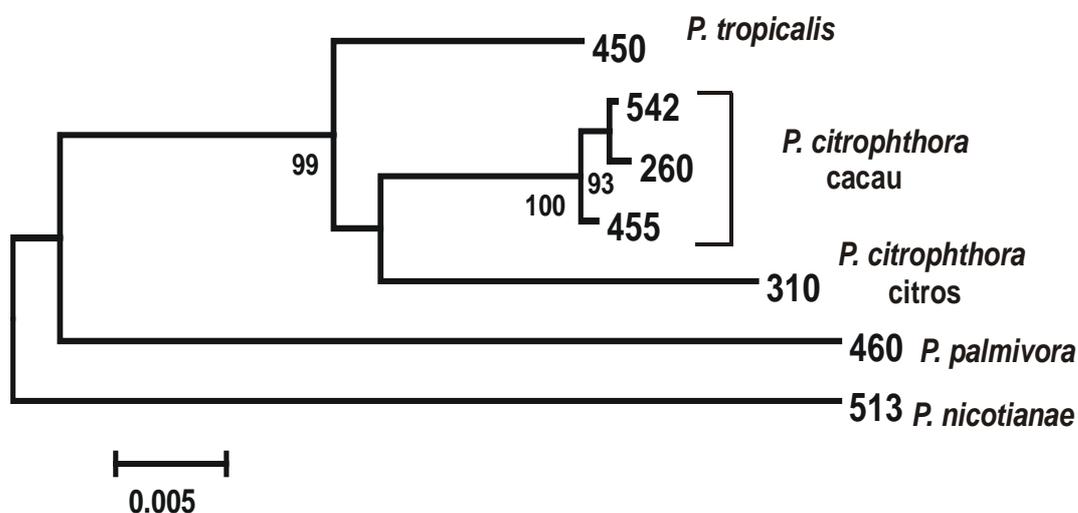


**Figura 11** – Filograma genético da combinação de dois genes (região ITS e fator de alongação 1- $\alpha$ ) para a espécie *Phytophthora citrophthora* baseado em 1645-pb de nucleotídeos alinhados destes genes. O filograma foi construído utilizando-se o método Neighbour-Joining com os parâmetros de Jukes-Cantor. Os valores apresentados nas ramificações do filograma correspondem ao bootstrap dados em porcentagem e foram calculados com base em 1000 repetições. A escala indica o número de substituições de nucleotídeos por sítio.

#### 4.3.9. Análise combinada de seqüências da região ITS, fator de alongação 1- $\alpha$ e $\beta$ -tubulina para *Phytophthora citrophthora*

O filograma genético para a espécie *Phytophthora citrophthora* foi construído baseado em seqüências de fragmentos dos três genes ITS, fator de alongação 1- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina combinados. Embora somente três isolados de cacau tenham sido usados repetiu-se à separação do isolado 455 dos dois outros isolados (Figura 12). Combinando os três genes repetiu-se a maior proximidade dos isolados *P. citrophthora* de cacau com *P. tropicalis* do que com *P. citrophthora* de citros ou *P. palmivora*, que também foi incluída neste filograma para termos comparativos.

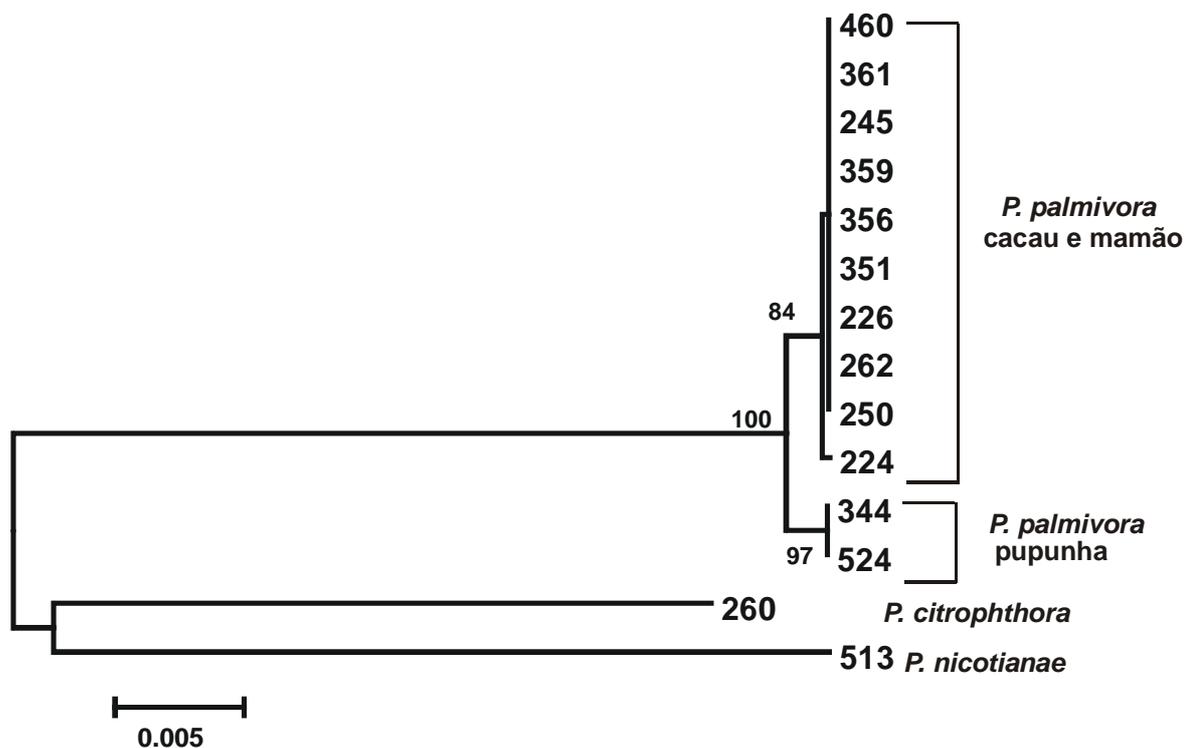
Diante destes resultados é possível inferir que os isolados obtidos de cacau e de eritrina, que fazem parte deste estudo, e que até então eram classificados com *P. citrophthora*, não podem ser colocados no mesmo táxon que os de citros.



**Figura 12**– Filograma genético da combinação de três genes (região ITS, fator de alongação 1- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina) para a espécie *Phytophthora citrophthora* baseado em 2551-pb de nucleotídeos alinhados destes genes. O filograma foi construído utilizando-se o método Neighbour-Joining com os parâmetros de Jukes-Cantor. Os valores apresentados nas ramificações do filograma correspondem ao bootstrap dados em porcentagem e foram calculados com base em 1000 repetições. A escala indica o número de substituições de nucleotídeos por sítio.

#### 4.3.10. Análise combinada de seqüências fator de alongação 1- $\alpha$ e $\beta$ -tubulina para *Phytophthora palmivora*

O filograma genético para a espécie *P. palmivora* foi baseado em 1813-pb de nucleotídeos alinhados da combinação dos genes fator de alongação 1- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina (Figura 13). Os isolados de cacau e mamoeiro formaram dois grupos, sendo um composto exclusivamente pelo isolado 224, com seqüência de identidade 99,9% quando comparado com os outros nove isolados de cacau e de mamoeiro. Os isolados 344 e 524 de pupunheira separaram-se dos demais, mostrando uma identidade de seqüência que variou de 99,6 a 99,7% em relação a aqueles obtidos de cacau e mamoeiro. *Phytophthora citrophthora* e *P. nicotianae* foram incluídas, para efeito de comparação e formaram grupos separados.



**Figura 13** – Filograma genético da combinação de dois genes (alongação 1- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina) para a espécie *Phytophthora palmivora* baseado em 1813-pb de nucleotídeos alinhados destes genes. O filograma foi construído utilizando-se o método Neighbour-Joining com os parâmetros de Jukes-Cantor. Os valores apresentados nas ramificações do filograma correspondem ao bootstrap dados em porcentagem e foram calculados com base em 1000 repetições. A escala indica o número de substituições de nucleotídeos por sítio.

#### 4.4. DISCUSSÃO

Este trabalho abrange uma análise detalhada da diversidade e da filogenia de 116 isolados, sendo 73 isolados de *P. citrophthora* e 43 de *P. palmivora* oriundos de diversos hospedeiros. Estudos de RAPD, caracteres morfobiométricos, patogenicidade e análises de seqüências de fragmentos de três genes nucleares foram realizados. Devido ao aumento das populações de *P. palmivora* e *P. citrophthora* na região da Bahia e de sua importância em função da ampla gama de hospedeiros havia necessidade de uma análise abrangente desses patógenos na região.

As análises de RAPD permitiram a separação nítida das espécies como já havia sido observado anteriormente (Faleiro et al., 2003, 2004). No entanto o número de isolados utilizados no presente estudo foi bem maior, aumentando a confiabilidade das conclusões relativas a diversidade destas espécies na região cacauera. A semelhança de resultados obtidos por outros autores foi observada uma maior diversidade em *P. citrophthora* do que em *P. palmivora* (Oudemans e Coffey, 1991; Mchau e Coffey, 1994). Os isolados de *P. citrophthora* de cacauero apresentaram-se geneticamente distantes dos de citros. Resultados similares foram observados por Oudemans e Coffey (1991) trabalhando com isoenzimas.

No presente estudo os isolados de *P. citrophthora* foram mais próximos ao de *P. tropicalis* de acordo com a análise filogenética obtida com seqüências dos genes ITS e  $\alpha$ -tubulina e da combinação destes com o fator alongação 1- $\alpha$  (Figuras 1, 8, 10 e 12). Porém, pela análise de seqüências obtidas para o gene fator de alongação 1- $\alpha$  (Figura 9) e para a combinação deste com ITS (figura 11) os isolados do cacauero apresentaram posicionamento intermediário em relação a *P. citrophthora* de citros e *P. tropicalis*. Segundo alguns autores, análises de isoenzimas e seqüências ITS demonstraram similaridades entre *P. capsici* e *P. citrophthora* do cacauero (Ortiz-Garcia, 1996; Foster et al., 1995; Appiah et al., 2004). A similaridade entre *P. capsici* e *P. tropicalis* está consolidada na literatura (Aragaki e Uchida, 2001; Zhang et al., 2004).

De acordo com os dados morfométricos (Tabela 2) o isolado de cacauero e o de citros, apesar das maiores dimensões para os esporângios do primeiro,

foram classificados como *P. citrophthora*, por estarem estas medidas dentro dos padrões estabelecidos para a espécie (Waterhouse, 1963; Stamps et al., 1990; Mchau e Coffey, 1994). No entanto, houve variação quanto à produção de clamidósporos que foram abundantemente formados nos isolados de cacauero, como já descrito na literatura (Campêlo e Luz, 1981; Cerqueira et al., 1999). Enquanto que, clamidósporos foram observados raramente no isolado de citros, apenas quando cultivados em meio líquido de cenoura. Como só foram aferidos os esporângios de um único isolado de citros, é possível que outras variações pudessem ser notadas com um maior número de isolados de cada um dos hospedeiros.

No tocante a patogenicidade dos isolados a frutos de cacauero, seringueira e citros, observou-se a especificidade do hospedeiro em citros, pois apenas o isolado de citros (310) foi patogênico à cultivar laranja. No entanto, os isolados de citros foram ambos patogênicos ao cacauero e a seringueira, contrariamente ao que havia sido observado por Kellam e Zentmyer (1986) que afirmaram não haver reciprocidade na patogenicidade de isolados de citros ao cacauero e vice versa. Esta especificidade de hospedeiro pode ser considerada como uma característica de co-evolução entre patógeno e hospedeiro, sendo um caráter a ser levado em conta na taxonomia destas espécies. As diferenças na produção de clamidósporos e a inabilidade de infectar citros, aliados às diferenças observadas entre os isolados de cacauero e os de citros em RAPD, análises filogenéticas com sequências da região ITS, fator de alongação 1- $\alpha$ , -tubulina e as combinações destes, comprovam que os isolados de cacauero atualmente conhecidos como *P. citrophthora* não devem continuar a ser incluídos nesta espécie, apesar das características morfológicas serem idênticas. Espécies crípticas são aquelas que apesar das características morfológicas serem similares ou mesmo idênticas, são consideradas como espécies diferentes por métodos moleculares combinadas a diferenças fisiológicas. As espécies crípticas são comuns entre os fungos, principalmente entre os ascomicetos (Geiser et al., 1998), entretanto, no gênero *Phytophthora*, esta é a primeira observação. A localização intermediária dos isolados de cacauero e eritrina entre *P. tropicalis* e *P. citrophthora* de citros, observada na topologia de todos os filogramas genéticos (Figuras 8, 9, 10, 11 e 12) indicam que estes isolados podem ser híbridos

interespecíficos. Um dos prováveis parentais deste híbrido seria *P. citrophthora* (de citros), devido aos caracteres morfológicos serem similares em todos os isolados de *P. citrophthora* conhecidos, independentemente do hospedeiro de origem. O fato do isolado 258 de cacaueteiro apresentar-se mais próximo de *P. tropicalis* do que dos outros isolados de cacaueteiro, de acordo com a análise das seqüências do gene fator de alongação 1- $\alpha$  (Figura 10), é uma evidência de que esta espécie ou *P. capsici*, que é comprovadamente próxima a ela, seja o outro parental relacionado com a formação do híbrido. A possibilidade de hibridização em espécies de *Phytophthora* heterotáticas é fartamente comentada na literatura sobre o gênero (Brasier, 1991). Embora a formação de oósporos não faça parte do ciclo de vida da espécie *P. citrophthora* (Stamps et al., 1990), Mchau e Coffey (1994) relataram a produção desses esporos sexuais quando alguns isolados (menos de 30% dos 77 isolados por eles estudados) de *P. citrophthora* foram pareados com um isolado do tipo compatível A<sub>2</sub> de *P. capsici*. Existem, portanto, evidências concretas da possibilidade de cruzamento entre estas espécies. Os isolados de cacaueteiro e o de eritrina analisados neste trabalho são morfológicamente similares aos de citros, principalmente, quanto à forma dos esporângios, e também, guardam em comum a infertilidade das culturas, que é marcante em *P. citrophthora*. Estas semelhanças fortalecem as ligações filogenéticas dos isolados de cacaueteiro com a espécie, *P. citrophthora* da qual provavelmente descendem. Como as variações nas seqüências de isolados de cacaueteiro e das outras espécies foram pequenas e apenas um isolado de *P. tropicalis* e dois de *P. citrophthora* de citros, aparentemente distintos, foram seqüenciados, será necessário utilizar-se em estudos subseqüentes, um maior número de isolados dessas espécies e comparar com seqüências de um maior número de genes para confirmar a condição híbrida dos isolados de cacaueteiro.

O isolado 211 obtido de raízes de eritrina foi tão virulento a frutos de cacaueteiro e seringueira quanto os isolados de cacaueteiro, no entanto, nas análises de RAPD e das seqüências do gene fator de alongação 1- $\alpha$ , formou um grupo distinto, porém, muito próximo aos dos isolados de cacaueteiro (Figuras 1 e 9). É provável que isto represente uma adaptação genética dos isolados de cacaueteiro para atacar eritrina, que é usada como sombreamento desta cultura e, cujas raízes, entrelaçam-se comumente as do cacaueteiro, competindo por nutrientes no

mesmo substrato. Assim, as raízes de eritrina e do cacauero podem servir mutuamente de fonte de inóculo para os dois hospedeiros.

Não foi observada diversidade genética entre os isolados de *P. palmivora* obtidos do cacauero nas análises de RAPD ou das seqüências dos genes ITS e fator de alongação 1- $\alpha$ , confirmando resultados de outros autores (Ortiz-Garcia, 1996; Ducamp et al., 2004). Entre os isolados de cacaueros testados estavam três isolados obtidos do Peru e um de Honduras mostrando que a espécie não apresenta diversidade genética em função de local de origem dos isolados.

Nas análises de RAPD os isolados de *P. palmivora* originários de cacauero, mamoeiro e pupunheira formaram grupos distintos (Figura 1). Os isolados de mamoeiro apresentaram uma banda específica que os diferenciava dos demais isolados de *P. palmivora*, agrupando-os entre si. No entanto, não houve separação por hospedeiro dentro dos isolados dessa espécie para as análises de seqüências de fragmentos da região ITS (Figura 8) e do fator de alongação 1- $\alpha$  (Figura 9). Porém, os isolados de pupunheira e um isolado de cacauero (224) formaram grupos específicos para as seqüências do gene  $\beta$ -tubulina e da combinação destas com seqüências da região ITS. O isolado 224 de cacauero que apresentou pequena distância genética dos demais para as seqüências de  $\beta$ -tubulina, estando em um grupo à parte, também divergiu dos demais quanto à patogenicidade. As lesões por ele causadas tanto em frutos de cacauero quanto de mamoeiro foram muito pequenas. É interessante notar que as dimensões e a forma dos esporângios dos isolados de pupunheira diferenciam-se das dos demais isolados de cacauero e mamoeiro avaliados (Tabela 2), não se enquadrando nas dimensões definidas para *P. palmivora* (Waterhouse, 1963; Stamps et al., 1990). Os dois isolados testados (344 e 401) causaram lesões menores em frutos de cacauero quando comparados aos demais, sendo que o isolado 401, só apresentou lesões nos frutos de mamoeiro após 5 dias da inoculação. Estes são indícios de divergência genética entre estes e os demais isolados de *P. palmivora* testados. A intensificação do cultivo da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) no estado da Bahia data dos anos 80, para a produção de palmito. Embora, *P. palmivora* já houvesse sido assinalada como patógeno deste cultivo em outras partes do Brasil e do mundo onde a pupunheira é

cultivada, é possível que o patógeno tenha sido introduzido na Bahia junto com seu hospedeiro.

Estudos subseqüentes deverão ser realizados para provar se o patógeno da pupunheira pertence realmente à espécie *P. palmivora* ou é uma outra espécie.

Este trabalho, portanto, evidenciou a necessidade da continuidade de estudos no sentido de elucidar a genealogia dos isolados de cacaueteiro até o momento classificados como *P. citrophthora* e a verdadeira posição taxonômica dos isolados de pupunheira tidos como pertencentes à espécie *P. palmivora*.

#### 4.5. AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado ao primeiro autor. A Edson Moreira da Michelin pela prestimosa colaboração no envio de frutos de seringueira, destinadas aos testes de patogenicidade. Ao WCF pelo auxílio financeiro e ao projeto BIOMOL pela utilização do laboratório de biotecnologia. Ao pessoal do laboratório de *Phytophthora* do CEPEC pelo auxílio precioso nos trabalhos de rotina e pela amizade gratificante.

#### 4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. e LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.

APPIAH, A. A.; FLOOD, J.; ARCHER, S.A. e BRIDGE, P.D. Molecular analysis of the major *Phytophthora* species on cocoa. **Plant Patholog**, v. 53, p. 209–219, 2004.

ARAGAKI, M. e UCHIDA, J.Y. Morphological distinctions between *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* sp. Nov. **Mycologia**, v. 93, n. 1, p. 137–145, 2001.

BRASIER, C.M. Current questions in *Phytophthora* systematics: the role of the population approach. In: Lucas, J.A., Shattock, R.S., Shaw, D.S. e Cooke, L.R. (Ed.) *Phytophthora*. Cambridge, **Cambridge University Press**, p. 104-128, 1991.

CAMPÊLO, A.M.F.L. e LUZ, E.D.M.N. Etiologia da podridão-parda do cacauero nos Estados da Bahia e Espírito Santo, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 13–21, 1981.

CAMPÊLO, A.M.F.L.; LUZ, E.D.M.N. e RESNICK, F. C. Z. Podridão-parda do cacauero nos Estados da Bahia e Espírito Santo, Brasil. I. Virulência das espécies de *Phytophthora*. **Theobroma**, v. 12, p. 1-6, 1982.

CERQUEIRA, A.O.; LUZ, E.D.M.N. e ROCHA, C.S.S. Caracterização morfológica e biométrica de alguns isolados de *Phytophthora* spp. da micoteca do Centro de Pesquisas do Cacau. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 114–119, 1999.

COOKE, D.E.L. e DUNCAN, M.J. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS 1 and ITS 2 sequences of ribosomal RNA gene repeat. **Mycological Research**, v. 101, n. 6, p. 667–677, 1997.

COOKE, D.E.L.; DRENTH, A.; DUNCAN, J.M.; WAGELS, G. e BRASIER, C.M. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related *Oomycetes*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 30, p. 17–32, 2000.

DUCAMP, M.; NYASSÉ, S.; GRIVET, L.; THÉVENIN, J.; BLAHA, G.; DESPRÉAUX, D. e CILAS, C. Genetic diversity of cocoa tree *Phytophthora* pathogens. In: Cilas, C. e Despréaux, D. (eds) **Improvement of cocoa tree resistance to *Phytophthora* diseases**, p. 45 – 75, 2004.

ERWIN, D.C. e RIBEIRO, O.K. (Eds.) **Phytophthora diseases worldwide**. St. Paul. APS Press, 1996.

ERWIN, D. C. Variability within and among species of *Phytophthora*. In: Erwin, D. C., Bartnic-Garcia, S. e Tsao P. H. (Eds.) *Phytophthora*, its biology, taxonomy, ecology and pathology. St. Paul, Minnesota, **American Phytopathological Society**, p. 149-165, 1983.

FALEIRO, F.G.; LUZ, E.D.M.N.; CERQUEIRA, A.O. e ROCHA, C.S.S. Uso de marcadores RAPD na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. Causadores da podridão-parda do cacauero no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 312–315, 2003.

FALEIRO, F.G.; LUZ, E.D.M.N.; CERQUEIRA, A.O.; ROCHA, C.S.S.; NETO, A.D.; FLORES, A.B.; BAHIA, R.C.S. e FALEIRO, A.S.G. Caracterização e diversidade genética de isolados de *Phytophthora* spp. do cacauero com base em marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 303-306, 2004.

FORSTER, H.; OUDEMANS, P. e COFFEY, M.D. Mitochondrial and nuclear DNA diversity within six species of *Phytophthora*. **Experimental Mycology**, v. 14, p. 18-31, 1990.

FORSTER, H.; LEARN, G. e COFFEY, M.D. Towards a better understanding of the evolutionary history of species of the genus *Phytophthora* using isozymes. DNA RFLPs and ribosomal spacer sequences. In: Proceedings of the European Association for Potato Research Conference: *Phytophthora infestans* 150 L.J. Dowley; E. Bannon; L.R. Cooke; T. Keane and E. O'sullivan, (Eds.) **Boole Press**, Dublin, p. 42-54, 1995.

FORSTER, H.; CUMMINGS, M.P. e COFFEY, M.D. Phylogenetic relationships of *Phytophthora* species based on ribosomal ITS I DNA sequence analysis with emphasis on Waterhouse group V and VI. **Mycological Research**, v. 104, n. 9, p. 1055–1061, 2000.

GEISER, D.M.; PITT, J.I. e TAYLOR, J.W. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. **Proceedings National Academy Science USA**, v. 95, p. 388-393, 1998.

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

HAMPL, V.; PAVLICEK, A. e FLEGR, J. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, v. 51, p. 731-735, 2001.

KANNWISCHER , M.E. e MITCHELL, D.J. The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. **Phytopathology**, v. 68, p. 1760–1765, 1978.

KELLAM, M.K. e ZENTMYER, G.A. Morphological, physiological, ecological, and pathological comparisons of *Phytophthora* species isolated from *Theobroma cacao*. **Phytopathology**, v. 76, p. 159-164, 1986.

KROON, L.P.N.M.; BAKKER, F.T.; VAN DEN BOSCH, G.B.M.; BONANTS, P.J.M. e FLIER, W.G. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 766–782, 2004.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B. e NEI, M. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. **Bioinformatics**, v. 17, p. 1244–1245, 2001.

LAWRENCE, J. S.; LUZ, E. D. M. N. e RESNIK, F. C. Z. The relative virulence of *Phytophthora palmivora* and *P. capsici* on cacao in Bahia, Brasil. In Conferencia

Internacional de Investigações em Cacao, 8ª, Cartagena, Colombia, 1981. Actas. Lagos, Nigeria, **Cocoa Producers' Alliance**, p. 395-400, 1982.

LUZ, E.D.M.N. The roles of five species of *Phytophthora* in infection and disease of roots, stems, and pods of *Theobroma cacao* L. (**Ph.D. Thesis**). Gainesville, University of Florida, 1989.

LUZ, E.D.M.N.; BEZERRA, J.L.; RESENDE, M.L.V. de e OLIVEIRA, M.L. de. Cacao (*Theobroma cacao* L.) controle de doenças. In: Ribeiro do Vale, F. X. e Zambolim, L. (eds) **Controle de doenças de plantas-grandes culturas**. Viçosa, UFV, v. 2, p. 617–622, 1997.

LUZ, E.D.M.N. e SILVA, S.D.V.M. Podridão-parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacau. In: Luz, E.D.M.N.; Santos, A.F. dos; Matsuoka, K. e Bezerra, J.L. (eds) **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**, Campinas, Livraria Rural, p. 175–265, 2001.

LUZ, E.D.M.N.; OLIVEIRA, M. L.; MARQUES, J. R. B. e ALMEIDA, O. C. *Phytophthora citrophthora* em seringueira no estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, (supl.), p. S215, 2003.

LUZ, E.D.M.N.; SGRILLO, R. B. e SANTOS FILHO, L. P. Estimativas de danos e perdas causadas por doenças no cacau. **Anais do 1ª workshop de epidemiologia das doenças de plantas**, Viçosa. 2004. 2005. (no prelo).

MARTIN, F.N. e TOOLEY, P.W. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. **Micologia**, v. 95, n. 2, p. 269-284. 2003.

MCHAU, G.R.A. e COFFEY, M.D. An integrated study of morphological and isozyme patterns found within a worldwide collection of *Phytophthora citrophthora* and a redescription of the species. **Mycological Research**, v. 98, p. 1291-1299, 1994.

NEWHOOK, F.J.; WATERHOUSE, G.M. e STAMPS, D.J. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. Kew, Commonwealth Mycological Institute. **Micological Papers**, p.143, 1978.

ORTIZ – GARCIA, C. F. Etude de la diversité génétique de populations de *Phytophthora* pathogènes du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) et du cocotier (*Cocos nucifera* L.). **PhD Thesis**, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 85p. 1996.

OUDEMANS, P. e COFFEY, M.D. Isozyme comparison within and among worldwide sources of three morphologically distinct species of *Phytophthora*. **Mycological Research**, v. 95, p. 19-30, 1991.

RISTAINO, J.B.; MADRITCH, M.; TRUOT, C.L. e PARRA, G. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 948–954, 1998.

SACKEY, S.T.; AKROFI, A.Y.; ASANTE APPIAH, A. e OPOKU, I.Y. *Phytophthora* species differentiation by analysis of randomly amplified polymorphic DNAs. **Proceeding of the 12<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference**. Salvador. p. 107–112, 1999.

STAMPS, D.J.; WATERHOUSE, G.M.; NEWHOOK, F.J. e HALL, G.S. Revised tabular key to the genus *Phytophthora*. Wallingford, CAB International. **Mycological Papers**, p.162, 1990.

THOMPSON J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. e HIGGINS D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876–4882, 1997.

ZHANG, Z.G.; ZHANG, J.Y.; ZHENG, X.B.; YANG, Y.W. e KO, W.H. Molecular distinctions between *Phytophthora capsici* and *Ph. tropicalis* based on ITS sequences of ribosomal DNA. **Phytopathology**, v. 152, p. 358-364, 2004.

WATERHOUSE, G.M. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Kew, Commonwealth Mycological Institute. **Mycological Papers**, v. 92, p. 80, 1963.

WATERHOUSE, G. M.; NEWHOOK, F. J. e STAMPS, D. J. Present criteria for classification of *Phytophthora*. In: Erwin, D. C., Bartnic-Garcia, S. e Tsao P. H. (Eds) *Phytophthora*, its biology, taxonomy, ecology and pathology. St. Paul, Minnesota, **American Phytopathological Society**, p. 139-147, 1983.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S. e TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. e White, T.J. (Eds.) *PCR Protocols : a guide to methods and applications*. **Academic Press**, San Diego, p. 315–322, 1990.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

- 1) *Phytophthora citrophthora* foi identificada como o agente etiológico da queima das folhas e das inflorescências de antúrio na Bahia, sendo este o primeiro relato desta espécie neste hospedeiro e neste Estado;
- 2) *Phytophthora palmivora* é um patógeno potencial de antúrio na Bahia, devido à proximidade com outros cultivos onde este patógeno ocorre e com base nos testes de patogenicidade realizados;
- 3) Isolados das espécies *P. citrophthora* e *P. palmivora* foram nitidamente separadas através da análise de RAPD e também através do sequenciamento dos fragmentos dos três genes (região ITS do rDNA, fator alongação 1- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina e a combinação destes);
- 4) *Phytophthora citrophthora* apresentou maior diversidade genética do que *P. palmivora* através de análise de RAPD e do sequenciamento dos fragmentos dos três genes (região ITS do rDNA, fator alongação 1- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina e a combinação destes);
- 5) Os isolados de *P. citrophthora* de cacaueteiro e de citros foram geneticamente distantes nas análises de RAPD e de sequenciamento e produziram raros clamidósporos que foram abundantes nos isolados de cacaueteiro. Os isolados de *P. citrophthora* de cacaueteiro não causaram lesões em citros;
- 6) Com base nos estudos realizados comprovou-se que os isolados de *P. citrophthora* de cacaueteiro não devem permanecer na mesma espécie que os de citros, sendo, portanto uma nova espécie;

- 7) As análises filogenéticas indicam que os isolados até agora chamados de *P. citrophthora* de cacau e eritrina podem ser híbridos interespecíficos tendo, *P. citrophthora* de citros como um dos prováveis parentais e *P. tropicalis* ou *P. capsici* como o outro;
- 8) Os isolados de *P. palmivora* agruparam-se por hospedeiros na análise de RAPD embora, através de sequenciamento, somente o gene  $\beta$ -tubulina diferenciou os isolados de pupunheira dos demais;
- 9) Os isolados de *P. palmivora* de pupunheira também apresentaram divergências morfológicas com os isolados de cacau e mamoeiro, quanto ao formato e relação comprimento/largura dos esporângios e podem pertencer a uma outra espécie.
- 10) As seqüências de fragmentos dos genes fator alongação 1- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina foram filogeneticamente mais informativas que as da região ITS.

## 6. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. e BLACKWELL, M. Introductory mycology. New York, John Wiley e Sons, **Inc.**, 4<sup>a</sup> ed., 869p., 1996.

ALIZADEH, A. Comparative morphology and reproductive physiology of *Phytophthora capsici* and *P. palmivora* MF4 from black papper and other hosts. **(Ph. D. Thesis)**. University of California, Riverside, 1983.

APPIAH, A. A.; FLOOD, J.; BRIDGE, P.D. e ARCHER, S.A. Inter-and intraspecific morphometric variation and characterization of *Phytophthora* isolates from cocoa. **Plant Pathology**, v. 52, p. 168-180, 2003.

APPIAH, A. A.; FLOOD, J.; ARCHER, S.A. e BRIDGE, P.D. Molecular analysis of the major *Phytophthora* species on cocoa. **Plant Pathology**, v. 53, p. 209-219, 2004.

ASHBY, S. F. Strains and taxonomy of *Phytophthora palmivora* Butler (*P. faberi* Maublanc). **Transactions of the British Mycological Society**, v. 14, p. 18-38. 1929.

BABACAUH, K. D. Structure des populations de *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler emend. Brasier et Griffin, parasite du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) (Population structure of *Phytophthora palmivora* from cacao [*Theobroma cacao*

L.]). **Bulletin de la Societe Botanique de France-Lettres Botaniques**, v. 130, p. 15-25, 1983.

BAKALA, J. Répartition des types morphologiques de *Phytophthora palmivora* (Butler) au Cameroun. In: **VIIth International Cocoa Research Conference**, Douala, Cameroun, p. 297-301, 1981.

BARR, D.J.S. Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist. **Mycologia**, v. 84, p. 1-11. 1992.

BARTNICKI-GARCIA, S. e WANG, M.C. Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*. In: *Phytophthora Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*, (ed.) D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia e P. H. Tsao. **The American Phytopathological Society**. St Paul, Minnesota, p. 121-137, 1983.

BOWERS, J.H.; BAILEY, B. A.; HEBBAR, P.K.; SANOGO, S. e LUMSDEN, R.D. The impact of Plant Diseases on World Chocolate Production. **Plant Health Progress** doi:10.1094/PHP-2001-0709-01-RV. (Online).

BRASIER, C.M. e GRIFFIN, M.J. Taxonomy of *Phytophthora palmivora* on cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 72, p.111–143, 1979.

BRASIER, C.M.; GRIFFIN, M.J. e MADDISON, A. C. The cocoa black pod phytophthoras. Chapter 2. 188p. in: *Epidemiology of Phytophthora on cocoa in Nigéria*. **Commonwealth Mycological Institute Phytopathological Paper**, n. 25, p. 18-30, 1981.

BRASIER, C.M. Problems and prospects in *Phytophthora* research. In: D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P.H. Tsao, (eds.) *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, p. 351-364, 1983.

BRASIER, C.M.; HAMM, P.B. e HANSEN, E.M. Phytophthora disease. Status of *P. gonapodydes*, *P. dreschsleri* and *P. cryptogea*. In: Report on Forest Research, **HMSO**, London, p. 49-50, 1989.

BRASIER, C.M. Current questions in *Phytophthora* systematics: The role of the population approach. In: Lucas, J.A., Shattock, R.S., Shaw, D.S. e Cooke, L.R. (ed.) *Phytophthora*. Cambridge, **Cambridge University Press**, p. 104-128, 1991.

BRASIER, C.M. Evolutionary biology of *Phytophthora*. Part I: Genetic system, sexuality and the generation of variation. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 153–171, 1992.

BRASIER, C.M. e HANSEN, E.M. Evolutionary biology of *Phytophthora*. Part II: Phylogeny, speciation, and population structure, **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 173–200, 1992.

BUTLER, E. J. An account of the genus *Pythium* and some *Chytridiaceae*. Mem. Dep. Agric. Índia, **Bot. Ser.**, v. 1, p. 82 – 84, 1907.

CAMPÊLO, A.M.F.L. e LUZ, E.D.M.N. Etiologia da podridão-parda do cacauero nos Estados da Bahia e Espírito Santo, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 13 – 21, 1981.

CAMPÊLO, A. M. F. L.; LUZ, E. D. M. N. e RESNICK, F. C. Z. Podridão-parda do cacauero nos Estados da Bahia e Espírito Santo, Brasil. I. Virulência das espécies de *Phytophthora*. **Theobroma**, v. 12, p. 1-6, 1982.

CAVALIER-SMITH, T. The kingdom chromista: Origin and systematics. In: Progress in Phytopathological Research, Round e D. J. Chapman. (Eds.) **Biopress**, Bristol, England, v. 41, p. 309-347, 1986.

CAVALIER-SMITH, T. The kingdom chromista. In: The chromophyte algae: problems and perspectives. J.C. Green, B. S.C. Leadbeater e W.I. Drives. (Eds.)

**Systematically Associated Species**, Claredon Press, Oxford, v. 38, p. 381-407, 1989.

CHEE, K. H. Host of *Phytophthora palmivora*. In: *Phytophthora Disease of cocoa* (ed.), Gregory, P. H., **Longman**:London, p. 81-87, 1973.

CHOWDAPPA, P. e CHANDRA MOHANAN, R. Occurrence of *Phytophthora citrophthora* on cocoa in Índia. **Tropical Agriculture**, v. 73, n. 2, p. 158-160, 1996.

COLEMAN, L. C. Diseases of the *areca palm*. I. Koleroga or root disease. **Ann. Mycol.**, v. 8, p. 591 – 626, 1910.

COOKE, D.E.L.; DRENTH, A.; DUNCAN, J.M.; WAGELS, G. e BRASIER, C.M. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related *Oomycetes*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 30, p. 17-32, 2000.

De BARY, A. Researches into the nature of the potato fungus, *Phytophthora infestans*. **J. R. Agric. Soc. Engl.**, v. 12, p. 239-269, 1876.

DEACON, J.W. Modern mycology. Edinburgh, **Blackwell Science**. 303p., 1997.

DESJARDINS, P. R.; ZENTMYER, G. A. e REYNOLDS, D. A. Electron microscopic observations of the flagellar hairs of *Phytophthora palmivora* zoospores. **Canadian Journal of Botany**, v. 47, p. 1077-1079, 1969.

DICK, M.W. Sexual reproduction in the *Peronosporomycetes* (chromistan fungi). **Canadian Journal of Botany**, v. 73, supl. 1, p. 5712-5724, 1995a.

DICK, M.W. The Straminipilous Fungi: A new classification for the Biflagellate fungi and their uniflagellate relatives with particular reference to *Lagenidaceous* fungi C.A.B. Interact. **Mycology Papers**, n. 168, 1995b.

DUCAMP, M.; HÉRAIL, C.; BLAHA, G. e NYASSÉ, S. Evolution de la diversité génétique des diferentes espes de *Phytophthora* pathogènes du cacaoyer. 13rd International cocoa research conference, Kota Kinabalu, Malaysia, 9-14 October 2000. Lagos, Nigeria, **Cocoa Producers' Alliance**, v. 1, p. 519-528, 2002.

DUCAMP, M.; NYASSÉ, S.; GRIVET, L.; THÉVENIN, J.; BLAHA, G.; DESPRÉAUX, D. e CILAS, C. Genetic diversity of cocoa tree *Phytophthora* pathogens. In: Cilas, C. e Despréaux, D. (eds) **Improvement of cocoa tree resistance to *Phytophthora* diseases**, p. 45 – 75, 2004.

ELLIOTT, C. G. Physiology of sexual reproduction in *Phytophthora*. *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P. H. Tsao, (eds.) **American Phytopathological Society**, St. Paul, Minn., p. 71-80, 1983.

ERSELIUS, L.J. e SHAW, D.S. Protein and enzyme differences between *Phytophthora palmivora* and *P. megakarya*: evidence for self-fertilization in pairing of the two species. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 78, p. 227-238, 1982.

ERSELIUS, L.J. e DE VALLAVIEILLE, C. Variation in protein profiles of *Phytophthora*: Comparison of six species. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 83, p. 463-472, 1984.

ERWIN, D. C. e RIBEIRO, O. K. (eds) ***Phytophthora* diseases worldwide**. St. Paul, APS Press. 562p., 1996.

FALEIRO, F.G.; LUZ, E.D.M.N.; CERQUEIRA, A.O. e ROCHA, C.S.S. Uso de marcadores RAPD na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. Causadores da podridão-parda do cacauero no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 312 – 315, 2003.

FALEIRO, F.G.; LUZ, E.D.M.N.; CERQUEIRA, A.O.; ROCHA, C.S.S.; NETO, A.D.; FLORES, A.B.; BAHIA, R.C.S. e FALEIRO, A.S.G. Caracterização e diversidade genética de isolados de *Phytophthora* spp. do cacauero com base em marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 303-306, 2004.

FAWCETT, H. S. Gummosis of Citrus. **Journal of Agricultural Research**, v. 24, p. 191-236, 1923.

FORSTER, H.; OUDEMANS, P. e COFFEY, M. D. Mitochondrial and nuclear DNA diversity within six species of *Phytophthora*. **Experimental Mycology**, v. 14, p. 18-31, 1990.

FORSTER, H.; LEARN, G. e COFFEY, M.D. Towards a better understanding of the evolutionary history of species of the genus *Phytophthora* using isozymes. DNA RFLPs and ribosomal spacer sequences. In: *Phytophthora infestans* 150. L.J. Dowley, E. Bannon, L.R. Cooke, T. Keane and E. O'Sullivan, (eds.) **Boole Press**, Dublin, Ireland, p. 42-52, 1995.

GALLEGLY, M. E. New criteria for classifying *Phytophthora* and critique of existing approaches. in: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. D. C. Erwis, S. Bartnicki-Garcia, and P. H. Tsao, (eds.) **American Phytopathological Society**, St. Paul, Minn, p. 167-172, 1983a.

GALLEGLY, M. E. Summary of the open discussion session on taxonomy of *Phytophthora*. in: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. D. C. Erwis, S. Bartnicki-Garcia, and P. H. Tsao, (eds.) **American Phytopathological Society**, St. Paul, Minn, p. 173-174, 1983b.

GOODWIN, P.H.; KIRKPATRICK, B.C. e DUNIWAY, J.M. Cloned DNA probes for identification of *Phytophthora parasitica*. **Phytopathology**, v. 79, p. 716-721, 1989.

GRIFFIN, M. J. Cocoa *Phytophthora* workshop, Rothamsted Experimental Station, England. **PANS**, v. 23, p. 107-110, 1977.

HARA, K. *Kawakamia carica*. **J. Hortic. Soc. Jpn.**, v. 30, n. 4, p. 20 – 22, 1918.

HENDRIX, F.F. Jr. e CAMPBELL, W.A. *Phytophthora* and *Pythium* species from old growth forest sites in Kentucky, North Carolina and Tennessee (abstract) **Phytopathology**, v. 60, 1295p., 1970.

HO, H.H. e LU, J.Y. A synopsis of the occurrence and pathogenicity of *Phytophthora* species in mainland China. **Mycopathologia**, v. 138, p. 143-161, 1997.

HORI, S. *Phytophthora fici*. **J. Plant Prot.** Tokio, v. 2, n. 11, p. 930 – 932, 1915.

IDOSU, G. O. e ZENTMYER, G. A. *Phytophthora palmivora*: A comparative study of “typical” and “atypical” isolates from cacao (*Theobroma cacao* L.). **Mycologia**, v. 70, p. 1101-1112, 1978.

JONES, C. J.; EDWARDS, K. J.; CASTAGLIONE, S.; WINFIELD, M. O.; SALA, F.; VAN DEWIEL, C.; BREDEMEIJER, G.; VOSMAN, B.; MATTHES, M.; DALY, A.; BRETTSCHEIDER, R.; BETTINI, P.; BUIATTI, M.; MAESTRI, E.; MALCEVSCHI, A.; MARMIROLI, N.; AERT, R.; VOLCKAERT, G.; RUEDA, J.; LINACERO, R.; VAZQUEZ, A. e KARP, A. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. **Molecular Breeding**, v. 3, p. 381-390, 1997.

KAOSIRI, T.; ZENTMYER, G. A. e ERWIN, D. C. Stalk length as a taxonomic criterion for *Phytophthora palmivora* isolates from cacao. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, p. 1730-1738, 1978.

KAOSIRI, T. e ZENTMYER, G.A. Protein, esterase, and peroxidase patterns in the *Phytophthora palmivora* complex from cacao. **Mycologia**, v. 72, p. 988–1000, 1980.

KELLAM, M.K. e ZENTMYER, G.A. Isolation of *Phytophthora citrophthora* from cocoa in Brazil. **Phytopathology**, v. 71, p. 230, 1981.

KELLAM, M.K. e ZENTMYER, G.A. Morphological, physiological, ecological, and pathological comparisons of *Phytophthora* species isolated from *Theobroma cacao*. **Phytopathology**, v. 76, p. 159-164, 1986.

KLOTZ, L. J. e CALAVAN, E. C. Review of gum diseases of citrus in California. **Calif. Div. Agric. Sci. Univ. Calif. Agric. Scie. Leafl.**, v. 2593, 27p., 1978.

KROON, L.P.N.M., BAKKER, F.T., VAN DEN BOSCH, G.B.M., BONANTS, P.J.M. e FLIER, W.G. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 766-782, 2004.

LARGE, E. C. The advance of the Fugi. **Jonathan Cape**, London, 488p., 1940.

LAWRENCE, J. S.; LUZ, E. D. M. N. e RESNIK, F. C. Z. The relative virulence of *Phytophthora palmivora* and *P. capsici* on cacao in Bahia, Brasil. In Conferencia Internacional de Investigacions en Cacao, 8ª, Catagena, Colombia, 1981. Actas. Lagos, Nigeria, **Cocoa Producers' Alliance**, p. 395-400, 1982.

LEE, S.B. e TAYLOR, J.W. Phylogeny of five Fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 639-653, 1992.

LOZANO-TREVINO, Z.E. e ROMERO-COVA, S. Estúdio taxonômico de aislamientos de *Phytophthora* patógenos de caçõo. **Agrociencia**, v. 56, p. 175-182, 1984.

LUZ, E.D.M.N. The roles of five species of *Phytophthora* in infection and disease of roots, stems, and pods of *Theobroma cacao* L. **(Ph.D. Thesis)**. Gainesville, University of Florida, 1989.

LUZ, E. D. M. N. e MITCHELL, D. J. Influence of soil flooding on cacao root infection by *Phytophthora* spp. Ilhés, BA. **Agrotrópica**, v. 6, n. 2, p. 53-60, 1994.

LUZ, E.D.M.N. e MATSUOKA, K. Taxionomia e sistemática do gênero *Phytophthora*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 297-328, 1996.

LUZ, E.D.M.N.; BEZERRA, J.L.; RESENDE, M.L.V. de e OLIVEIRA, M.L. de. Cacao (*Theobroma cacao* L.) controle de doenças. In: Ribeiro do Vale, F. X. e Zambolim, L. (eds) **Controle de doenças de plantas-grandes culturas**. Viçosa, UFV, v. 2, p. 617 – 622, 1997.

LUZ, E.D.M.N. e SILVA, S.D.V.M. Podridão-parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacaueiro. In: Luz, E.D.M.N.; Santos, A.F. dos; Matsuoka, K. e Bezerra, J.L. (eds) **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**, Campinas, Livraria Rural, p. 175 – 265, 2001.

LUZ, E. D. M. N. e MATSUOKA, K. *Phytophthora*: Fungo Protista ou Chromista?, In: Luz, E.D.M.N.; Santos, A.F. dos; Matsuoka, K. e Bezerra, J.L. (eds) **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**, Campinas, Livraria Rural, p. 1–22, 2001.

LUZ, E.D.M.N.; OLIVEIRA, M. L.; MARQUES, J. R. B. e ALMEIDA, O. C. *Phytophthora citrophthora* em seringueira no estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, supl., p. S215, 2003.

LIYANAGE, N.I.S. e WHEELER, B.E.J. *Phytophthora katsurae* from cocoa. **Plant Pathology**, v. 38, p. 627-629, 1989.

MARGULIS, L. Introduction. In: Handbook of protoctista. (Eds.) L. Margulis; J.O. Corliss; M. Melkoniam e D.J. Chapman. **Jones e Barlett**, Boston, p. 11-23, 1990.

MARTIN, F.N. e TOOLEY, P.W. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. **Micologia**, v. 95, n. 2, p. 269-284, 2003.

MARTIN, F.N. e TOOLEY, P.W. Identification of *Phytophthora* isolates to species level using restriction fragment length polymorphism analysis of a polymerase chain reaction-amplified region of mitochondrial DNA. **Phytopathology**, v. 94, n. 9, p. 983-991, 2004.

MAUBLANC, A. Les maladies des plantes cultivees dans les pays chauds. Maladies du cacaoyer (Diseases of plants in warm countries. Diseases of cocoa). **L'Agric. Prat. Pays Chauds**, v. 9, p. 314 – 324, 1909.

MCHAU, G.R.A. e COFFEY, M.D. An integrated study of morphological and isozyme patterns found within a worldwide collection of *Phytophthora citrophthora* and a redescription of the species. **Mycological Research**, v. 98, p. 1291-1299, 1994a.

MCHAU, G.R.A. e COFFEY, M.D. Isozyme diversity in *Phytophthora palmivora*: Evidence for a southeast Asian center of origin. **Mycological Research**, v. 98, p. 1035-1043, 1994b.

MULLER, A. S. Brazil: Novos relatos de doenças de plantas no estado de Minas Gerais (Brazil: Some new records of plant diseases in the state of Minas Gerais). **Int. Bull. Plant. Prot.**, v. 10, p. 98 – 99, 1936.

NEWHOOK, F.J.; WATERHOUSE, G.M. e STAMPS, D.J. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. Kew, Commonwealth Mycological Institute. **Micological Papers**, n.143, 1978.

PITTA, G. P. B.; de SOUZA, T. M. W. e FEICHTENBERGER, E. Podridão negra em inflorescência e folha de *Anthurium andraenum* causada por *Phytophthora citrophthora*. **Summa Phytopathologica**, v. 17, p. 159–163, 1991.

ORELLANA, R. G. Variation in *Phytophthora palmivora* isolated from cacao and rubber. **Phytopathology**, v. 49, p. 210 – 213, 1959.

ORTIZ-GARCIA, C. F. Etude de la diversité génétique de populations de *Phytophthora* pathogènes du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) et du cocotier (*Cocos nucifera* L.). **PhD thesis**, université Paul Sabatier, Toulouse, France, 86p., 1996.

OUDEMANS, P. e COFFEY, M.D. Isozyme comparison within and among worldwide sources of three morphologically distinct species of *Phytophthora*. **Mycological Research**, v. 95, p. 19 – 30, 1991a.

OUDEMANS, P. e COFFEY, M.D. A revised systematics of twelve papillate *Phytophthora* species based on isozyme analysis. **Mycological Research**, v. 95, n. 9, p. 1025–1046, 1991b.

OUDEMANS, P. e COFFEY, M. D. Relationships between *Phytophthora* species: Evidence from isozyme analysis. In: *Phytophthora*. J. A. Lucas, R. C. Shattock, D. S. Shaw, and L. R. Cooke, (eds.) **United Kingdom, Cambridge University Press**, p. 184-203, 1991c.

OUDEMANS, P.; FORSTER, H. e COFFEY, M. D. Evidence for distinct isozyme subgroups within *Phytophthora citricola* and close relationships with *P. capsici* and *P. citrophthora*. **Mycological Research**, v. 98, p. 189-199, 1994.

REYES, L. C. de; REYES, E. H. de e ESCOBAR, F. Etiology of a new pod disease in Venezuela. In: **IV International Cocoa Research Conference**, Trinidad, p. 485-486, 1972.

RIZZO, D.M.; GARBELOTTO, M.; DAVIDSON, J.M.; SLAUGHTER, G.W. e KOIKE, S.T. *Phytophthora ramorum* as the Cause of Extensive Mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. **Plant Disease**, v. 86, n. 3, p. 205-214, 2002.

RORER, J. B. Pod-rot, canker and chupon wilt of cacao caused by *Phytophthora* sp. Trinidad and Tobago **Departament Agriculture Bulletin**, v. 9, p. 38, 1910.

SACKEY, S.T.; AKROFI, A.Y.; ASANTE APPIAH, A. e OPOKU, I.Y. *Phytophthora* species differentiation by analysis of randomly amplified polymorphic DNAs. In: **12<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference**, Salvador, Brazil, 17-23 November 1996, p. 107-112, 1999.

SANSOME, E.; BRASIER, C. M. e GRIFFIN, M. J. Chromosome size differences in *Phytophthora palmivora*, a pathogen of cocoa. **Nature (London)**, v. 255, p. 704-705, 1975.

SANTOS, A. F.; LUZ, E. D. M. N. e dos SANTOS, J. T. *Phytophthora bohemeriae* causando a gomose da acácia-negra no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29 supl., p. S144, 2004.

SAREJANNI, J. A. La pourriture du Collet des Solanées cultivees et la classification du genre *Phytophthora*. **Annales Phytopathol.**, Benaki, Greece, v. 2, p. 35 – 52, 1936.

SILVEIRA, A. P.; CARDOSO, R.M.G.; FEICHTEMBERGER, E. e OLIVEIRA, D.A. Patogenicidade de *Phytophthora* spp. em seringueira (*Hevea* sp.). **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, resumo, p. 316, 1986.

SMITH, R. E. e SMITH, E. H. A new fungus of economic importance. **Bot. Gaz.**, v. 42, p. 215-221, 1906.

STAMPS, D.J. *Phytophthora palmivora*. **Commonwealth Mycological Institute Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**, n. 831, 2p., 1985.

STAMPS, D.J.; WATERHOUSE, G.M.; NEWHOOK, F.J. e HALL, G.S. Revised tabular key to the genus *Phytophthora*. Wallingford, CAB International. **Mycological Papers**, n. 162, 1990.

TORREND, C. Lês maladies du cacaoyer de L'Etat de Bahia. **Brotéria Série Botânica**, Portugal, v. 15, p. 107-127, 1917.

TSAO, P. H. e ALIZADEH, A. Recent advances in the taxonomy and nomenclature of the so-called '*Phytophthora palmivora*' MF4 occurring on cocoa and other tropical crops. Proceedings, **10<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference**, Santo Domingo, Dominican Republic, p. 441-445, 1988.

TSAO, P. H. The identities, nomenclature and taxonomy of *Phytophthora* isolates from black pepper. in: Diseases of Black Pepper,. Y. R. Sarma and T. Premkumor (eds.) **Proc. Int. Pepper Comm.** Workshop on Black Pepper Diseases, Goa, India, p. 185-211, 1991.

TU Y. N.; LI, J. L. e YANG, X. F. Studies on *Phytophthora* species from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) in china. **Acta Mycological Sin.**, v. 5, p. 193-207, 1986.

TURNER, P.D. Pod rot of cacao in Malasya caused by *Phytophthora heveae*. **FAO Plant Protection Bulletin**, v. 16, p. 33-34, 1968.

TUCKER, C. M. Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. **Mo. Agric. Exp. Sta. Res. Bull.**, n. 153, 208p., 1931.

ZENTMYER, G.A.; KOASIRE, T. e IDOSU, G.O. Taxonomic variants in the *Phytophthora palmivora* complex. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 69, p. 329-332, 1977.

ZENTMYER, G.A.; KOASIRE, T.; IDOSU, G.O. e KELLAM, M.K. Morphological forms of *Phytophthora palmivora*. In: **VII, International Cocoa Research Conference**, Duala, Cameroon, p. 291-295, 1981.

ZENTMYER, G.A. Origin and distribution of four species of *Phytophthora*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 91, p. 367-378, 1988.

WANG e BARTNICKI-GARCIA, S. Novel phosphoglucans from the cytoplasm of *Phytophthora palmivora* and their selective occurrence in certain life cycle stages. **Journal of Molecular Chemistry**, v. 248, p. 4112-4118, 1973.

WATERHOUSE, G.M. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Kew, Commonwealth Mycological Institute. **Mycological Papers**, v. 92, 80p., 1963.

WATERHOUSE, G.M. The genus *Phytophthora* de Bary. **Mycological Papers**, v. 122, p. 1-59, 1970a.

WATERHOUSE, G.M. Taxonomy in *Phytophthora*. **Phytopathology**, v. 60, p. 1141-1143, 1970b.

WATERHOUSE, G.M. *Phytophthora palmivora* and some related species. in: *Phytophthora* Disease of Cocoa. P. H. Gregory, (ed.) **Longman**, London, p. 51-70, 1974a.

WATERHOUSE, G.M. Other *Phytophthora* species recorded on cacao. In: *Phytophthora* Disease of Cocoa. P. H. Gregory, (ed.) **Longman**, London, p. 71-79, 1974b.

WATERHOUSE, G.M.; NEWHOOK, F. J. e STAMPS, D. J. Present criteria for classification of *Phytophthora*. In: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P. H. Tsao, (eds.) **American Phytopathological Society**, St. Paul, Minn. p. 139-147, 1983.

WILLS, R.T. The ecological impact of *Phytophthora cinnamomi* in the Stirling Range National Park, Western Australia. **Australian Journal Ecology**, v. 18, p. 145-189, 1993.

WERRES, S.; MARWITZ, R.; MAN IN'T VELD, W.A.; DE COOK, A.W.A.M.; BONANTS, P.J.M.; DE WEERDT, M.; THEMANN, K.; ILIEVA, E. e BAAYEN, R.P. *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. **Mycological Research**, v. 105, p. 1155-1165, 2001.