



**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR  
E PATOGÊNICA DE ESPÉCIES DE *PHYTOPHTHORA*  
ASSOCIADAS AOS CITROS**

**JANINE MENDES DE OLIVEIRA**

**2008**

**JANINE MENDES DE OLIVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E  
PATOGENICA DE ESPÉCIES DE *PHYTOPHTHORA* ASSOCIADAS  
AOS CITROS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. PhD. Ludwig Heinrich Pfenning

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Oliveira, Janine Mendes de.

Caracterização morfológica, molecular e patogênica de espécies de  
*Phytophthora* associadas aos citros / Janine Mendes de Oliveira -- Lavras :  
UFLA, 2008.

50 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Ludwig H. Pfenning

Bibliografia.

1.*Phytophthora nicotianae*. 2.*Phytophthora citrophthora*. 3.  
Peronosporales 4. Oomycota. 5. análise filogenética, 6. gomose  
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.334

**JANINE MENDES DE OLIVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E  
PATOGENICA DE ESPÉCIES DE *PHYTOPHTHORA* ASSOCIADAS  
AOS CITROS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 20 de junho de 2008

Prof. Dr. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti	UFV
Profa. Dra. Antônia dos Reis Figueira	UFLA
Dr. Cristiano Souza Lima	UFLA

Prof. PhD. Ludwig Heinrich Pfenning  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu marido, Márlon e aos meus pais, Paulo e Zilda,  
que são tudo em minha vida, a minha força e coragem para que eu conseguisse  
chegar ao final mais uma etapa,

## **DEDICO**

Aos meus amigos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Sarah e  
Juliano, pela linda amizade, carinho e apoio

## **OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), por meio do Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do mestrado.

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

Ao professor PhD Ludwig H. Pfenning, pela admirável paciência, carinho, respeito, orientação, confiança, apoio e amizade.

Ao Cristiano, pela paciência e valiosas sugestões e auxílio na conclusão deste trabalho.

Aos professores Dr. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende e Prof. Dr. Cristiano Souza Lima, pelas valiosas sugestões.

À Profa. Dra. Antônia dos Reis Figueira, pelo acolhimento em seu laboratório para realizar parte do trabalho e a Valquíria, pelo apoio e amizade.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia.

Ao Edson Luis Rezende, laboratorista, pela experiência e paciência, e que muito contribuiu para a realização deste estudo.

Aos meus amigos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, pelo companheirismo e boa convivência, principalmente à Sarah Costa e Juliano dos Santos, que tanto me ajudaram na realização deste trabalho,

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	01
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	02
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	04
2.1 Importância da gomose dos citros.....	04
2.2 Sintomatologia.....	05
2.3 Etiologia.....	05
2.4 Ciclo da doença.....	06
2.5 <i>Phytophthora</i> e sua posição taxonômica .....	07
2.6 Caracterização molecular.....	08
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
CAPÍTULO 2 Caracterização morfológica, molecular e patogênica de espécies de <i>Phytophthora</i> associadas aos citros.....	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	17
INTRODUÇÃO.....	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
Isolados.....	21
Caracterização morfológica.....	22
Testes de patogenicidade.....	23
Patogenicidade em frutos e plantas.....	23
Caracterização molecular.....	24
Extração de DNA.....	24

Amplificação e seqüenciamento do DNA.....	25
Análise filogenética.....	26
Análise <i>in silico</i> dos <i>primers</i> específicos.....	27
RESULTADOS.....	28
Caracterização morfológica.....	28
Testes de patogenicidade.....	29
Patogenicidade em frutos e plantas.....	29
Filogenia dos isolados de <i>Phytophthora</i> associados a gomose dos citros.....	30
DISCUSSÃO.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

## RESUMO

OLIVEIRA, Janine Mendes de. **Caracterização morfológica, molecular e patogênica de espécies de *Phytophthora* associadas aos citros.** 2008. 50 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A gomose-de-*Phytophthora* é uma das doenças mais preocupantes da cultura dos citros no Brasil e em outros países produtores. Esta doença é causada por espécies do gênero *Phytophthora*, sendo as principais *P. nicotianae*, de maior predominância e distribuição, e *P. citrophthora*, com menor frequência nas regiões tropicais. Como primeiro passo visando o estabelecimento de um método de diagnose da doença por PCR, foi estudada a variabilidade de uma população de *P. nicotianae* dos citros e de outros hospedeiros no Brasil por meio de caracteres morfológicos, filogenia e patogenicidade. Foram identificados como *P. nicotianae* os isolados de citros, fumo, acácia-negra e *Kalanchoe*, que apresentaram os seguintes caracteres: esporângios predominantemente esféricos e ovóides, terminais e intercalados, persistentes e papilados, os clamidósporos foram abundantes e o oogônio apresentou anterídio anfígeno. Os isolados de citros identificados como *P. citrophthora* apresentaram esporângios ovóides e de formas variáveis, papilados, frequentemente bipapilados e persistentes, clamidósporos e oogônios ausentes. Todos os isolados de *P. nicotianae* provenientes de diferentes hospedeiros foram patogênicos a plantas de citros e fumo, assim como aos frutos de laranja. A espécie *P. citrophthora* foi patogênica apenas a mudas de citros e nos frutos de laranja. *Phytophthora capsici* não foi patogênico aos citros e fumo. Na análise filogenética, todos os isolados de *P. nicotianae* dos citros formaram um clado juntamente com os isolados de *P. nicotianae* do GenBank, com suporte de 100% na análise de *bootstrap*. Estes resultados evidenciaram a inespecificidade da espécie em relação ao hospedeiro e uma baixa variação intra-específica entre os isolados dos citros. Estas informações podem servir como base na elaboração de métodos de PCR para a detecção e identificação rápida destes patógenos em citros no país.

---

Comitê de Orientação: Ludwig H. Pfenning, Cristiano S. Lima DFP-UFLA.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Janine Mendes de. **Morphological, molecular and pathogenic characterization of *Phytophthora* species associated with citrus root rot.** 2008. 50 p. Dissertation (Master Program in Agronomy/Plant Pathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

*Phytophthora* root rot is one of the most important diseases of citrus in Brazil and other countries. The causal agents are species of *Phytophthora*, being the most important *P. nicotianae*, the prevalent and widely distributed species, and *P. citrophthora*, less frequent in tropical regions. As the first step to develop a PCR based detection method of the disease, the variability of a population of *P. nicotianae* from citrus and other host was evaluated by morphological characters, phylogeny and pathogenicity tests. Isolates of *P. nicotianae* were identified from citrus, tobacco, black acacia and *Kalanchoe*, showing characteristics such as predominantly spherical to, terminal or intercalary, persistent and papillate, with numerous chlamydospores, and amphigynous antheridia. Isolates from citrus, identified as *P. citrophthora* showed oval or variable, papillate sporangia, frequently bipapillate and persistent, without chlamydospores and oogonium. All isolates of *P. nicotianae* were pathogenic to citrus and tobacco seedlings, as well as to citrus fruits. *P. citrophthora* was pathogenic only to seedling and fruits of citrus. *Phytophthora capsici* did not show pathogenicity to citrus nor tobacco. In the phylogenetic analysis all isolates of *P. nicotianae* grouped together in a unique clade, together with sequences recovered from Genbank, with 100% bootstrap support. These results indicate low infra-specific variability in this species and lack of specificity towards host plants. This information will be useful to develop a rapid PCR detection method for these citrus pathogens.

---

Guidance Committee: Ludwig H. Pfenning, Cristiano S. Lima DFP-UFLA

## **CAPÍTULO 1**

### **ESPÉCIES DE *PHYTOPHTHORA* EM CITROS**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A gomose-de-*Phytophthora* nos citros é uma das doenças que afetam as plantas cítricas no Brasil e um dos principais problemas na fase de implantação de pomares. Ela afeta mudas e extensas áreas de pomares e pode causar a morte da planta e provocar danos de 10% a 30% na produção mundial (Feichtenberger, 2001; Fundecitrus, 2008).

Essa doença está relacionada, principalmente, a duas espécies de *Phytophthora*: *P. citrophthora* e *P. nicotianae*. Esta última espécie é o principal agente etiológico nas regiões de cultivo dos citros e causa doenças em todos os órgãos da planta (Feichtenberger, 2001). A diagnose rápida e precisa é indispensável para a adoção de medidas de controle antes que ela cause grandes perdas à produção dos citros.

Os métodos convencionais de isolamento com o cultivo em meio de cultura e identificação pela morfologia são relativamente demorados, o que prejudica a adoção de medidas de controle antes de afetar a produção. Por outro lado, a técnica de detecção de fitopatógenos por PCR (*reação em cadeia da polimerase*) vem sendo utilizada para a diagnose rápida e precisa de doenças de plantas. Entretanto, para o desenvolvimento de *primers* que amplificam seqüências de *P. nicotianae* dos isolados do Brasil, é necessário, primeiramente, conhecer a variabilidade populacional desse patógeno. Além disso, mesmo sabendo que o principal agente etiológico da gomose-de-*Phytophthora* dos citros é *P. nicotianae*, ainda predomina a discussão entre os fitopatologistas sobre a correta nomenclatura dessa espécie, sendo *P. parasitica* ainda muito utilizado (Erwin & Ribeiro, 1996; Ippolito et al., 2002).

Vários métodos têm sido empregados para a detecção e a identificação de *Phytophthora*. A utilização de marcadores genéticos e o seqüenciamento da região ITS do DNA ribossômico, dos genes que codificam fator de alongação 1-

$\alpha$  (*tef1*) e  $\beta$ -tubulina (Cooke et al., 2000; Kroon et al., 2004), são importantes ferramentas na identificação de espécies de *Phytophthora* spp., assim como em estudos de filogenia (Brasier et al., 1999; Kroon et al., 2004).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar isolados de *P. nicotianae* obtidos de citros no Brasil, por meio da morfologia e da análise das regiões ITS do rDNA. Adicionalmente, foram realizados testes de patogenicidade com isolados selecionados em plantas de citros e fumo e frutos de laranja. Este estudo servirá de base para o desenvolvimento e a validação de um método de diagnose por PCR de espécies de *Phytophthora* dos citros no Brasil.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Importância da gomose dos citros

Os citros são plantas do gênero *Citrus* e de outros gêneros afins, como *Fortunella* e *Poncirus*, ou híbridos da família Rutaceae (Abecitrus, 2006; Instituto Agronômico de Campinas – IAC, 2005). A produção mundial de citros é de, aproximadamente, 102 milhões de toneladas por ano e os maiores produtores de laranjas são o Brasil e os Estados Unidos, que respondem por cerca de 45% do total mundial.

No Brasil, a produção de citros ocorre, principalmente, no estado de São Paulo, onde se concentra cerca de 85% da produção nacional de laranjas. Na safra de 2006/07, a exportação de laranja *in natura* foi de 52.700 toneladas e a exportação do suco de laranja concentrado, no ano de 2007, foi de 1.390.969 toneladas para os países da União Européia, da Ásia e do MERCOSUL, entre outros (Mattos Junior et al., 2005; Abecitrus, 2008; IAC, 2005), o que ressalta a importância do Brasil como exportador.

Em razão da importância dos citros no agronegócio brasileiro e mundial, torna-se necessária a tomada de medidas preventivas e curativas das doenças em citros. Uma das doenças que afetam as plantas cítricas no país, principalmente na fase de implantação dos pomares, é a gomose-de-*Phytophthora*. Mudanças e extensas áreas de pomares podem ser afetadas e podem ocorrer morte da planta e redução de 10% a 30% na produção mundial, com prejuízos de milhões de dólares por ano (Feichtenberger, 2001; Fundecitrus, 2008).

A doença cresceu em importância no Brasil, na década de 1940, após o aparecimento da tristeza-dos-citros, que inviabilizou o uso de porta-enxerto de laranja-azedada (*Citrus aurantium*), tido como moderadamente resistente a *Phytophthora*. Atualmente, o limão-cravo (*Citrus limonia*), principal porta-

enxerto da citricultura brasileira, é suscetível a *Phytophthora* spp., causadora de gomose (Feichtenberger, 2001).

## **2.2 Sintomatologia**

O sintoma característico da doença é a exsudação de goma em lesões de tronco e colo, em porta-enxertos suscetíveis de plantas adultas. No início, manifesta-se na parte externa do colo da planta, no lenho do tronco, nas raízes e em ramos mais altos, sob a forma de pequenas gotas de goma de cor marrom. Os tecidos internos ficam necrosados, com tonalidade pardacenta a marrom (Ledo et al., 1996). A exsudação também pode ocorrer na região do tronco acima do ponto de enxertia, quando a copa é de variedade suscetível (Fundecitrus, 2008). Em viveiros, este patógeno afeta as mudas na região das raízes e radículas, no colo e causa podridões de cor escura, que aumentam de tamanho e provocam a morte das mudas. Nas plantas adultas, ocorrem exsudação de goma, escurecimento dos tecidos localizados abaixo da casca, além de sintomas na parte aérea, como clorose intensa das folhas correspondentes ao lado do tronco ou das raízes onde ocorrem as lesões. Os frutos mais próximos ao solo podem apresentar podridão seca de cor marrom-parda e também ficam pequenos, de casca fina e maturação precoce. Também há seca e morte progressiva de ramos ponteiros ("die-back") (Feichtenberger, 2001; Embrapa, 2006; Fundecitrus, 2008).

## **2.3 Etiologia**

Várias espécies de *Phytophthora* já foram descritas como capazes de incitar doenças em plantas cítricas, como *P. boehmeriae* (Lebert & Cohn) Schröter, *P. capsici* Leonian, *P. cinnamomi* Rands, *P. citricola* Saw, *P.*

*citrophthora* (Sm. & Sm.) Leonian, *P. drechsleri* Tucker, *P. hibernalis* Carne, *P. megasperma* Drechsler, *P. palmivora* (Butler) Butler, *P. nicotianae* B. De Haan e *P. syringae* (Kleb.) Klen. No entanto, as espécies de maior importância são *P. nicotianae* e *P. citrophthora*.

*Phytophthora nicotianae* predomina nas regiões tropicais e subtropicais, como no Brasil, e incita a doença em todos os órgãos da planta, principalmente nas raízes, radículas, colo e tronco. *P. citrophthora* encontra-se disseminada nas regiões temperadas, mas pode ocorrer também no Brasil, com menor frequência. Esta espécie também pode afetar vários órgãos do hospedeiro (Feichtenberger, 2001).

#### **2.4 Ciclo da doença**

Os fatores responsáveis pela ocorrência da doença são temperaturas altas, período de chuva prolongado, umidade elevada, ferimento no sistema radicular e no colo da planta e o plantio inadequado das mudas (Santos Filho, 1991; Graham et al., 1998). No período chuvoso, quando ocorre alta umidade por períodos prolongados, os clamidósporos e os esporângios dormentes germinam para formar esporângios que produzem zoósporos em abundância. Estes são liberados e, após o contato com o hospedeiro, se diferenciam e formam cistos que germinam e originam hifas que infectam raízes e caule, como também podem alcançar, por meio de respingos, galhos, folhas e frutos na parte baixa da copa, com colonização dos tecidos e o aparecimento de sintomas. Após a colonização dos tecidos, novos esporângios são formados e a infecção se repete em condições favoráveis (Graham & Timmer, 1992; Erwin & Ribeiro, 1996; Feichtenberger, 2001; Tyler, 2002; PhytID-CPC Datasheet, 2007).

## 2.5 *Phytophthora* e sua posição taxonômica

*Phytophthora* pertence ao reino Straminipila, filo Oomycota, em que são classificados oomicetos que possuem flagelos em seus esporos assexuados. São dependentes da água para a sua reprodução assexuada e produzem oósporo em gametângios. A maioria das espécies da família Pythiaceae é fitopatogênica e economicamente importante (Dick, 2001). Presença de hifas diplóides e cenocíticas, parede celular composta principalmente de celulose e  $\beta$ -glucanas e não de quitina são as principais características que os distinguem dos fungos do reino Fungi (Alexopoulos et al., 1996; Dick, 2001).

*Phytophthora nicotianae* foi isolada, pela primeira vez, de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*), por Breda de Haan (1896). Porém, quando Dastur (1913) isolou *Phytophthora* da requieima da mamona (*Ricinus communis* L.) e de outros hospedeiros, observou que a espécie apresentava anterídios anfígenos e não anterídios paráginos, como descrito por Breda de Haan (1896), e deu-lhe o nome de *P. parasitica*. Tucker (1931) renomeou os isolados *P. parasitica* var. *nicotianae* patogênicos ao fumo, sendo esse nome atualmente adotado por fitopatologistas em fumo (Erwin & Ribeiro, 1996; Shew, 1991). A espécie foi reclassificada por Waterhouse (1963), que a dividiu em duas variedades: *P. nicotianae* var. *nicotianae* e *P. nicotianae* var. *parasitica*. Entretanto, Ho & Jong (1989) estudaram a similaridade de *P. nicotianae* e *P. parasitica*, sem encontrar diferenças entre elas. Hall (1994) afirmou que não há evidências suficientes para a separação das espécies nem das variedades *nicotianae* e *parasitica*.

Além de plantas de citros, *Phytophthora* está associada a uma ampla gama de hospedeiros, sendo *P. nicotianae* a de maior abrangência (Erwin & Ribeiro, 1996). As plantas de maior importância para o Brasil são acácia-negra (*Acacia mearnsii*), fumo (*Nicotiana tabacum*), guaraná (*Paulinia cupana*), abacaxi (*Ananas comosus*), cebola (*Allium cepa*), abacate (*Persea americana*),

algodão (*Gossypium* spp.), ornamentais da família Araceae, antúrio (*Anthurium andreanum*) e outros (Luz & Matsuoka, 2001; Bezerra et al., 2001; Santos et al., 2005).

## 2.6 Caracterização molecular

Métodos moleculares, incluindo sondas de DNA, marcadores genéticos, seqüenciamento das regiões ITS do rDNA e também os genes que codificam o fator de alongação 1- $\alpha$  (*tef1*) e  $\beta$ -tubulina têm sido importantes ferramentas auxiliares na identificação de espécies de *Phytophthora*, assim como em estudos de filogenia (Brasier et al., 1999; Cooke et al., 2000; Ersek et al., 1994; Goodwin et al., 1990; Kroon et al., 2004; Martin & Tooley, 2004; Ristaino et al., 1998; Riethmüller et al., 2002).

A região ITS tem sido muito utilizada para fins de filogenia, por possuir polimorfismo necessário à separação de espécies no gênero (Cooke et al., 2000). Seqüências específicas dentro desta região são muito utilizadas na detecção e na identificação de novas espécies de *Phytophthora* e de outros oomicetos, como *Pythium* (Paul, 2001). Kroon et al. (2004) usaram, para a identificação e na análise da posição filogenética de *Phytophthora*, o seqüenciamento do DNA mitocondrial (citocromo oxidase subunidade 1 e NADH desidrogenase subunidade 1) e dos genes nucleares (*fator de alongação 1- $\alpha$*  e  *$\beta$ -tubulina*) e avaliaram a precisão destes genes como também a relação interespecífica, comparando com a divisão em seis grupos morfológicos, proposta por Waterhouse (1963). Ippolito et al. (2002) desenvolveram *primers* específicos para identificar, de maneira rápida e precisa, as espécies *P. nicotianae* e *P. citrophthora* em isolados da Itália que afetam plantas de citros.

Diante da necessidade da rápida tomada de medidas preventivas e curativas contra a gomose-de-*Phytophthora*, para evitar maiores prejuízos à produção, e da definição sobre qual espécie é o principal agente etiológico da doença, faz-se necessária a caracterização morfológica, molecular e patogênica da população de *Phytophthora* associada aos citros no Brasil. Este estudo irá contribuir para aumentar o conhecimento sobre a variabilidade da população do patógeno no país e para elaborar um método para detecção e diferenciação das espécies de *Phytophthora* dos citros, por meio da técnica de PCR, para a detecção rápida deste patógeno nos citros, e uma diagnose precisa da doença em mudas em viveiros e no campo.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABECITRUS. **História da Laranja**. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br>>. Acesso em: 05 out. 2006.
- ABECITRUS. **Exportações de FCOJ**: safra atual. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br>>. Acesso em: 05 maio 2008.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. B. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: J. Wiley, 1986. 869 p.
- BEZERRA, J. L.; LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. Doenças causadas por *Phytophthora* spp. em outros hospedeiros. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F.; MATUSOKA, K.; BEZERRA, J. L. (Ed.). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. p. 731-752.
- BRASIER, C. M.; COOKE, D. E. L.; DUNCAN, J. M. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 5878-5883, 1999.
- BREDA de HAAN, J. van. De bibitziekte in de Deli Tabak veroorzaakt door *Phytophthora nicotianae*. **Meded. Lands Plantentuin**, v. 15, p. 57, 1896.
- COOKE, D. E. L.; DRENTH, A.; DUNCAN, J. M.; WAGELS, G.; BRASIER, C. M. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 30, p. 17-32, 2000.
- DASTUR, J. F. *Phytophthora parasitica* n. sp., a new disease of the castor oil plant. **Memoirs of the Department of Agriculture in India- Botanical Series**, v. 5, p. 177-231, 1913.
- DICK, M. W. **Straminipilous fungi**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001. 670 p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema de produção de citros para o Nordeste**. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 16 out. 2006.
- ÉRSEK, T.; SCHOELZ, J. E.; ENGLISH, J. T. PCR Amplification of species-specific DNA sequences can distinguish among *Phytophthora* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2616-2621, 1994.

ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. L. K. *Phytophthora* diseases worldwide. St. Paul: APS, 1996. 562 p.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F.; MATUSOKA, K.; BEZERRA, J. L. (Ed.). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. p. 283-342.

FUNDECITRUS. **Gomose de *Phytophthora***. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 05 maio 2008.

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

GRAHAM, J. H.; TIMMER, L. W.; DROUILLARD, D. L.; PEEVER, T. L. Characterization of *Phytophthora* spp. causing outbreaks of citrus brown rot in Florida. **Phytopathology**, v. 88, p. 724-729, 1998.

GRAHAM, J. H.; TIMMER, L. W. *Phytophthora* disease of citrus. In: KUMAR, J.; CHAUBE, H. S.; SINGH, U. S.; MUKHOPADHY, A. N. (Ed.). **Plant diseases of international importance: diseases of fruit crops**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1992. v. 3, p. 250-269.

HALL, G. *Phytophthora nicotianae*. IMI (International Mycological Institute) Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria N° 1200. **Mycopathologia**, v. 126, p. 61-63, 1994.

HO, H. H.; JONG, S. C. *Phytophthora nicotianae* (*P. parasitica*). **Mycotaxon**, v. 35, p. 243-276, 1989.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. **Citros**: principais informações e recomendações de cultivo. 2005. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Citros/Citros.htm>>. Acesso em: 02 jun. 2007.

IPPOLITO, A.; SCHENA, L.; NIGRO, F. Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soils by nested PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 855-868, 2002.

KROON, L. P. N. M.; BAKKER, F. T.; BOSCH, G. B. M van den; BONANTS, P. J. M.; 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.

LEDO, A. da S.; ALMEIDA, N. F. de; AZEVEDO, F. F. de. Recomendações para o cultivo de citros no Estado do Acre. Rio Branco: EMBRAPA–CPAF/AC, 1996. 29 p. (EMBRAPA–CPAF/AC. Circular Técnica, 18).

LUZ, E. D. M. N.; MATSUOKA, K. *Phytophthora*: fungo, protista ou chromista? In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F.; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. (Ed.). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. p. 731-752.

MARTIN, F. N.; 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, p. 983-991, 2004.

MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. O.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**: principais informações e recomendações de cultivo. Campinas: IAC, 2005. (Boletim Técnico, 200).

PAUL, B. ITS1 region of the rDNA of *Pythium proliferatum*, a new species its taxonomy and its comparison with related species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 206, p. 191-196, 2001.

PHYTID - CPC DATASHEET. **Identification of plant pathogenic *Phytophthora* species by ITS fingerprinting**. 2000. Disponível em: <<http://www.phytid.org/CPC/Data/P.%20nicotianae.htm>>. Acesso em: 02 jun. 2007.

RIETHMÜLLER, A.; VOGLMAYR, H.; GÖKER, M.; WEIB, M.; OBERWINKLER, F. Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. **Mycologia**, v. 94, p. 834-849, 2002.

RISTAINO, J. B.; MADRITC, H. M.; TROUT, C. L.; 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.

SANTOS, A. F.; LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J. T. de. *Phytophthora nicotianae*: agente etiológico da gomose da acácia-negra. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 81-84, 2005.

SANTOS FILHO, H. P. **Gomose dos citros**. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA-CNPMF, 1991. 2 p. (Citros em Foco, 15).

SHEW, H. D. Black shank. In: SHEW, H. D.; LUCAS, G. B. (Ed.). **Compendium of tobacco diseases**. Saint Paul: APS, 1991. p. 17-20.

TUCKER, C. M. Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. Univ. MO. **Agricultural Experimental Station Research Bulletin**, v. 153, p. 208, 1931.

TYLER, B. M. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. **Annual Review Phytopathology**, v. 40, p. 137-167, 2002.

WATERHOUSE, G. M. **Key to the species of *Phytophthora* de Bary**. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute, 1963. 22 p. (Mycological Papers, n. 92).

## **CAPÍTULO 2**

### **CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGENICA DE ESPÉCIES DE *PHYTOPHTHORA* ASSOCIADAS AOS CITROS**

*(Preparado de acordo com as normas da revista Tropical Plant Pathology)*

## **Caracterização morfológica, molecular e patogênica de espécies de *Phytophthora* associadas aos citros**

Janine M. Oliveira<sup>1</sup>, Sarah S. Costa<sup>1</sup>, Cristiano S. Lima<sup>1</sup>, Juliano dos Santos<sup>1</sup>, Eduardo Feichtenberger<sup>2</sup> & Ludwig H. Pfenning<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil. <sup>2</sup> Instituto Biológico, Sorocaba, SP, Brasil.

### **Resumo**

Este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização morfológica e patogênica dos isolados de *Phytophthora nicotianae* dos citros e outros hospedeiros e reconstruir a sua filogenia com base em seqüências da região ITS do rDNA. Baseado em características como esporângios, oogônios, oósporos e anterídios, um total de 68 isolados dos citros e de outros hospedeiros foram identificados como *P. nicotianae* e cinco isolados obtidos de citros como *P. citrophthora*. Um isolado de *P. nicotianae* de *Citrus* sp., *Nicotiana tabacum*, um de *P. citrophthora* de *Citrus* sp. e um de *P. capsici* do pimentão foram inoculados em mudas de tangerina Sunki e de fumo, e também em frutos de laranja Pêra. Todos os isolados de *P. nicotianae* foram patogênicos aos frutos e mudas de citros e fumo. *P. citrophthora* causou sintomas em frutos e em mudas de tangerina apenas. A espécie *P. capsici* não foi patogênica aos citros e fumo. Pela análise filogenética, os isolados de *P. nicotianae* de citros se agruparam com isolados de outros hospedeiros, em um único clado, com suporte de *bootstrap* de 100% de confiabilidade. A inespecificidade de *P.*

*nicotianae* foi confirmada pelos testes de patogenicidade e a análise das seqüências do rDNA mostraram baixa variação infra-específica entre os isolados de *P. nicotianae*, provenientes de diferentes países. A validação de um protocolo para a diagnose rápida e precisa por PCR pode ajudar a prevenir a disseminação da doença por meio de mudas para áreas livres do patógeno.

**Palavras chave:** *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora citrophthora*, Peronosporales, Oomycota, ITS rDNA, análise filogenética, gomose.

**Morphological, molecular and pathogenic characterization of  
*Phytophthora* species associated with citrus root rot**

Janine M. Oliveira<sup>1</sup>, Sarah S. Costa<sup>1</sup>, Cristiano S. Lima<sup>1</sup>, Juliano dos Santos<sup>1</sup>, Eduardo Feichtenberger<sup>2</sup> & Ludwig H. Pfenning<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil. <sup>2</sup> Instituto Biológico, Sorocaba, SP, Brasil.

**Abstract**

The objective of this study was to characterize *Phytophthora nicotianae* isolates from citrus and other hosts using morphology and pathogenicity, and to reconstruct its phylogeny using sequences from the ITS region of the ribosomal DNA. Based on characteristics of the sporangia, oogonium, oospore and antheridia, 68 isolates from citrus and other hosts were identified as *P. nicotianae* and five isolates from citrus were identified as *P. citrophthora*. One *P. nicotianae* isolate from *Citrus* sp., *Nicotiana tabacum*, one of *P. citrophthora* from *Citrus* sp., and one of *P. capsici* from sweet pepper were inoculated in Sunki tangerine and tobacco plants, and also in Pêra orange fruits. All *P. nicotianae* isolates were pathogenic to the fruits and to citrus and tobacco plants. *P. citrophthora* induced symptoms only on fruits and on tangerine plants. *P. capsici* did not induce symptoms on citrus and on tobacco. In the phylogenetic analyses, the *P. nicotianae* isolates from citrus grouped together with isolates from other hosts, forming a unique clade with 100% bootstrap support. The non specificity of *P. nicotianae* was confirmed in

the pathogenicity tests and the rDNA sequence analysis showed low infra specific variation in *P. nicotianae* from different countries. The validation of a PCR method for the fast and precise detection of the pathogen would help to prevent the disease spread through the use of infected plants in the implementation of new orchards in disease-free areas.

**Keywords:** *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora citrophthora*, Peronosporales, Oomycota, ITS rDNA, phylogenetic analysis, root rot.

## **Introdução**

*Phytophthora* é um gênero cosmopolita com 67 espécies descritas, muitas delas fitopatógenos economicamente importantes (Erwin & Ribeiro, 1996; Dick, 2001). A gomose-de-*Phytophthora*, ou podridão-do-pé, causada por *Phytophthora*, é uma das doenças mais importantes da cultura dos citros no Brasil, atingindo mudas e extensas áreas de pomares. A doença é caracterizada pelo aparecimento de podridões-de-raízes e podridão-do-pé, com exsudação de goma, murcha e tombamento de mudas (Feichtenberger, 2001). O patógeno também pode estar associado a sementes e causar doença em plântulas, folhas, brotos novos e frutos (Fundecitrus, 2008). As epidemias são favorecidas por períodos de chuva que excedem sete dias, temperaturas baixas e umidade alta.

*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan é relatado como o principal agente etiológico da gomose-de-*Phytophthora* em todo o mundo. A espécie é encontrada predominantemente nas regiões tropicais, causando doenças em todos os órgãos da planta, principalmente nas raízes, nas radículas, no colo e no tronco (Feichtenberger, 2001; Graham & Timmer, 1992; Timmer et al., 2000). Outra espécie, *P. citrophthora* (R.E. Sm. & E.H. Sm.) Leonian, também é citada como agente etiológico da gomose-dos-citros, entretanto, parece ser mais freqüente em regiões de clima frio e temperado, com abrangência em vários hospedeiros, tendo os citros como hospedeiros principais (Graham & Timmer, 1992; Erwin & Ribeiro, 1996).

*Phytophthora nicotianae* foi isolada pela primeira vez de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) por Breda de Haan (1896). Porém, Dastur (1913) isolou *Phytophthora* da requeima da mamona (*Ricinus communis*

L.) e de outros hospedeiros e observou a presença de anterídios anfígenos e não anterídios paráginos, como descrito por Breda de Haan (1896), e deu-lhe o nome de *P. parasitica*. A espécie foi reclassificada por Waterhouse (1963), que a dividiu em duas variedades: *P. nicotianae* var. *nicotianae* e *P. nicotianae* var. *parasitica*. A partir disso, predominou a discussão sobre a correta nomenclatura do patógeno, até que Hall (1994) afirmou que não há evidências suficientes para a separação das espécies nem das variedades *nicotianae* e *parasitica* (Erwin & Ribeiro, 1996).

A identificação de espécies de *Phytophthora* é tradicionalmente baseada na morfologia de esporângios, oogônios e anterídios de seis grupos morfológicos distintos. Ferramentas moleculares, incluindo marcadores genéticos, assim como análise de seqüências de várias regiões do DNA, oferecem subsídio para o reconhecimento de grupos filogenéticos dentro do gênero, o que possibilita a adoção de novos métodos de identificação e diagnose (Ristaino et al., 1998; Riethmüller et al., 2002).

A região ITS apresenta variações suficientes para discriminar espécies de *Phytophthora* (Cooke & Duncan, 1997). Estas variações mostram que o agrupamento das espécies, no geral, está de acordo com grupos morfológicos estabelecidos por Waterhouse (1963), embora os grupos morfológicos não tenham sido baseados na filogenia do gênero (Cooke & Duncan, 1997; Cooke et al., 2000; Föster et al., 2000). Outras regiões gênicas que codificam o fator de alongação 1- $\alpha$  (*tef1*),  $\beta$ -tubulina e mt-IGS também são empregados em estudos filogenéticos e como ferramenta de identificação de espécies de *Phytophthora* (Martin & Tooley, 2003, 2004; Cooke et al., 2000; Shena & Cooke, 2006; Kroon et

al., 2004). O conhecimento da variabilidade genética da população é pré-requisito para o desenvolvimento de ferramentas moleculares para a identificação correta de agentes etiológicos e para uma diagnose rápida e precisa. Ippolito et al. (2002), estudando a variabilidade da população de *P. nicotianae* do Sul da Itália, desenvolveram *primers* específicos que permitiram a detecção da espécie, em plantas e solo, naquele país.

A importância econômica de espécies dos citros no Brasil e a necessidade do desenvolvimento de uma ferramenta molecular para a rápida detecção de *P. nicotianae* em mudas justificam um estudo sobre a variabilidade da população de *P. nicotianae*. Os objetivos para a realização deste trabalho foram comparar isolados de *P. nicotianae* dos citros e de demais hospedeiros, por meio de caracteres morfológicos e testes de patogenicidade, e reconstruir a filogenia de *P. nicotianae* e espécies próximas com base na análise de seqüências da região ITS do rDNA. Este estudo servirá de referência para o desenvolvimento e a validação de uma ferramenta de diagnose, por PCR, de espécies de *Phytophthora* em citros.

## **Material e métodos**

### **Isolados**

Isolados de *P. nicotianae* e *P. capsici* foram obtidos de diferentes hospedeiros, de várias localidades, pela técnica de iscas (Matheron & Matejka, 1991). Amostras de solo da rizosfera, com raízes, foram transferidas para placas de Petri contendo 20 mL de água esterilizada. Discos de folha de laranjeira e casca de pimentão foram colocados em contato com a suspensão, por um período de dois a cinco dias, à

temperatura ambiente ( $\pm 27^{\circ}\text{C}$ ). O micélio crescido nas iscas foi transferido para meio CA (cenoura-ágar) contendo os antibióticos ampicilina (250 mg) e rifampicilina (10 mg), e incubado até o surgimento de colônias características do gênero *Phytophthora*. Outros isolados de *P. nicotianae* e *P. citrophthora* de *Citrus* spp., provenientes da micoteca do Instituto Biológico, Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Sorocaba, Sorocaba, SP; da Embrapa CNPF, Colombo, PR e da Embrapa CNPMA, Jaguariúna, SP, foram incluídos no presente estudo (Tabela 1).

### **Caracterização morfológica**

Os isolados foram transferidos para os meios de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), CA (cenoura-ágar) e CMA (cornmeal-ágar) e incubados no escuro, em diferentes temperaturas ( $15^{\circ}\text{C}$ ,  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$  e  $30^{\circ}\text{C}$ ), por quatro a cinco dias ou até o micélio cobrir toda a superfície da placa. O diâmetro da colônia foi medido diariamente, com valores transformados em  $\text{cm.dia}^{-1}$ . O aspecto morfológico da colônia também foi observado e classificado como algodinoso ou petalóide, denso ou ralo (Erwin & Ribeiro, 1996).

Posteriormente, as mesmas culturas foram incubadas, a  $27^{\circ}\text{C}$ , sob luz constante, por sete a dez dias, para o desenvolvimento dos esporângios e clamidósporos. Como alguns isolados não produziram esporângios, discos de micélio destes isolados foram transferidos para placas de Petri esterilizadas contendo solução de  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{pH}=6$ ,  $0,001\text{ M}$ , a  $27^{\circ}\text{C}$ , sob luz constante, por três a sete dias (Erwin & Ribeiro, 1996). A produção de oósporos deu-se por meio do pareamento do tipo sanduíche, descrito por Kellam & Zentmyer (1986). Os discos de micélio contendo

os isolados a serem testados foram pareados em meio CA e V8-ágar, e outro, contendo micélios do tipo oposto A1 ou A2, provenientes da Ceplac–Cepec, BA, intercalados por um disco do meio de cultura em placas de Petri seladas e incubadas, a 25°C, no escuro. A unidade experimental foi constituída por um pareamento com cinco repetições. Após quatro dias, foi observada a formação de estruturas sexuais no disco central.

A caracterização morfológica das estruturas foi baseada em Waterhouse (1963) e Erwin & Ribeiro (1996). Para cada isolado foram medidas 20 unidades de cada estrutura reprodutiva. Isolados representativos das espécies identificadas e caracterizadas foram preservados, pelo método de Castellani, na Coleção Micológica de Lavras (CML), Universidade Federal de Lavras.

### **Testes de patogenicidade**

Para o teste de patogenicidade foram utilizados seis isolados representativos para *P. nicotianae*, provenientes de diferentes hospedeiros, *P. citrophthora* de *Citrus* sp. e *P. capsici* de pimentão (*Capsicum annuum*), crescidos em CA, a 27°C, por sete dias sob luz constante (Tabela 2).

### **Patogenicidade em frutos e plantas**

Foram utilizados dez frutos de laranja ‘Pêra’, para cada isolado. Os frutos foram lavados e desinfestados com etanol 70%, por 2 minutos e hipoclorito 2,5%, por 4 minutos e lavados em água esterilizada. Após fermentos na casca, a inoculação foi efetuada com discos de meio de

cultura de CMA com micélio dos isolados e cobertos com algodão esterilizado embebido com água esterilizada. A testemunha foi inoculada com disco sem a presença dos microrganismos. Os frutos foram mantidos em câmara úmida, sob temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ$ ), em bandeja de plástico, durante oito dias, para o aparecimento de sintomas.

Foram utilizadas dez plantas de tangerina (*Citrus sunki*) e dez plantas de fumo, com 30 e 15 dias de idade, respectivamente, para cada isolado, como também para a testemunha. A inoculação das mudas de citros e de fumo foi realizada pela infestação do solo com distribuição de 20 mL de suspensão de água esterilizada contendo hifas, clamidósporos, esporângios e zoósporos de *Phytophthora*. A testemunha foi tratada apenas água esterilizada. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12 horas, a 24°C. Os sintomas foram avaliados após 20 dias da infestação do solo, por meio da presença de sintomas nos frutos, como podridão marrom e odor acre, e, nas plantas, a manifestação de murcha, amarelecimento das folhas, podridão das raízes, podridão do caule e morte, de acordo com a literatura (Graham & Timmer, 1992).

## **Caracterização molecular**

### **Extração de DNA**

Foram utilizados 32 isolados de *Phytophthora* e cultivados em 100 mL de meio CA, sem acrescentar ágar, por cinco dias, a 25°C. Após esse período, o micélio foi filtrado e lavado com água estéril. Para a extração do DNA, seguiu-se o protocolo baseado em CTAB, descrito por Murray & Thompson (1980). O micélio foi macerado em nitrogênio líquido e

colocado em microtubos de 1,5 mL, adicionando-se o tampão de extração CTAB (Tris-HCl [pH 8,0], 100 mM; NaCl 500 mM; EDTA [pH 8,0] 50 mM; CTAB 2%) sendo 1  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol e 1% de polivinipirrolidone (PVP), adicionado juntamente ao tampão de extração. Posteriormente, foi adicionado clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). O sobrenadante coletado foi ressuspensionado em isopropanol. Em seguida, os ácidos nucleicos foram ressuspensionados em tampão TE 1x (Tris-HCl, 1 mM de EDTA; pH 7,4) e, após a adição de 5  $\mu$ L de Rnase (0,5 mg.mL<sup>-1</sup> de volume final), eles foram incubados em banho-maria, por 30 minutos, a 37°C. Em seguida, foi feita nova adição de isopropanol e realizou-se uma lavagem com etanol a 70%, como já descrito. Após esta etapa, o DNA foi ressuspensionado em 50  $\mu$ L de TE 1x. O DNA foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%; o DNA extraído foi diluído na proporção de 1:100.

### **Amplificação e seqüenciamento do DNA**

Foram utilizados os *primers* ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) (White et al., 1990) para a amplificação do fragmento de 32 isolados seqüenciados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). As amplificações foram realizadas em um termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer). As reações foram realizadas com 20 ng de DNA, 50  $\mu$ L de solução tampão, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,25 mM dos *primers* forward e reverse, 0,025 U/ $\mu$ L Taq. As condições da amplificação do DNA foram: 94°C, por 1 minuto e 40 segundos, seguido de 35 ciclos em:

94°C, por 1 minuto; 55°C, por 55 segundos e 72°C, por 2 minutos, com alongação final de 72°C, por 5 minutos. O produto foi purificado com um kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) e seqüenciado utilizando-se um seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems), no Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia Molecular, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP). As seqüências da região ITS, de ambas as fitas do rDNA, dos isolados de *Phytophthora* analisadas neste estudo, foram depositadas na base de dados do NCBI.

### **Análise filogenética**

Os eletroferogramas foram analisados pelo programa BioEdit<sup>®</sup> (Hall, 1999) e as seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências disponíveis na base de dados do NCBI, utilizando-se o programa BLAST (Altschul et al., 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>). Os alinhamentos das seqüências das espécies de *Phytophthora* associadas à gomose-de-*Phytophthora* no Brasil, juntamente com outras espécies de *Phytophthora*, foram gerados com CLUSTALW (como implantado no BioEdit) e ajustados manualmente no BioEdit. As análises filogenéticas foram realizadas no programa PAUP 4.0 versão beta 10 (Swofford, 2005). Árvores filogenéticas de máxima parcimônia foram produzidas utilizando-se buscas heurísticas com 1.000 adições de seqüências ao acaso, e as opções *tree-bisection-reconnection* (TBR), *branch swapping* and MULTREES efetivadas. Cada *gap* foi considerado como um quinto caractere nas análises (newstate). A análise de *bootstrap* foi realizada pelo critério de parcimônia, com 1.000

repetições e com buscas heurísticas utilizando 1.000 adições simples de seqüências. As seqüências de ITS de *Phytophthora nicotianae*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. cactorum*, *P. sojae* e *P. megasperma*, amplificadas com os *primers* ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'); *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. dreschleri*, *P. palmivora*, *P. syringae* e três isolados de *P. nicotianae* amplificados com os *primers* ITS4 e ITS6 (GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG), (citados na literatura, associadas com a gomose-de-*Phytophthora*) e *Pythium graminicola* e *Pythium periillum*, amplificados com os *primers* UN-UP18S42 (5' CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC 3') e UN-LO28S576B (5' CTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACG 3') como *outgroup* foram obtidas do GenBank (Tabela 1). O alinhamento e a árvore gerados no presente estudo foram depositados na base de dados TreeBASE ([www.treebase.org](http://www.treebase.org)).

#### **Análise *in silico* dos primers específicos desenvolvidos por Ippolito et al. (2002)**

Os *primers* Pn5B (forward: 5' GAACAATGCAACTTATTGGACGTTT 3') e Pn6 (reverse: 5' AACCGAAGCTGCCACCCTAC 3'), desenvolvidos para a região ITS por Ippolito et al. (2002) a partir de isolados de *P. nicotianae* do Sul da Itália, foram testados *in silico*, quanto à especificidade em relação aos isolados do Brasil. Seqüências de ITS dos isolados *P. nicotianae* do Brasil foram alinhadas no BioEdit<sup>®</sup>, juntamente com os *primers* desenvolvidos por Ippolito et al. (2002).

## Resultados

### Caracterização morfológica

Neste estudo, avaliou-se um total de 90 isolados. Foram caracterizados, morfológicamente, 73 isolados, sendo 68 de *P. nicotianae* e 5 de *P. citrophthora*, do Brasil (Tabela 1). Em geral, todos os isolados de *P. nicotianae* apresentaram melhor desenvolvimento nos meios CA e CMA com taxa de crescimento significativa de 2,0 cm.dia<sup>-1</sup> entre as temperaturas de 25°C e 30°C (Figura 1). Quanto ao aspecto das colônias, estas apresentaram micélio aéreo algodinoso e denso em PDA e CA e micélio ralo em CMA.

Os esporângios de *P. nicotianae* apresentaram-se terminais, poucos intercalados, esféricos, ovóides, piriformes, alguns alongados, medindo (15)30-50(77,5) µm de comprimento x (15)20-37,5(47,5) µm de largura, relação comprimento/largura de 1,5, papilados e persistentes, raramente bipapilados. Os clamidósporos apresentaram-se esféricos, terminais e intercalares, com (15)20-35(45) µm de diâmetro. Os oogônios apresentaram-se esféricos, com (20)22-27(30) µm de diâmetro, oósporos apleuróticos com (15)20-22,5(25) µm de diâmetro e anterídios anfígenos de 10-12,5 x 10-15 µm (Tabela 2) (Figura 3).

Os isolados de *P. citrophthora* tiveram maior taxa de crescimento em CA e CMA com média de 1,8 cm.dia<sup>-1</sup>, entre as temperaturas de 25°C e 30°C (Figura 2). O aspecto da colônia observado foi petalóide com bordas difusas e algodinosas, em ambos os meios. Esporângios de forma e de tamanho variáveis, irregulares, ovóides, alongados, freqüentemente bipapilados, persistentes, (22,5)35-50(67,5) µm comprimento x (15)30-

37,5(50)  $\mu\text{m}$  de largura, relação comprimento/largura de 1,7. Clamidósporos foram ausentes (Tabela 2) (Figura 4).

## **Testes de patogenicidade**

### **Patogenicidade em frutos e plantas**

Para o teste de patogenicidade, utilizaram-se seis isolados, sendo quatro de *P. nicotianae*, um de *P. citrophthora* e um de *P. capsici* (Tabela 3). Todos os isolados de *P. nicotianae* e de *P. citrophthora* foram patogênicos a frutos de laranja 'Pera'. Os sintomas evidenciaram forte odor acre, podridão-marrom nos frutos, crescimento micelial de coloração branca de aspecto algodinoso sobre a casca e, internamente, destruição das células da laranja. A presença dos patógenos foi confirmada pelo reisolamento. *Phytophthora capsici* não foi patogênico aos frutos e não houve desenvolvimento dos sintomas nos frutos testemunhas.

Todos os isolados de *P. nicotianae* desenvolveram sintomas nas plantas de citros como podridão nas raízes e no caule, murcha e morte de todas as plantas. O isolado de *P. citrophthora* também foi patogênico. As plantas testemunhas não desenvolveram sintomas. Isolados de *P. citrophthora* não foram patogênicos a plantas de fumo. Os sintomas provocados em plantas de fumo, por isolados de *P. nicotianae* de fumo e citros, consistiram de podridão nas raízes, necrose na base do caule, amarelecimento das folhas, tombamento e morte. Os demais isolados produziram os mesmos sintomas, visíveis após 15 dias da infestação do solo. A testemunha não desenvolveu sintomas. O reisolamento dos tecidos deu-se apenas para os isolados de *P. nicotianae*, com confirmação

dos postulados de Koch. *Phytophthora capsici* não foi patogênica a plantas de citros e fumo, como também não foi reisolado.

Os sintomas nos frutos, causados por *P. nicotianae* e *P. citrophthora*, evidenciaram forte odor acre, podridão-marrom nos frutos, crescimento micelial de coloração branca e de aspecto algodinoso sobre a casca. As principais manifestações do patógeno da gomose em mudas dos citros estão de acordo com os registros encontrados na literatura (Graham & Timmer, 1992; Feichtenberger, 2001). Os sintomas causados no fumo por isolados *P. nicotianae*, como podridão em raízes, necrose na base do caule, amarelecimento das folhas, tombamento e morte, estão de acordo com o descrito por Shew (1991) e por Massola Jr. et al. (2005).

#### **Filogenia dos isolados de *Phytophthora* associados à gomose dos citros**

A região ITS do rDNA de 32 isolados de *P. nicotianae* foi seqüenciada. As seqüências nucleotídicas de todos os isolados de *P. nicotianae* foram idênticas entre si, exceto uma, que apresentou um nucleotídeo de diferença (CML 1350). Na comparação com as seqüências do GenBank, os isolados estudados diferiram em quatro nucleotídeos. Os fragmentos de ITS seqüenciados, foram de ~900 pb, para todos os isolados. O alinhamento das seqüências ITS continha 522 caracteres, dos quais 256 foram constantes, 233 informativos e 33 não informativos quanto à parcimônia. Foram obtidas duas árvores igualmente parcimoniosas (446 passos, CI = 0,80, RI = 0,86, HI = 0,19), das quais uma foi selecionada para representar a filogenia dos isolados estudados, com base na semelhança com árvores previamente publicadas (Figura 5). Na árvore construída, todos os isolados de *P. nicotianae* que causam a

gomose dos citros, incluindo as seqüências obtidas do Genbank de isolados de *Citrus* spp. (DQ988174), *Acacia mearnsii* (DQ988175), *Eucalyptus smithii* (DQ988176) e *Kalanchoe* spp. (AB217682), formaram um clado com suporte de 100% na análise de *bootstrap*, evidenciando a monofilia desta espécie. A espécie que se agrupou mais próxima de *P. nicotianae* foi *P. cactorum*. As espécies mais próximas de *P. citrophthora* foram *P. capsici* e *P. citricola*. Na análise *in silico*, os *primers* desenvolvidos por Ippolito et al. (2002), para *P. nicotianae*, foram específicos para os isolados de *P. nicotianae* do Brasil.

## **Discussão**

Neste trabalho foi realizado um estudo da variabilidade de *P. nicotianae*, utilizando-se isolados de citros do Brasil, reunindo dados de caracterização morfológica, patogênica e filogenia. Esporângios predominantemente ovóides e esféricos e a presença abundante de clamidósporos em *P. nicotianae* são características que distinguem esta espécie de *P. citrophthora*, que apresenta esporângios bipapilados e com formas irregulares, e não apresenta clamidósporos (Erwin & Ribeiro, 1996).

Os caracteres e medidas dos esporângios, clamidósporos, dos oogônios e oósporos estão de acordo com os apresentados por Waterhouse (1963), Erwin & Ribeiro (1996) e Feichtenberger (2001). Os caracteres de *P. nicotianae* também são semelhantes aos de isolados patogênicos a *Citrus sinensis*, observados no estado do Alagoas, Brasil (Muniz et al., 2004), na acácia-negra (*Acacia mearnsii*), no Paraná (Santos et al., 2004) e aos isolados do cancro-do-tomate, no Chile (Bruna

& Tobar, 2004). Waterhouse (1963) relatou a presença de esporângios não persistentes com pedicelos curtos, quando descreveu a variedade *parasitica*. Entretanto, não houve confirmação desses dados (Erwin & Ribeiro, 1996). Neste estudo, todos os esporângios apresentaram-se persistentes e sem pedicelo.

Isolados identificados como *P. nicotianae* apresentam ampla gama de hospedeiros, como albizia (*Albizia julibrissin*), noqueira (*Juglans hindsii*), jojoba (*Simmondsia chinensis*), petúnia (*Petunia hybrida*), hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis*), pessegueiro (*Prunus pérsica*) limão-rugoso (*Citrus jambhiri*) e tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Matheron & Matejka, 1990; Bruna & Tobar, 2004), evidenciando, assim, uma população heterogênea quanto à patogenicidade. Em mudas de fumo, *P. citrophthora* e *P. capsici* não foram patogênicos, uma vez que parecem apresentar uma gama restrita de hospedeiros, como citros, solanáceas e cucurbitáceas, respectivamente (Erwin & Ribeiro, 1996).

A região ITS tem sido utilizada para estudos de populações dentro do gênero *Phytophthora*, pois, por meio de suas seqüências de nucleotídeos, pode-se fazer distinção de espécies que possuem marcadores morfológicos limitados (Cooke et al., 2000). A análise filogenética da região ITS do rDNA apresentou boa resolução para diferenciar espécies de *Phytophthora*. *Phytophthora nicotianae* formou um clado único, com suporte de *bootstrap* de 100% de confiabilidade, juntamente com os isolados de outros hospedeiros (AB217682, AF266788, DQ988174, DQ988175 e DQ988176). Resultado semelhante foi apresentado na filogenia proposta por Rosa et al. (2006), para isolados de *P. parasitica* dos citros do Brasil, em que 14 isolados agruparam em

um só clado e apresentaram de 98,88% a 100% de identidade genética entre si e 99,5% entre estes e a sequência de *P. nicotianae* depositada no GenBank. Outro resultado semelhante foi observado por Maseko et al. (2007), quando compararam duas novas espécies, *P. frigida* e *P. alticola*, com diferentes espécies de *Phytophthora* da África do Sul, dentre elas, três isolados de *P. nicotianae* de hospedeiros diferentes, que tiveram 100% de identidade. A variação infra-específica entre os isolados de *P. nicotianae* foi baixa, o que não suporta a sua separação em espécies distintas. Não houve correlação entre origem geográfica, resultado também observado, por Martin & Tooley (2003), na análise filogenética do gênero, usando sequências do gene *Cox*. Porém, estes autores utilizaram apenas dois isolados desta espécie.

Várias espécies de *Phytophthora* podem estar associadas aos citros, sendo *P. nicotianae*, *P. citrophthora* e *P. palmivora* diretamente envolvidas na produção de sintomas típicos (Graham et al., 1998; Timmer et al., 2000). O clado de *P. nicotianae* permite inferir que se trata de uma espécie distinta, de acordo com a literatura em que é discutida a evolução do gênero, assim como a hipótese de sua monofilia (Cooke et al., 2000; Foster et al., 2000; Kroon et al., 2004). *Phytophthora palmivora*, apesar de produzir sintomas de podridão em raízes e frutos dos citros (Graham et al., 1998), formou um clado distante de *P. nicotianae*, concordando com a filogenia do gênero *Phytophthora* proposta por (Cooke et al., 2000).

*Phytophthora citrophthora* agrupou junto a *P. capsici* e *P. citricola* em um mesmo clado. A proximidade entre estas espécies, mostrada na árvore filogenética, já foi evidenciada em outros trabalhos utilizando a região ITS rDNA (Foster et al., 2000), o gene *Cox* e os genes

*TrnG* e *TrnY* (Shena & Cooke, 2006). Estas espécies já foram relatadas em associação com citros. Porém, somente *P. citrophthora* causa sintomas de gomose e é mais freqüentemente encontrada em regiões de clima temperado, afetando todos os órgãos da planta (Feichtenberger, 2001; Erwin & Ribeiro, 1996).

Com base nos resultados, o agente etiológico predominante da gomose dos citros é *P. nicotianae*. Apesar de ter ampla gama de hospedeiros e causar diversos sintomas, como murcha, tombamento, podridão e necrose das raízes e radículas, queima, mancha e podridão foliar, podridão-marrom dos frutos, *P. nicotianae* pode ser considerada uma única espécie baseada na análise filogenética, não justificando a utilização de *P. parasitica*.

Neste estudo mostrou-se, pela primeira vez, que existe uniformidade genética na população de *P. nicotianae* no Brasil, apesar de esta espécie se reproduzir sexuadamente. Isso pode ser explicado por uma possível prevalência da reprodução assexuada no campo ou pela possibilidade de *P. nicotianae* ter sido disseminado juntamente com material propagativo, a partir de um mesmo local. No entanto, variações dentro da população de *P. nicotianae* são esperadas, contudo, é necessário o uso de outros genes ou marcadores do tipo AFLP e SSR. Conforme proposto anteriormente, as variações da região ITS do rDNA foram suficientes para, inclusive, propor classificação de alguns isolados como espécie distinta. Espera-se, portanto, detectar variantes dentro da população de *P. nicotianae*.

Ippolito et al. (2002) desenvolveram *primers* específicos para a população de *P. nicotianae*, do Sul da Itália, que causa gomose-de-

*Phytophthora* nos citros cultivados naquela região. Nas análises filogenéticas, como as seqüências de Ippolito et al. (2002) não estavam disponíveis no GenBank, não foi possível compará-las com as seqüências de *P. nicotianae* obtidas neste estudo. Os *primers* se alinharam com as seqüências dos isolados do Brasil na análise *in silico*. Portanto, se o desenho dos *primers* foi feito com base na região conservada, então, espera-se a especificidade destes para a população de *P. nicotianae* do Brasil.

Com essa caracterização da população de *P. nicotianae* que ocorre nos citros no Brasil, os isolados desta espécie poderão ser usados para a validação dos *primers* específicos desenvolvidos por Ippolito et al. (2002) para testar a especificidade e sensibilidade destes. Ainda é possível testá-los em mudas e em solos contaminados, para a detecção deste patógeno, visando à realização de uma diagnose rápida e precisa, a fim de prevenir sua disseminação por meio de mudas para áreas livres do patógeno.

### Legendas das Figuras

Fig. 1. Efeito da temperatura sobre o crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae* do *Citrus*. C.V. geral = 4,70%. P = 0,0001.

Fig. 2. Efeito da temperatura sobre o crescimento micelial de *Phytophthora citrophthora* do *Citrus*. C.V. geral = 4,62%. P = 0,0001.

Fig. 3. *Phytophthora nicotianae*. A-F: esporângios unipapilados, G: liberação dos zoósporos, H-I: clamidósporos, J-K: oogônio.

Fig. 4. *Phytophthora citrophthora*. A-B: esporângios bipapilados, C-F: esporângios unipapilados.

Fig. 5. Árvore filogenética de espécies de *Phytophthora* baseada em análise da região ITS rDNA

## Referências Bibliográficas

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; 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.
- BREDA de HAAN, J. van. De bibitziekte in de Deli Tabak veroorzaakt door *Phytophthora nicotianae*. **Meded. Lands Plantentuin**, v. 15, p. 57, 1896.
- BRUNA, A. V.; TOBAR, G. C. Determinación de *Phytophthora nicotianae*, causante del cancro del tallo de tomate en Chile. **Agricultura Técnica**, Santiago do Chile, v. 64, p. 314-318, 2004.
- COOKE, D. E. L.; DRENTH, A.; DUNCAN, J. M.; WAGELS, G.; BRASIER, C. M. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 30, p. 17-32, 2000.
- COOKE, D. E. L.; DUNCAN, J. M. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. **Mycological Research**, v. 101, p. 667-677, 1997.
- DASTUR, J. F. *Phytophthora parasitica* n. sp., a new disease of the castor oil plant. **Memoirs of the Department of Agriculture in India. Botanical Series**, v. 5, p. 177-231, 1913.
- DICK, M. W. **Straminipilous fungi**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001. 670 p.
- ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. ***Phytophthora* diseases worldwide**. Saint Paul: APS, 1996.
- FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F.; MATUSOKA, K.; BEZERRA, J. L. (Ed.). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. p. 283-342.

FÖSTER, H.; CUMMINGS, M. P.; COFFEY, M. D. Phylogenetic relationships of *Phytophthora* species based on ribosomal ITS1 DNA sequence analysis with emphasis on Waterhouse groups V and VI. **Mycological Research**, v. 104, p. 1055-1061, 2000.

FUNDECITRUS. **Gomose de Phytophthora**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 05 maio 2008.

GRAHAM, J. H.; TIMMER, L. W.; DROUILLARD, D. L.; PEEVER, T. L. Characterization of *Phytophthora* spp. causing outbreaks of citrus brown rot in Florida. **Phytopathology**, v. 88, p. 724-729, 1998.

GRAHAM, J. H.; TIMMER, L. W. *Phytophthora* disease of citrus. In: KUMAR, J.; CHAUBE, H. S.; SINGH, U. S.; MUKHOPADHY, A. N. (Ed.). **Plant diseases of international importance: diseases of fruit crops**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1992. v. 3, p. 250-269.

HALL, G. *Phytophthora nicotianae*. IMI (International Mycological Institute) Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria Nº 1200. **Mycopathologia**, v. 126, p. 61-63, 1994.

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

IPPOLITO, A.; SCHENA, L.; NIGRO, F. Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soils by nested PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 855-868, 2002.

KELLAM, M. K.; 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.; BOSCH, G. B. M van den; BONANTS, P. J. M.; 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.

LÉVESQUE, C. A.; COCK, A. W. A. M. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycological Research**, v. 108, p. 1363-1383, 2004.

MARTIN, F. N.; 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, p. 983-991, 2004.

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

MASEKO, B.; BURGESS, T. I.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J. Two new *Phytophthora* species from south African *Eucalyptus* plantations. **Mycological Research**, v. 111, p. 1321-1338, 2007.

MASSOLA JR., N. S.; PULCINELLI, C. E.; JESUS JR., W. C.; GODOY, C. V. Doenças do fumo (*Nicotiana tabacum* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, p. 361-371.

MATHERON, M. E.; MATEJKA, J. C. Differential virulence of *Phytophthora parasitica* recovered from citrus and other plants to rough lemon and tomato. **Plant Disease**, v. 74, p. 138-140, 1990.

MATHERON, M. E.; MATEJKA, J. C. Effect of sodium tetrathiocarbonate, metalaxyl and fosetyl - Al on development and control of *Phytophthora* root rot of citrus. **Plant Disease**, v. 75, p. 264-268, 1991.

MUNIZ, M. F. S.; QUEIROZ, F. M.; MENEZES, M. Caracterização de isolados de *Phytophthora* patogênicos a *Citrus sinensis* no Estado de Alagoas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 201-204, 2004.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, p. 4321-4325, 1980.

RIETHMÜLLER, A.; VOGLMAYR, H.; GÖKER, M.; WEIB, M.; OBERWINKLER, F. Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. **Mycologia**, v. 94, p. 834-849, 2002.

RISTAINO, J. B.; MADRITC, H. M.; TROUT, C. L.; 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.

ROSA, D. D.; MACHADO, A. M.; TARGON, M. L. P. N.; FURTADO, E. L. Diversidade de *Phytophthora parasitica* de citrus usando seqüências de nucleotídeos da região ITS-5.8S rDNA. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 190-193, 2006.

SANTOS, A. F.; LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J. T. de. *Phytophthora nicotianae*: agente etiológico da gomose da acácia-negra. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 81-84, 2004.

SHENA, L.; COOKE, D. E. L. Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a “molecular tool box” for the detection and characterization of *Phytophthora* species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 70-85, 2006.

SHEW, H. D. Black shank. In: SHEW, H. D.; LUCAS, G. B. (Ed.). **Compendium of tobacco diseases**. Saint Paul: APS, 1991. p. 17-20.

SWOFFORD, D. L. **PAUP\***: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods). Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2005.

TIMMER, L. W.; GARNSEY, S. M.; GRAHAM, J. H. **Compendium of citrus diseases**. 2. ed. Saint Paul: APS, 2000.

VILLA, N. O.; KEGEYAMA, K.; SUGA, H. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and b-tubulin gene sequences. **Mycologia**, v. 98, p. 410-422, 2006.

WATERHOUSE, G. M. **Key to the species of *Phytophthora de Bary***. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute, 1963. 22 p. (Mycological Papers, n. 92).

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic, 1990. p. 315-322.

**Tabela 1** - Isolados utilizados neste estudo

Espécies de <i>Phytophthora</i>	Hospedeiro	Código CML <sup>1</sup>	Código LRS <sup>2</sup>	Origem	GenBank ITS <sup>4</sup>
<i>P. nicotianae</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	0317	-	EMBRAPA-CNPMA	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1349	29/89	Conchal, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1350	28/89	Conchal, SP	EU855148
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1351	27/89	Araras, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1352	21/89	Capela do Alto, SP	EU855160
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1354	05/89	Conchal, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1355	04/89	Conchal, SP	EU855169
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1356	103/88	Mogi Guaçu, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1357	83/88	Limeira, SP	EU855152
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1358	79/88	Mogi Guaçu, SP	EU855150
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1359	73/88	Tietê, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1361	66/88	Catancuva, SP	EU855151
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1363	38/87	Casa Blanca, SP	EU855146
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1364	09/87	Conchal, SP	EU855145
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1365	30/89	Araras, SP	EU855161
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1367	34/89	Conchal, SP	EU855176
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1368	36/89	Novo Horizonte, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1369	54/89	Aguai, SP	EU855153
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1370	01/90	Limeira, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1371	05/90	Conchal, SP	EU855158
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1372	07/90	Mogi Mirim, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1373	15/90	Mogi Mirim, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1377	33/90	Mogi Guaçu, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1378	37/90	Limeira, SP	EU855147
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1379	40/90	Mogi Guaçu, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1384	11/91	-	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1385	14/91	-	EU855159
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1387	41/00	Araraquara, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1389	38/00	Mendonça, SP	EU855155
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1390	39/00	Sales, SP	EU855157
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1391	36/00	Tabapirã, SP	EU855149
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1392	37/00	Mendonça, SP	EU855170
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1393	33/00	Tabapirã, SP	EU855162
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1394	35/00	Cajobi, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1396	31/00	Tabapuã, SP	EU855171
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1399	21/00	Uberaba, MG	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1400	24/00	Bebedouro, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1401	17/00	José Bonifácio, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1402	19/00	Frutal, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1403	63/91	Getulina, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1404	15/00	Santa Salete, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1406	23/91	Vista Alegre do Alto, SP	EU855156
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1407	28/91	Ponto Feliz, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1408	36/91	Gavião Peixoto, SP	EU855154

<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1410	42/91	Gavião Peixoto, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1411	43/91	Gavião Peixoto, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1412	49/91	Casa Blanca, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1414	47/91	Mogi Mirim, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1415	05/91	Casa Blanca, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1416	51/91	Casa Blanca, SP	EU855166
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1417	59/91	Botucatu, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1419	06/01	Frutal, SP	EU855168
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1421	89/01	Inhumas, GO	EU855163
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1422	66/02	Pinheiro, ES	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1423	106/03	Iacanga, SP	EU855167
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1425	07/06	Iacanga, SP	EU855174
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1426	01/07	Sales, SP	EU855175
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1427	03/07	Pindorama, SP	EU855164
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1428	-	Brumadinho, MG	EU855173
<i>P. nicotianae</i>	<i>Kalanchoe</i> spp.	1429	-	Holambra, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	Ponkã	1430	-	Campanha, MG	-
					Cont...
<b>Espécies de <i>Phytophthora</i></b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Código CML<sup>1</sup></b>	<b>Código LRS<sup>2</sup></b>	<b>Origem</b>	<b>GenBank ITS<sup>4</sup></b>
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus sinensis</i>	1431	-	P17 - UFAL, AL <sup>3</sup> Jacuípe, AL	EU855165
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus sinensis</i>	1432	-	P43 - UFAL, AL <sup>3</sup> Santana do Mundaú, AL	EU855172
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	1433	-	Faz Sitio Novo/SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Acacia mearnsi</i>	1434	-	644 CEPLAC/CEPEC Colombo, PR	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Acacia mearnsi</i>	1435	-	645 CEPLAC/CEPEC Colombo, PR	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Acacia mearnsi</i>	1438	-	(AM5) EMBRAPA- CNPFC Colombo, PR	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Acacia mearnsi</i>	1439	-	(2) EMBRAPA-CNPFC Colombo, PR	-
<i>P. citrophthora</i>	<i>Citrus</i> sp.	1360	72/88	Tietê, SP	-
<i>P. citrophthora</i>	<i>Citrus</i> sp.	1362	44/87	Tietê, SP	-
<i>P. citrophthora</i>	<i>Citrus</i> sp.	1366	32/89	Itapetinga, SP	-
<i>P. citrophthora</i>	<i>Citrus</i> sp.	1374	16/90	-	-
<i>P. citrophthora</i>	<i>Citrus</i> sp.	1375	17/90	Taquari, SP	-
<i>P. capsici</i>	<i>Capsicum annuum</i>	1440	-	Piracicaba, SP	-
<i>P. nicotianae</i>	<i>Kalanchoe</i> sp.	-	-	-	AB217682 <sup>5</sup>
<i>P. capsici</i>	<i>Cucurbita fruit</i>	-	-	Hokkaido	AB217670 <sup>5</sup>
<i>P. sojae</i>	Soybean	-	-	Fukui	AB217683 <sup>5</sup>
<i>P. megasperma</i>	Solo	-	-	Hokkaido	AB217680 <sup>5</sup>
<i>P. cinnamomi</i>	<i>Hyibericum androsaemum</i>	-	-	Kochi	AB217675 <sup>5</sup>
<i>P. cactorum</i>	<i>Paeonia lactiflora</i>	-	-	China	AB217674 <sup>5</sup>
<i>P. citricola</i>	<i>Rubus idaeus</i>	-	-	Irlanda	AF266788 <sup>6</sup>

<i>P. citrophthora</i>	<i>Actinidia chinensis</i>	-	-	Chile	AF266785 <sup>6</sup>
<i>P. drechsleri</i>	<i>Beta vulgaris</i>	-	-	Estados Unidos	AF266798 <sup>6</sup>
<i>P. palmivora</i>	<i>Theobroma cacao</i>	-	-	-	AF266780 <sup>6</sup>
<i>P. syringae</i>	<i>Rubus idaeus</i>	-	-	Escócia	AF266803 <sup>6</sup>
<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.			Tzaneen, Limpopo	DQ988174 <sup>7</sup>
<i>P. nicotianae</i>	<i>Acacia mearnsii</i>			Lions River, KZN	DQ988175 <sup>7</sup>
<i>P. nicotianae</i>	<i>Eucalyptus smithii</i>			Hodgsons, KwaZulu-Natal	DQ988176 <sup>7</sup>
<i>Pythium peritium</i>	Solo	-	-	Flórida, EUA	AY598683 <sup>8</sup>
<i>Pythium graminicola</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	-	-	Jamaica	AY598625 <sup>8</sup>

<sup>1</sup> CML - Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

<sup>2</sup> Código de acesso da coleção do Instituto Biológico, Sorocaba, SP.

<sup>3</sup> Coleção da Universidade Federal do Alagoas, AL.

<sup>4</sup> Acesso no GenBank de depósitos de seqüências de DNA

<sup>5</sup> Isolados utilizados em análise baseada em ITS rDNA por Villa et al. (2006).

<sup>6</sup> Isolados utilizados em análise baseada em ITS rDNA por Cooke et al. (2000).

<sup>7</sup> Isolados utilizados em análise baseada em ITS rDNA por Maseko et al. (2007).

<sup>8</sup> Isolados utilizados em análise baseada em ITS rDNA por Lévesque & Cock (2004).

**Tabela 2** - Características morfológicas diferenciais de *Phytophthora nicotianae* e *P. citrophthora*

Morfologia	Espécie	
	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. citrophthora</i>
Esporângio		
comprimento	40 (15-77,5)	46 (22,5-7,5)
largura	26 (15-7,5)	29 (15-37,5)
formato	ovóide	ovóide,variável
persistente	+	+
papilado	unipapilados	uni e bipapilados
Clamidósporo	presente	ausente
Oogônio	esférico	ausente
Anterídio	anfígeno	ausente

Medições em micrômetros

**Tabela 3** – Patogenicidade de *P. nicotianae*, *P. citrophthora* e *P. capsici* a frutos e plantas de citros e a plantas de fumo, determinada pela presença de sintomas

Código CML	Espécie	Hospedeiros	Fruto de Citros	Citros					Fumo			
				Podridões		Murcha	Morte	Podridões		Murcha	Morte	
				Raíz	Caul e			Raíz	Caul e			
1425	<i>P. nicotianae</i>	<i>Citrus</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0317	<i>P. nicotianae</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1429	<i>P. nicotianae</i>	<i>Kalanchoe</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1439	<i>P. nicotianae</i>	<i>Acacia mearnsi</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1375	<i>P. citrophthora</i>	<i>Citrus</i> sp.	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1440	<i>P. capsici</i>	<i>Capsicum annum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

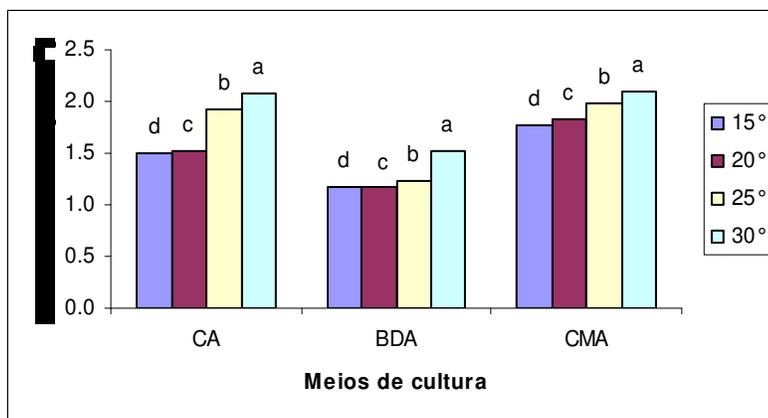


Fig. 1. Efeito da temperatura sobre o crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae* do *Citrus*. C.V. geral = 4,70%. P = 0,0001.

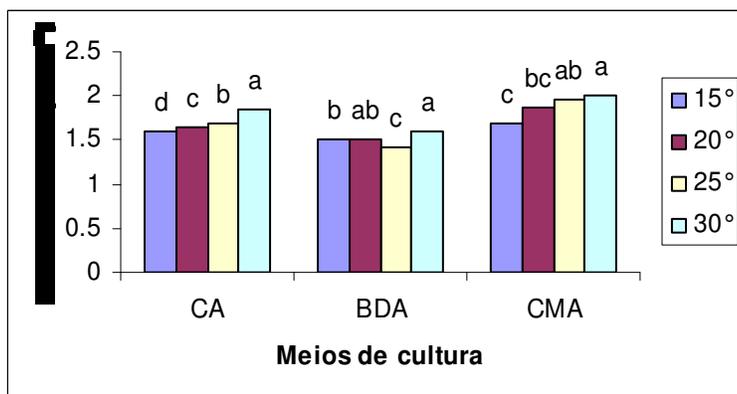


Fig. 2. Efeito da temperatura sobre o crescimento micelial de *Phytophthora citrophthora* do *Citrus*. C.V. geral = 4,62%. P = 0,0001.

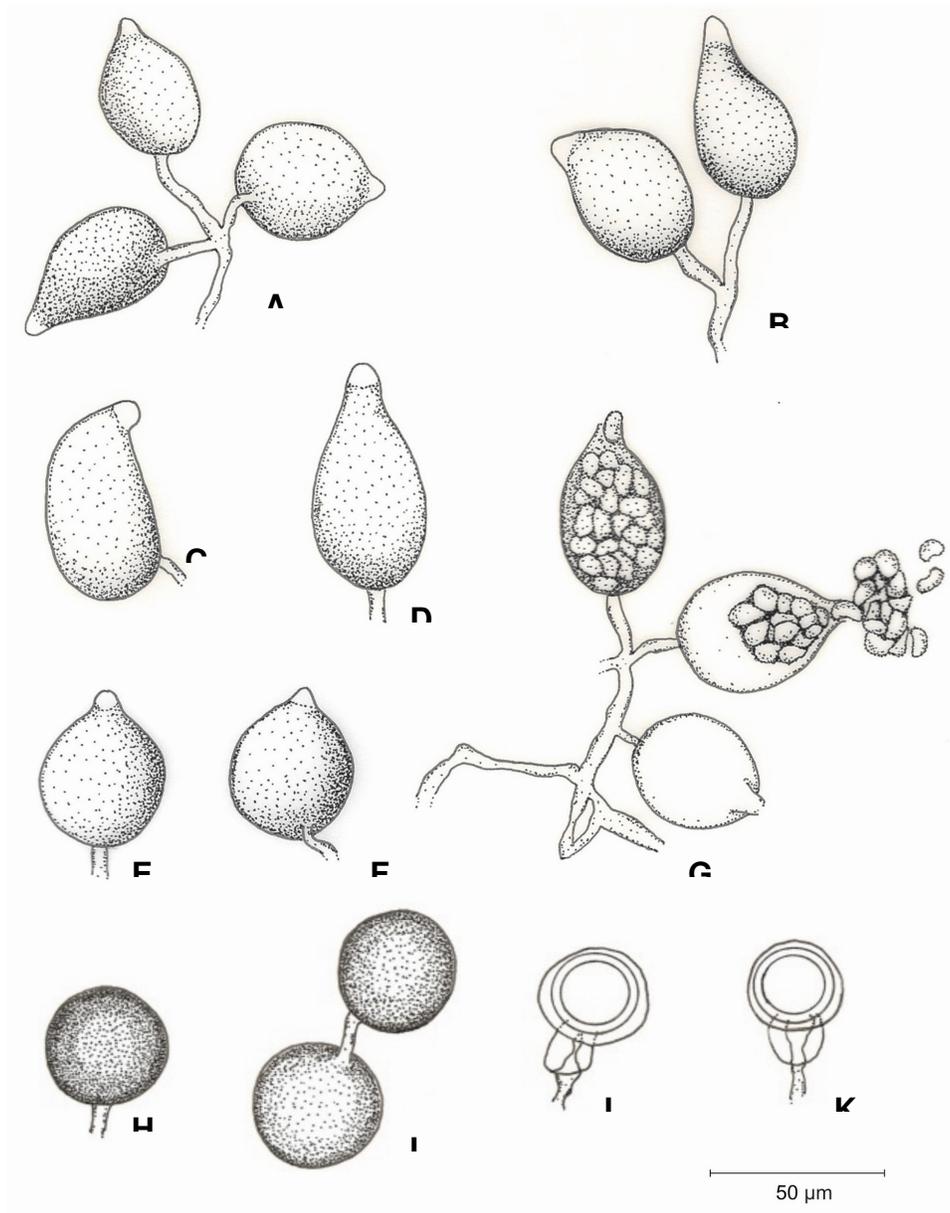


Fig. 3. *Phytophthora nicotianae*. A-F: esporângios unipapilados, G: liberaç o dos zo sporos, H-I: clamid sporos, J-K: oogônio.

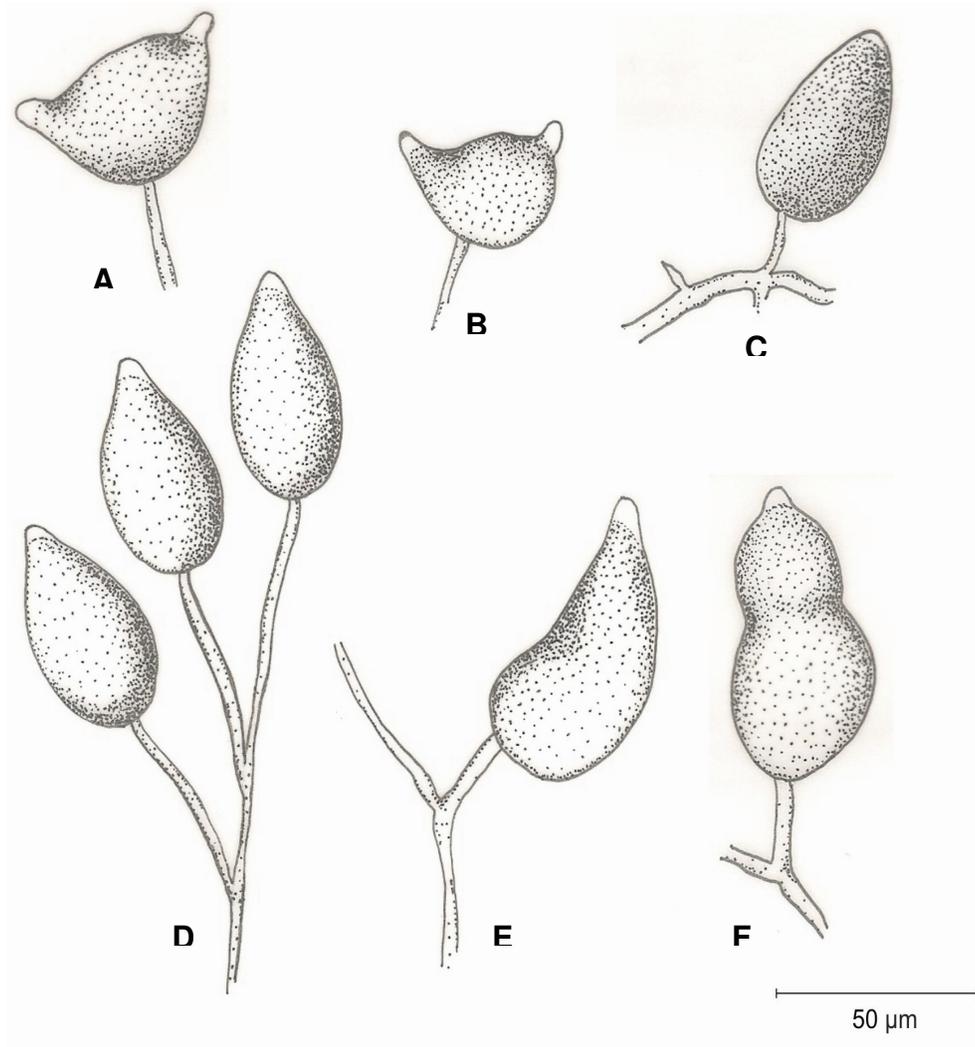


Fig. 4. *Phytophthora citrophthora*. A-B: esporângios bipapilados, C-F: esporângios unipapilados.

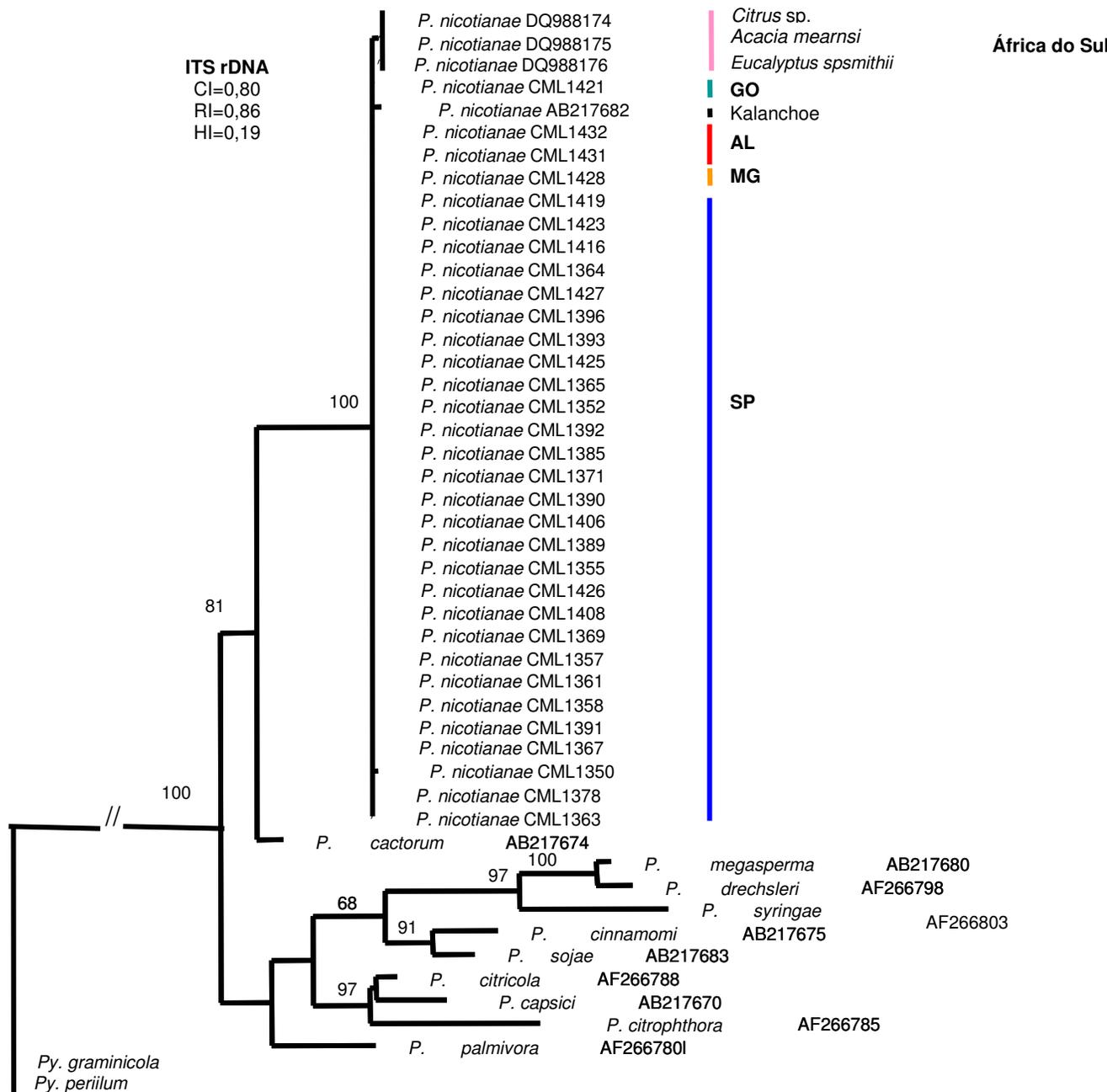


Fig. 5. Árvore filogenética de espécies de *Phytophthora* baseada na análise da região ITS rDNA.

