

MARILDA PEREIRA CAIXETA

**ESPÉCIES DE *Phytophthora* ASSOCIADAS À GOMOSE DOS CITROS
NO ESTADO DO PARANÁ**

**MARINGÁ - PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO – 2010**

MARILDA PEREIRA CAIXETA

**ESPÉCIES DE *Phytophthora* ASSOCIADAS À GOMOSE DOS CITROS
NO ESTADO DO PARANÁ**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Doutor.

**MARINGÁ - PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO – 2010**

Ao meu Pai (in memoria), pela história que construiu e pelo exemplo que deixou e tento seguir a cada dia.

À Mamãe, cheguei em sua vida transformando-a profunda e definitivamente. Com seu jeito mágico, iluminou meus caminhos, com sua generosidade, ensinou-me a arte de viver. A Senhora é tudo para mim, meu chão e meu céu.

Ao Papai e a Mamãe. A eles eu devo a educação que eu tive, a eles eu devo cada não que recebi e que permitiu que eu hoje, colhendo frutos disso, fosse uma pessoa digna, feliz e realizada, pessoal e profissionalmente. Eles sempre estiveram presentes em todos os momentos de minha vida, de alegria, de sucesso e de sofrimento. E continuam até hoje. Papai, em espírito, ao meu lado e Mamãe sempre em oração. Eu quero dizer para vocês obrigada pela educação e pelo amor, e que meu sonho de ser orgulho para vocês não parou por aqui...

Ao meu marido João Vida, por ter me apoiado sempre, estando ao meu lado com sua compreensão e seu amor, sem os quais este trabalho não teria chegado ao fim.

Aos meus irmãos: Itamar, Omar, Leomar, Pe. Edimar, Vanilda, Mônica, Ivani, Eleni, Delma, Ernestina e Dágma por serem pessoas tão importantes na construção de minha história, dividindo comigo suas vidas e nosso lar.

Aos meus cunhados, cunhadas, sobrinhos e sobrinhas, por ornamentarem ainda mais a minha família.

Dedico

“Celebrai com júbilo ao Senhor, todas as terras.
Servi ao Senhor com alegria; e entrai diante dele com canto.
Sabei que o Senhor é Deus; foi Ele que nos fez, e não nós;
Somos povo Seu e ovelhas de Seu pasto.
Entrai pelas portas D’Ele com louvor, e em Seus átrios com hino;
Louvai-o, e bendizei o Seu nome.
Porque o Senhor é bom, e eterna é a Sua misericórdia;
E a Sua verdade dura de geração em geração”.

“Salmo 100”

AGRADECIMENTOS

À Deus; a Ele atribuo toda a força, toda coragem, esperança e capacidade de superação que me foram concedidas em vários momentos durante a execução desse trabalho. Sinto que fui amparada em cada passo, em cada decisão que tive que tomar. Todos os caminhos percorridos foram abertos e iluminados pelo Espírito Santo de Deus;

À Mãe natureza, por permitir tão generosamente ser estudada, manipulada e investigada pelas mãos humanas;

Ao Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes, pela orientação, amizade, sugestão e colaboração neste trabalho;

Ao Dr. Álvaro Figueredo dos Santos, pesquisador da Embrapa Floresta, pelas orientações, acolhida, amizade, envio de material bibliográfico e incentivo na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Dauri José Tessmann, por auxiliar e orientar nas análises moleculares e bioinformática e por dividir comigo parte do seu conhecimento.

Ao meu marido João Vida, pela incrível capacidade de me entender, perceber e aceitar meus erros e corrigi-los, com paciência e carinho...

Ao Curso de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela oportunidade de realizar esse curso e pelos conhecimentos que me foram transmitidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Científico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e pelo apoio financeiro para aquisição de material para realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Fitopatologia, José Júnior, Mauro e Sônia, pelos momentos dedicados a auxiliar-me na condução dos experimentos e também pelas horas de longas conversas e descontração e mais pelo apoio em momentos de desânimo.

Aos colegas, parceiros e cúmplices do Laboratório de Fitopatologia: Antônio Augusto, Franciele, Tatiane, Claudia Scapim, Patrícia, Gabriela, Marinelva, Jéfferson a estagiária Lury que sempre me animaram nas horas difíceis, por acreditarem e torcerem por mim, o meu muito obrigada.

Ao colega Carlos Alexandre Zanuto, por sua inteira disponibilidade em viajar comigo e ajudar na coleta de amostras, obrigada de coração.

Aos colegas e amigos Marcos Rodovalho e Gilmar Frenzner, pela imprescindível ajuda nas análises estatísticas.

Ao amigo Ricardo Oliveira, que nunca mediu esforços para ajudar em qualquer dificuldade principalmente na formatação da tese.

Aos meus familiares, pelo carinho, apoio e incentivo nos momentos desafiantes e de incertezas.

A todos aqueles que, por onde eu passei e encontrei durante esses seis anos nessa Instituição (UEM), me ajudaram de uma forma ou de outra para realização deste trabalho, meu sincero e eterno reconhecimento.

BIOGRAFIA

MARILDA PEREIRA CAIXETA, filha de José Pereira Caixeta e Clarinda Marra Caixeta, nasceu em Patos de Minas, Minas Gerais, aos vinte dias do mês de novembro de 1959.

Graduou-se em Ciências Biológicas pela Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Patos de Minas – MG, em dezembro de 1989.

Participou do Curso de Pós-Graduação *Latu Sensu* pela Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Patrocínio – MG, em 1990.

Atuou como professora no ensino fundamental e médio na Rede Pública Estadual de Minas Gerais.

Em fevereiro de 2006 concluiu o curso de Pós-Graduação em Agronomia, na área de Proteção de Plantas, na Universidade Estadual de Maringá obtendo o título de Mestre em Agronomia.

Em Março de 2006, iniciou o curso de Pós-Graduação em Agronomia, em nível de Doutorado, área de concentração Proteção de Plantas, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos sobre disseminação de doenças de citros. No dia 30 de abril de 2009, submeteu-se à banca para exame de qualificação para defesa do doutorado.

ÍNDICE

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. A Citricultura no Paraná.....	4
2.2. Taxonomia e identificação de <i>Phytophthora</i> spp.....	5
2.3. O Gênero <i>Phytophthora</i>	8
2.4. Gomose em Citros.....	11
2.5. Etiologia da gomose.....	13
2.6. Espécies de <i>Phytophthora</i> em citros.....	15
2.6.1. <i>Phytophthora citrophthora</i>	17
2.6.2. <i>Phytophthora nicotianae</i> (sinon. <i>P. parasitica</i>).....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Caracterização morfofisiológica de Isolados-obtenção dos isolados em cultura pura.....	24
3.2. Teste de patogenicidade dos isolados.....	28
3.3. Avaliação do crescimento micelial.....	29
3.4. Avaliação da esporulação.....	30
3.4.1. Produção de esporângio.....	30
3.5. Produção de oósporos.....	31
3.6. Morfologia e dimensão dos esporângios e clamidósporos.....	32
3.7. Ontogenia dos esporângios.....	33
3.8. Morfologia do anterídio e dimensões do oogônio e oósporo.....	33
3.9. Caracterização molecular.....	33
3.9.1. Isolamento do DNA.....	33
3.9.2. Reação da polimerase em cadeia (PCR) e sequenciamento....	34
3.9.3. Análise dos resultados.....	35
3.9.4. SSCP (single-strand-coformation polymorphism).....	36
3.9.4.1. Gel de poliacrilamida - SSCP.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1. Obtenção dos isolados.....	39
4.2. Teste de patogenicidade.....	40
4.3. Efeito da temperatura no crescimento micelial.....	43
4.4. Características culturais e morfológicas de colônias.....	50
4.5. Avaliação da esporulação.....	52
4.6. Avaliação das estruturas reprodutivas.....	53

4.6.1. Morfologia e dimensão de esporângios e clamidósporos.....	53
4.6.2. Ontogenia dos esporângios.....	60
4.6.3. Compatibilidade de isolados de <i>Phytophthora</i> spp.....	63
4.6.4. Morfologia do anterídio e dimensões do oogônio e oósporo.....	64
4.7. Caracterização molecular.....	66
4.7.1. Reação da polimerase em cadeia (PCR).....	66
4.7.2. Análise do sequenciamento.....	70
4.7.3. Análise SSCP.....	73
5. CONCLUSÕES.....	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
APÊNDICES.....	90
APÊNDICE (A)	91
APÊNDICE (B)	102

RESUMO

CAIXETA, Marilda Pereira, D.S., Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2010. **Espécies de *Phytophthora* associadas à gomose dos citros no Estado do Paraná.** Orientador: Dr. William Mário de Carvalho Nunes. Co-Orientador: Dr. Álvaro Figueredo dos Santos.

A etiologia da gomose compreende um complexo de espécies de *Phytophthora*, sendo esta doença de grande importância para a citricultura, tanto para o Brasil, como a nível mundial. Embora também importante, pouco se conhece sobre a gomose nas regiões produtoras de citros no Estado do Paraná. Por isso, este trabalho teve como objetivo identificar as espécies de *Phytophthora* associadas à gomose nas regiões produtoras de citros no Paraná. Em pomares de laranja e tangerinas, nas regiões Vale do Ribeira e Norte deste Estado foram coletadas amostras de solo e raízes de plantas com sintomas de gomose. Usando frutos de pera, cv. D'Anjou, como isca, foram obtidos 21 isolados de *Phytophthora* spp. em cultura pura. Em teste de patogenicidade, por meio de inoculação artificial, todos esses isolados infectaram mudas de limão 'Cravo' e induziram sintomas de gomose. Todos os isolados apresentaram crescimento micelial a 36^o C, a exceção de um isolado (PR20). Todos os isolados apresentaram crescimento micelial a 8^o C. Todos os isolados foram heterotáticos, com 20 isolados apresentando compatibilidade com isolado do tipo padrão A2, resultando na formação de oósporo com anterídio anfígeno e um isolado (PR20) compatível com isolado do tipo padrão A1, resultando na formação de oósporos com anterídio anfígeno. Análises das características dos 21 isolados mostram que 20 isolados formaram esporângios persistentes e papilados, medindo 25,5 - 58,9 µm de comprimento por 18,6 - 49,6 µm de largura. A relação C/L foi de 1,3: 1, a profundidade média da papila foi de 6,1 µm e abertura média de 5,8 µm, ocorreu produção abundante de clamidósporos globosos de diâmetro variando entre 21,7 a 43,4 µm. Apresentaram crescimento micelial relativamente pequeno a 8 e 36^o C e temperatura ótima de crescimento entre 24 a 32^o C. O isolado (PR20) apresentou produção de esporângios medindo 40,3 - 65,8 µm de comprimento

por 27,9 - 37,2 µm de largura. Este isolado formou esporângios persistentes, papilados, formas distorcidas e bipapilados. Não apresentou crescimento micelial a 36° C, porém cresceu a 8° C com temperatura ótima de crescimento entre 20 a 28° C. Neste não ocorreu a formação de clamidósporo. De acordo com as características morfofisiológicas, comparando-as com aquelas descritas na bibliografia, 20 isolados foram identificados como pertencentes à espécie *Phytophthora nicotianae* e um isolado (PR20) pertencente à espécie *P. citrophthora*. A análise molecular dos 21 isolados, examinando as sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, empregando SSCP (single-strand conformation polymorphism) confirmou a identidade dessas duas espécies de *Phytophthora*.

Palavras-chave: *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora citrophthora*, doenças de citros.

ABSTRACT

CAIXETA, Marilda Pereira, D.S. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2010. ***Phytophthora* species associated with citrus gummosis in Paraná State.** Adviser: Dr. William Mário de Carvalho Nunes. Co-Adviser: Dr. Álvaro Figueredo dos Santos.

The etiology of gummosis comprises a complex of *Phytophthora* species, with significant effect on citrus culture in Brazil and worldwide. Not much is known about gummosis in citrus producing areas of the state of Paraná, although it is an important disease. Thus, the objective of this work was to identify species of *Phytophthora* associated with gummosis in citrus producing areas of Paraná. Samples of soil and roots from plants showing symptoms of gummosis were collected from orange and tangerine orchards in the Northern and Ribeira Valley regions of the state. Using fruits of pear cv. D'Anjou as bait, 21 isolates of *Phytophthora* spp. were obtained in pure culture. In a pathogenicity test using artificial inoculation, all isolates infected seedlings of *Citrus limonia* Osbeck and induced symptoms of gummosis. All isolates showed mycelial growth at 36° C, with the exception of a single isolate (PR20). All isolates showed mycelial growth at 8° C. All isolates were heterothallic; 20 isolates showed compatibility with the A2 type isolate, resulting in the formation of oospores with amphigynous antheridia, while one isolate (PR20) was compatible with the A1 type isolate, resulting in the formation of oospores with amphigynous antheridia. Analyses of the characteristics of the 21 isolates showed that: 20 isolates formed persistent and papillate sporangia, 25,5 – 58,9 µm long and 18,6 – 49,6 µm wide. Length-width ratio was 1,3:1, mean papilla depth was 6,1 µm, and mean opening was 5,8 µm; there was abundant production of spherical chlamydospores with diameter varying between 21,7 and 43,4 µm. They showed relatively modest mycelial growth at 8 and 36 °C and optimum growth temperature between 24 and 32° C. One isolate (PR20) featured sporangia 40,3 – 65,8 µm long by 27,9 – 37,2 µm wide. That isolate formed persistent sporangia, papillate, bipapillate, and in bizarre shapes. It did not show mycelial growth at 36° C, but did grow at 8° C, with optimum growth temperature

between 20 and 28° C. There was no formation of chlamydospore reproductive structure in that isolate. According to these morphophysiological traits, comparing them with those described in the bibliography, 20 isolates were classified as belonging to the species *Phytophthora nicotianae* and one isolate (PR20) as belonging to *P. citrophthora*. A molecular analysis of the 21 isolates, examining the sequences from region ITS1-5.8S-ITS2 of rDNA, employing SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism), confirmed the existence of these two species of *Phytophthora*.

Keywords: *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora citrophthora*, citrus diseases.

1. INTRODUÇÃO

A citricultura se constitui uma das mais importantes e competitivas atividades do agronegócio no Brasil, com o País sendo o maior produtor mundial de citros e líder na exportação de suco concentrado de laranja (NEVES et al., 2006). O Brasil, também, detém cerca de 40% da produção mundial de laranja, 60% da produção de suco de laranja e exportação equivalente a 1,47 bilhões de dólares, que representa uma fatia de 80% do mercado mundial (USDA, safra 2005/2006). Apesar das plantas cítricas serem cultivadas em todos os estados brasileiros, aproximadamente 92% da produção procede dos Estados da Bahia, Sergipe, Minas Gerais e, principalmente, São Paulo (DONADIO et al., 2005). A citricultura brasileira ocupa aproximadamente um milhão de hectares, sendo o Estado de São Paulo o maior produtor, onde se constitui uma das atividades rurais de maior importância econômica, sendo a principal atividade econômica de muitos municípios (FUNDECITRUS, 2007).

Assim, a inovação em pesquisa, em tecnologia e em logística está na base da eficiência e liderança do Brasil, com maior peso da cadeia se localizando no Estado de São Paulo (NEVES e LOPES, 2005). De acordo com o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) 2007, das 18.684.985 toneladas de laranja produzidas no Brasil em 2006, o Estado de São Paulo participou com 79,7%, tanto na produção, quanto no processamento da matéria prima para produção de suco concentrado.

Com relação à citricultura paranaense, implantada no Estado bem mais recentemente em relação à citricultura paulista, esta ocupa área de 27.137 ha, com produção de 502.979 toneladas em 2007 (IBGE 2007). Como não era uma atividade tradicional no Paraná, a citricultura foi implantada neste Estado empregando alta tecnologia, corrigindo alguns aspectos tecnológicos negativos da citricultura paulista. No Paraná, a citricultura está mais concentrada em duas regiões. Segundo Donadio et al. (2005), a região do Vale do Ribeira, destacando-se principalmente os municípios de Adrianópolis e Cerro Azul,

onde se cultiva basicamente as tangerinas 'Ponkan' e 'Montinegrina', vem sendo responsáveis por 28% da produção nacional, e a região Noroeste do Estado, com o cultivo predominante de laranjas, com destinação à produção de suco concentrado para exportação (TAZIMA et al., 2008).

Apesar da alta tecnologia empregada tanto na citricultura paulista, quanto da paranaense, ao longo da sua história, tem deparado, periodicamente com problemas envolvendo variáveis da cadeia produtiva, que tem sido motivo de preocupação tanto pelos citricultores, como também para pesquisadores. Problemas de ordem sanitária têm surgido ao longo dos anos, alguns mais graves, outros menos problemáticos, com soluções desenvolvidas em curto prazo. Fatores bióticos, como doenças causadas por fungos, vírus e bactérias dentre outros fitopatógenos, estão entre os principais fatores que têm afetado a produção crescente de citros. Segundo Feichtenberger e Spósito, (2004), entre as mais de 50 enfermidades fúngicas que podem acometer a citricultura brasileira, pode-se citar, como uma das mais importantes, a gomose causada por *Phytophthora* spp. Ainda de acordo com Feichtenberger (2005), esta doença tem causado elevados danos em algumas regiões do Estado de São Paulo.

No Estado do Paraná, em observações de campo em pomares de tangerinas na região do Vale do Ribeira, a gomose de *Phytophthora* tem constituído o principal problema sanitário, com incidência de até 40% em alguns deles e morte de até 16 % de plantas. Já na região Noroeste, onde a citricultura foi implantada bem mais recentemente e onde se cultiva basicamente laranjas doces, a incidência de gomose tem sido muito menor, em níveis ainda não preocupantes.

Espécies de *Phytophthora* têm sido identificadas empregando a metodologia clássica, que envolve o uso das suas características morfológicas das estruturas vegetativas e reprodutivas. Com o desenvolvimento da biologia molecular e o seu emprego na identificação e reorganização taxonômica de muitas espécies de micro-organismos, muitas dessas técnicas, como PCR (Polimerase Chain Reaction), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), SSCP (Single-Strand-Comformation Polymorfism) e SSC (Simple Sequence Repeats), têm se tornado de uso frequente na

identificação de espécies de *Phytophthora*. Essas técnicas apresentam grandes vantagens como rapidez, baixo custo e segurança. Dentre estas técnicas, a SSCP é bastante utilizada na identificação de espécies de *Phytophthora* por apresentar, além dessas vantagens, é de fácil aplicação.

Embora a gomose seja importante para a citricultura do Paraná, não têm sido realizados trabalhos sobre a doença, inclusive de etiologia para caracterização e identificação das espécies ocorrentes neste Estado.

Assim sendo, tendo em vista a atual situação da ocorrência dessa doença no Estado do Paraná, esse trabalho teve como objetivo:

- ▶ realizar a caracterização morfofisiológica dos isolados, visando a identificação de espécies. Para isso desenvolveu-se estudos de crescimento micelial sob diversas temperaturas e em meios de cultivo; realizou-se estudos de formação e caracterização de estruturas reprodutivas assexuadas (esporângios) e sexuadas (anterídio, oogônio e oósporo), ambos com finalidade de auxílio na classificação em nível de espécie dos isolados obtidos de *Phytophthora*;

- ▶ realizar a caracterização molecular dos isolados empregando a análise de rDNA-SSCP, visando a identificação de espécies e análises de seqüências de rDNA (regiões ITS1 e ITS2 e gene 5.8S) afim de obter a identificação de espécies mediante comparação de sequências de *Phytophthora* disponíveis no *Gen Bank* e a inferência de relações filogenéticas dos isolados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Citricultura no Paraná

Segundo Müller (1980), uma das maiores limitações para o ressurgimento da citricultura paranaense, a partir da década de 80, constituiu na necessidade de grande número de mudas para a instalação de pomares comerciais de laranjas nas regiões Norte, Noroeste e Oeste do Estado, anteriormente interditas ao plantio em decorrência do cancro cítrico. Esta doença foi responsável pelo impedimento de cultivo comercial de citros por três décadas nestas regiões, que, segundo Maremoto (1990), mais por fatores políticos do que técnicos. Em adição, Müller (1980) afirma que para contornar tal situação a citricultura paranaense lançou mão de material oriundo do Estado de São Paulo muitas vezes sem controle rígido da qualidade das mudas.

Dados apresentados pelo IBGE (2009), em levantamento sistemático da produção agrícola, a safra nacional de laranja colhida em 2009 foi de 18.331 mil toneladas (449,3 milhões de caixas de 40,8 kg) e o Estado do Paraná contribuiu com uma produção de 503.000 toneladas, correspondendo cerca de 12.328 caixas de 40,8kg, para uma área cultivada em torno de 20.000 ha de laranja. Quanto à produção de tangerina, esse levantamento aponta uma área plantada de 9.909 ha com uma produção anual de 249.811 toneladas. Esses números equivalem a 2,7% da produção brasileira, com um rendimento de 26.000 kg/ha, sendo essa produção 15% superior a média nacional, que coloca o Estado do Paraná como o quinto maior produtor de laranja dentre os Estados brasileiros.

Gusi et al. (1998) relatam que o cultivo de laranja passou a ter maior relevância no Paraná com a implantação do Plano Estadual de Citricultura, coordenado pela Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (SEAB), o qual resultou em significativo aumento da área cultivada e da produção nos últimos anos. Assim, a maior produção ocorreu na Região

Noroeste, eixo Maringá, Paranavaí e Umuarama, que representa 60% da área cultivada e 68% da produção paranaense.

Segundo dados do IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná) (ed. 2000), as regiões Norte, Noroeste e Oeste do Estado do Paraná apresentam as melhores condições de solo e clima para o cultivo de citros: clima subtropical, precipitação média anual de 1400 a 1800 mm e temperaturas médias anuais variando de 21 a 22°C na região Norte, de 22 a 23°C na região Noroeste e de 18 a 21°C na região Oeste, relevo suavemente ondulado, com predominância de latos solo roxo e terra roxa estruturada ou solos derivados do Arenito Caiuá na Região Noroeste do Estado. De acordo com Tazima et al. (2008), o cultivo da laranja é o que tem apresentado maior expansão, principalmente na região Noroeste com o cultivo predominante de laranjas (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) das cultivares 'Pêra', 'Folha Murcha', 'IAPAR 73' e 'Valência'. Vários fatores têm contribuído para esse aumento da área plantada, dentre os quais as condições edafoclimáticas favoráveis à citricultura, o estabelecimento de indústrias para o processamento de frutos visando à produção de suco concentrado congelado, preços remuneradores alcançados pelos produtores nas últimas safras e também o potencial de crescimento dos mercados internos e externos. Leite Jr. (1992) relata que a laranja 'Valência' é uma cultivar de grande importância econômica devido à alta produtividade e qualidade dos frutos, sendo plantada nas principais regiões produtoras de citros do mundo. Em adição, essa cultivar apresenta maturação tardia dos frutos e pode ser destinada tanto para o mercado interno como para o externo, atendendo ao consumo de fruta fresca e ao processamento industrial. Dados do IBGE (2007) apontam os municípios do Estado do Paraná que mais se destacaram na produção de citros concentra-se na região Noroeste como sendo os municípios de Paranavaí, Alto Paraná e Nova Esperança.

2.2. Taxonomia e identificação de *Phytophthora* spp.

Em geral, a identificação de micro-organismo é feita através da taxonomia clássica, baseando-se nas suas características morfofisiológicas. Em algumas situações têm existido dificuldades para a classificação de algumas espécies, como é o caso daquelas que apresentam reprodução

assexuada, ou quando apresentam pleomorfismo. Além disso, alguns aspectos morfológicos dificultam a identificação da espécie, de modo que a identificação clássica se torna pouco adequada. Apesar de que, atualmente, os critérios utilizados na taxonomia clássica de micro-organismos receberem críticas, esses ainda são utilizados na maioria dos estudos fitopatológicos. Estudos de caracterização morfofisiológica de micro-organismos são ainda importantes para estudos de distribuição espacial, para identificação de gênero, de espécies, de aspectos biológicos e ecológicos, dentre outros.

De acordo com Shurtleff e Averre III (1997), a identificação dos agentes causais de doenças de plantas envolve princípios científicos e tecnológicos, incluindo a biologia molecular, que devem estar associados aos conhecimentos sobre os hospedeiros e às práticas agrícolas empregadas.

Luz e Matsuoka (1996) estudando a taxonomia do gênero *Phytophthora*, apontaram que o maior problema para identificação de espécies são aqueles referentes às variações morfológicas das estruturas reprodutivas e vegetativas nas diferentes condições de cultivo ou de ambiente e às técnicas utilizadas para indução de formação de determinadas estruturas. Waterhouse (1963) elaborou uma chave taxonômica para classificar espécies de *Phytophthora* baseada em critérios morfológicos e fisiológicos, tais como a presença e tamanho de esporângios, de clamidósporos e de oósporos, natureza dos anterídios e a presença ou não de papilas nos esporângios. Segundo Luz e Matsuoka (1996), a partir de então seus trabalhos têm contribuído enormemente para que taxonomistas e fitopatologistas possam classificar e identificar espécies desse gênero.

A diagnose convencional de doenças tem levado em consideração, principalmente, a sintomatologia da doença. A grande dificuldade em usar sintomas para diagnosticar doenças de plantas reside no fato de que diferentes doenças podem apresentar quadro de sintomas semelhantes (DUARTE BOA, 2005). Métodos mais sofisticados, com maior sensibilidade, como PCR (Polimerase Chain Reaction), associados à sintomatologia tornam a diagnose mais completa e confiável.

Devido às vantagens, esta técnica tem sido exaustivamente empregada no diagnóstico e caracterização de vírus e viróides (HUANG et al., 2004; UGA

et al., 2005; DU et al., 2006), bactérias (NUNES et al., 2004; CUBERO, GRAHAM, 2005) e fungos fitopatogênicos (MATSUDA et al., 2005).

O desenvolvimento de métodos moleculares permitiu o estudo das relações filogenéticas tanto dentro do gênero *Phytophthora* quanto deste com outros organismos. Várias técnicas como padrões de proteínas totais, isoenzimas, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), SSPC (Single-Strand-Conformation Polymorfism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats) e análises de sequências da região ITS do DNA ribossômico (rDNA) e de outros genes nucleares e mitocondriais têm sido úteis para determinar diferenças genéticas ou semelhanças entre as espécies. Estas técnicas, mas principalmente a análise de sequência de DNA, combinadas com dados morfológicos, subsidiaram a solução de diversos problemas na sistemática do gênero (SOUZA et al, 2007).

A região ITS (internal transcribed spacer) é a mais sequenciada em oomicetos do gênero *Phytophthora* devido ao elevado nível de variações, maior que das regiões SSU ("Small Subunit") e LSU ("Large Subunit") do rDNA. O grau de variabilidade nas sequências de rDNA pode ser usado na classificação específica e subespecífica (PALLOIX et al., 1988; LEE e TAYLOR, 1992; LEE et al., 1993; FOSTER et al., 2000; ZHANG et al., 2004).

Segundo Martim e Tooley (2003), o avanço do emprego de técnicas moleculares nos últimos anos, na taxonomia do gênero *Phytophthora*, apresentou novos procedimentos e informações sobre a caracterização e identificação de espécies ou grupos nesse gênero, bem como o estudo das relações filogenéticas.

Para Fedorka et al. (2001), a análise SSCP é uma busca rápida e sensível para caracterizar sequências de DNA. Além disso, o autor afirma que, desde sua descrição, ele tem sido usado com êxito para detectar várias alterações nas sequências de base do DNA incluindo substituições, deleções, inserções e redistribuição. Produtos de PCR são agora rotineiramente usados para análises SSCP (PCR-SSCP). A técnica do SSCP foi inicialmente desenvolvida para examinar pontos de mutações no DNA humano. Mutação em DNA de fita simples tem sido estudada por esta técnica, desenvolvida por Orita et al. (1989).

O método tem sido ampliado para detecção de mutações em microorganismos que resultam em resistência antimicrobiana, podendo também ser utilizado como marcador molecular em estudos epidemiológicos de bactérias, fungos e vírus (KERR e CURRAM (1996); SEKIYA, (1993); SLAUBAUGH et al. (1997). Os autores também afirmaram que o método SSCP foi considerado um método rápido, sensível e barato para detectar variações de sequências. Desde então, tem sido estendido para estudar variabilidade de patógenos de plantas, incluindo viroses (KONG et al, 2000), nematóides (CLAPP et al., 2000) e fungos (MORICCA et al., 2000).

Assim, segundo Sousa et al. (2001) a técnica baseia-se no fato de que o DNA dupla fita, quando desnaturado, migra como dois fragmentos de DNA fita simples em eletroforese com gel de poliacrilamida não desnaturante. Essa migração das duas fitas depende da sequência de nucleotídeos e da conformação adquirida nas condições de eletroforese. Por isso, procede-se a desnaturação das amostras de DNA para se obter a cadeia simples. Fragmentos do mesmo comprimento (número de bases) podem assumir diferentes conformações devido as mutações pontuais em suas sequências. Baseia-se no fato de que as diferenças em um único nucleotídeo são suficientes para que a cadeia simples de DNA adquira uma conformação diferente. A grande vantagem dessa ferramenta é a possibilidade de uma rápida varredura em busca dos polimorfismos na região estudada em questão e os baixos custos e a simplicidade dos equipamentos necessários para sua geração.

2.3. O Gênero *Phytophthora*

O gênero *Phytophthora*, do Grego *Phyton* = planta e *phthora* = destruidor (destruidor de plantas), foi estabelecido por Anton De Bary em 1876, pertence ao Reino Straminipila, filo Oomicota, classe Oomycetes, ordem Pythiales e família Pythiaceae. O gênero *Phytophthora*, até pouco tempo, estava classificado dentro do reino Fungi, reino dos fungos verdadeiros. No entanto, *Phytophthora* e outros oomicetos apresentam características que são relativamente incomuns em outros tipos de fungos (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Esses autores afirmam também que os Oomycetes constituem um grupo de

organismos do tipo fungo que atualmente pertencem ao Reino Straminipila, por serem filogeneticamente distantes dos fungos verdadeiros. Segundo Cvitanich e Judelson (2003), grande parte dos Oomycetes patogênicos de plantas pertence aos gêneros *Pythium* e *Phytophthora*.

O gênero *Phytophthora* está amplamente distribuído em todas as áreas geográficas do mundo e segundo Luz e Matsuoka (2001), é comum o assinalamento de novos hospedeiros para as espécies existentes, principalmente entre plantas nativas ou a observação de novas doenças causadas por este patógeno em plantas cultivadas. Ainda segundo estes autores, as espécies de *Phytophthora*, em sua maioria, são fitopatogênicas e, muitas delas, bastante destrutivas às culturas de importância econômica. Embora as espécies de *Phytophthora* sejam importantes patógenos da parte aérea, são, também, patógenos habitantes de solo, atacando as raízes e o coleto de plantas de inúmeras culturas que elas têm se notabilizado.

Desde a descrição do gênero *Phytophthora*, as características morfológicas têm constituído os componentes principais das chaves existentes para classificar as espécies desse gênero, ainda que existam dúvidas sobre o mérito de alguns caracteres utilizados na taxonomia. A partir de 1960, com os trabalhos de Waterhouse (1963; 1970a, 1970b e 1983), surgiu o sistema que até hoje é utilizado por inúmeros micologistas e fitopatologistas no mundo inteiro para identificação de muitas espécies de *Phytophthora* com confiabilidade (BRASIER, 1991). O crescimento micelial em altas temperaturas é um caráter fisiológico que tem sido muito usado para auxiliar na classificação de espécies de *Phytophthora* que apresentam taxa de crescimento sob altas temperaturas. Para espécies que são morfológicamente semelhantes, diferenças nas taxas de crescimento micelial sob determinada temperatura pode auxiliar na sua separação (ERWIN e RIBEIRO, 1996).

As características morfológicas empregadas na taxonomia tradicional são dimensão e estrutura do esporângio (papilado, não-papilado e semi-papilado), a disposição do anterídio (anfígeno ou parágino) e o modo de reprodução (homotáticas ou heterotáticas). Estes ainda continuam sendo o ponto de partida para classificação de *Phytophthora*, havendo, hoje, mais de 80 espécies descritas, com 48 consideradas válidas. Pesquisas para reclassificação ou constatação de novas espécies têm sido desenvolvidas

ininterruptamente (ANN e KO, 1994; BRASIER et al., 1993 e 1995; KENNEDY e DUNCAN, 1995). Para Briand (1995), o gênero *Phytophthora* abrange patógenos destrutivos a inúmeras espécies de plantas em todo mundo.

Segundo Chen e Hoy (1993), Hardhan et al. (1994), com o avanço tecnológico, outros critérios taxonômicos mais estáveis têm sido procurados para a família *Pythiaceae*. O papel das técnicas moleculares em complementação àqueles de evidência ótica tem sido enfatizado nas últimas décadas. Pesquisas nos aspectos bioquímicos e citológicos visando à taxonomia de *Phytophthora* têm se estendido amplamente, com importantes aplicações, onde eventualmente possam resultar em novo tipo de chave (STAMPS et al., 1990). A combinação entre a taxonomia derivada de análises moleculares e a taxonomia clássica baseada na morfologia é tópico de grande interesse para os estudos atuais (MARTIM e TOOLEY, 2003).

As técnicas moleculares vêm se tornando de grande auxílio na taxonomia, através de sequenciamento de regiões conservadas, como aquelas presentes nos nucleotídeos das regiões internas transcritas (ITS1 e ITS2) dos genes ribossomais (rDNA), e já foram utilizadas anteriormente na taxonomia de *Phytophthora* (LEE e TAYLOR, 1992). Segundo Cooke et al. (2000), citados por ROSA et al. (2006), a região ITS1-5.8S-ITS2 também tem sido utilizada para fins de filogenia por ser conservada entre as espécies e com baixas variações entre o gênero. Nesse sentido, Jung et al., (2003) relataram que as sequências desta região têm sido muito utilizadas na detecção e identificação de novas espécies de *Phytophthora* e outros Oomycotas, como *Pythium*.

O gênero *Phytophthora* possui como características micélio diplóide, cenocítico com nenhum ou poucos septos (ERWIN e RIBEIRO, 1996), podendo produzir esporos sexual e assexual, além de clamidósporos. O esporo assexual chamado de esporângio emerge diretamente das hifas através de estruturas conhecidas como esporangióforos, os quais, sob condições ótimas de temperatura e umidade, liberam os zoósporos biflagelados (KAMOUN, 2000).

Para Erwin e Ribeiro (1996), algumas espécies de *Phytophthora* possuem a habilidade para se reproduzir por meio de esporângios e zoósporos. Isto é considerada a razão principal pelas quais certas doenças incitadas por este patógeno serem epidemiologicamente mais explosivas sob condições ambientais apropriadas. Segundo Feichtenberger (2001), para espécies de

Phytophthora associadas à gomose em citros, a formação dessas estruturas sempre ocorre na superfície do solo, ou de órgãos afetados, pois a aeração é essencial para sua formação e que a presença de água livre é fundamental para a produção e liberação de zoósporos.

Algumas espécies de *Phytophthora* são autoférteis, sendo chamadas homotáticas, enquanto outras são auto-estéreis ou heterotáticas (KAMOUN, 2000). Seus esporos sexuais, os oósporos, são formados quando um oogônio (gametângio feminino) é fertilizado pelo anterídio (gametângio masculino) (SMITH, 2007). O autor também afirma que na fertilização ocorrem sucessivas meioses e cariogamia, sendo o esporo resultante denominado oósporo. Para ERWIN e RIBEIRO (1996), um único esporo sexual se forma dentro do oogônio após a fertilização pelos núcleos do anterídio.

2.4. Gomose em Citros

Segundo Rossetti (2001), a doença se manifesta produzindo o que se chama comumente “gomose” de *Phytophthora*, isto é, a presença de goma que exsuda da região infectada do tronco da planta. A gomose é a doença fúngica mais grave dos pomares de citros e ocorre em todas as regiões produtoras de citros do globo. Para Davis (1988) e Santos Filho (1991), os sintomas resultantes da infecção são lesões na casca da base da planta, raízes e galhos baixos com exsudação de goma pelo fendilhamento da casca. Pode ser observada na parte interna da casca, uma coloração pardacenta que, com o progresso da doença, os tecidos apodrecem e, quando a lesão envolve toda a circunferência do troco, a planta morre rapidamente.

Feichtenberger et al. (1997) relataram que, em citros, *Phytophthora* spp. colonizam o tronco das plantas em direção aos tecidos do câmbio, necrosando-os. Se a lesão paralisa a expansão, forma-se tecido de cicatrização na região da lesão, originando calo na superfície do tronco. Nas situações mais graves da sintomatologia pode ocorrer anelamento de uma região do tronco, provocando podridão nas raízes e sintomas reflexos na copa. Normalmente, os sintomas evoluem lentamente; no entanto, árvores não tratadas podem apresentar morte de ponteiros, amarelecimento e definhamento progressivo da copa e desfolha até a sua morte

No Brasil, segundo Feichtenberger (2001), a gomose constitui-se numa das principais doenças da cultura dos citros, principalmente em pomares novos, e a importância da doença aumentou após o aparecimento da tristeza. A tristeza inviabilizou o uso do porta-enxerto de laranja Azeda, predominante até a década de 40 no País, e tido como moderadamente resistente à *Phytophthora*. Em adição, o autor relata que sua incidência em pomares recém-implantados é muito elevada, devido, principalmente, ao generalizado uso de mudas contaminadas. Das várias manifestações da doença, a podridão do pé e as podridões de raízes e radículas são as mais comuns e as mais importantes nas condições do Brasil. No campo, os principais sintomas observados são escurecimento e morte da casca e do lenho, exsudação de goma, seca e fendilhamento da casca, podridão do pé e das raízes, amarelecimento e queda das folhas, baixo desenvolvimento, murcha, queda das folhas e morte da planta.

Neste sentido, Medina Filho et al. (2003) também relatam que a laranja azeda, considerada resistente à *Phytophthora* spp., era o porta-enxerto mais utilizado no Brasil até a década de 1940. Com o aparecimento do CTV (Citrus Tristeza Virus), esta foi substituída pelo limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck), constituindo-se no principal porta-enxerto da citricultura brasileira. O limão 'Cravo' é menos tolerante à infecção por *Phytophthora* spp., o que tem causado aumento considerável na incidência e na severidade dos danos causados por esses patógenos.

Relatos da FUNDECITRUS (2006) mostram que a doença continua em expansão no Estado de São Paulo devido à utilização de mudas produzidas em viveiros contaminados por esses fungos. Nos Estados Unidos, as perdas por incidência de gomose nos pomares têm gerado prejuízos na produção da ordem de 76 milhões de dólares anuais (STEDDOM et al.; 2002).

Rossetti (2001) e Silva et al. (2008) observaram que o ataque do fungo pode ocorrer em radículas, em viveiros e em pomares e pode passar despercebido. Segundo os autores, a doença é mais grave quando atinge as raízes principais, podendo interromper o fluxo de seiva elaborada para as raízes, ou a região do colo, provocando lesões 20 a 30 cm abaixo e acima do solo, que também são portas de entrada para fungos através dos ferimentos, podendo provocar a morte da planta. Ainda segundo Silva et al., (2008) quando

todo o diâmetro do tronco é atingido pelo patógeno, a planta morre por estrangulamento devido ao ataque do cambio ou floema, que interrompe o fluxo descendente de seiva.

Na sementeira, esses fungos causam o “tombamento” ou “damping off” atacando as plântulas e afetando os tecidos da região do colo, onde surgem lesões deprimidas e de coloração escura, que crescem e provocam a morte (DAVIES, 1988; SANTOS FILHO 1991; FUNDECITRUS, 2006).

2.5. Etiologia da gomose

Com relação à etiologia, a gomose representa um complexo de doenças que podem ocorrer nos citros, provocadas por diferentes espécies do gênero *Phytophthora*. Em nível mundial, são citadas 12 espécies de *Phytophthora* ocorrendo em citros, mas no Brasil *Phytophthora nicotianae* e *P. citrophthora* são as mais encontradas em pomares e viveiros (LARANJEIRA, 2005). Para esse complexo de doenças, gomose constitui-se no principal sintoma que ocorre no campo: caracteriza-se pela morte de tecidos da casca e internos do lenho, evoluindo para fendilhamento e com frequente exsudação de goma. Num estágio mais avançado da doença pode ocorrer a podridão de raízes e radículas e, geralmente, resulta em morte da planta (TIMER et al., 2000).

A gomose tornou-se doença importante para citricultura no Brasil após substituição do porta-enxerto laranja ‘Azeda’, suscetível ao vírus da tristeza, pelo limoeiro ‘Cravo’ susceptível à *Phytophthora*. Estima-se que 90% dos pomares brasileiros foram formados com plantas enxertadas com este porta-enxerto (LARANJEIRA, 2005). Com a troca de porta-enxerto, a gomose se espalhou para as principais regiões produtoras de citros. Segundo Feichtenberger (2001), as copas e os porta-enxertos de citros apresentam grandes variações em sua suscetibilidade às infecções por espécies de *Phytophthora*. Em árvores formadas sobre porta-enxertos suscetíveis são comuns as podridões na base do tronco, no colo e nas raízes principais, logo abaixo do nível do solo. Com sintoma secundário nos tecidos lesionados, geralmente ocorrem morte e escurecimento das camadas internas do lenho devido a sua colonização por organismos secundários, como bactérias,

leveduras, fungos dos gêneros *Diplodia*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Chaetomium* e outros.

Segundo Teixeira (2005), *Phytophthora*, devido as suas características, se constitui num patógeno potencialmente destrutivo e epidêmico na citricultura, especialmente *Phytophthora nicotianae*, que forma estruturas telemórficas (sexuais), podendo ocorrer “*mating types*”, e estruturas capazes de resistirem às condições adversas de temperatura e seca, presentes nos viveiros e no campo durante diversos períodos do ano.

Condições de altas temperaturas, umidade relativa do ar e alta umidade do solo são favoráveis ao desenvolvimento da gomose. Práticas culturais realizadas de forma inadequada, que resultem em redução de aeração no solo, redução de drenagem e excesso de irrigação, além da presença de outros patógenos como vírus, estado de vegetação da planta e cultivar copa, podem favorecer seu desenvolvimento (SIVIERO, 2001).

Diante dos relatos de pesquisas realizadas em citros no Brasil, *P. citrophthora* e *P. nicotianae* são os principais agentes causais da gomose, sendo *P. nicotianae* a espécie predominante em áreas subtropicais do globo, incitando doenças em todos os órgãos da planta, porém com maior frequência, em raízes, radículas, colo e tronco. *P. palmivora* também já foi encontrada no Brasil raras vezes infectando plantas em viveiros e pomares comerciais.

Descrevendo sobre essas três espécies, *P. citrophthora*, *P. nicotianae* e *P. palmivora* de ocorrência mais frequente na citricultura brasileira Feichtenberger et al. (2005) relataram que o micélio de *Phytophthora* é hialino e cenocítico; os esporângios dessas espécies são papilados com formato geralmente globoso e se formam nas extremidades das hifas, sendo que cada um pode produzir até 50 zoósporos no seu interior; a temperatura ótima para o crescimento micelial é de 27 a 32°C para *P. nicotianae*, de 27,5 a 30°C para *P. palmivora* e de 24 a 28°C para *P. citrophthora*. e a presença de água livre é essencial para a produção e liberação de zoósporos. Segundo os mesmos autores, com o início da estação chuvosa do ano, micélio dormente, clamidósporos e oósporos presentes no solo, ou em tecidos da planta previamente infectados, podem germinar, formar esporângios, que podem germinar indiretamente e produzir grande número de zoósporos, reiniciando assim o ciclo da doença.

Os esporângios de *P. nicotianae* apresentam forma ovóide ou piriforme com comprimento variando de 27 a 60 µm (média de 43,4 µm) e largura 18,7 a 40 µm (média de 31,2 µm), sendo a relação média comprimento/largura de 1,4:1 e abertura do poro apical de 3,1 a 10,4 µm (média de 6,0 µm). Os esporângios de *P. citrophthora* são mais alongados, apresentam formas variadas ou distorcidas com comprimento de 29 a 110 µm (média de 54,8 µm) e largura de 21 a 64 µm (média de 34,6 µm). Nessa espécie, a relação média comprimento/largura é de 1,6:1 e a abertura do poro apical é de 4,2 a 12,4 µm (média de 7,4 µm), Feichtenberger et al., (2005).

Phytophthora spp. pode causar doenças nos frutos, folhagens, copas e raízes de espécies como citros, pimenta, eucalipto, cacau, fumo, batata, soja, morango, entre outras. O rápido crescimento de doenças causadas por *Phytophthora* spp. é proporcionado pela rápida produção de esporângios e zoósporos em tecidos de plantas infectadas, quando as condições ambientais são favoráveis. Dessas condições, a mais importante é o excesso de umidade (ERWIN e RIBEIRO, 1996)

Segundo Costa (2007), as espécies de *Phytophthora* podem sobreviver por alguns anos no solo na forma de micélio, esporângio, cistos, clamidósporos e oósporos. Os zoósporos produzidos sobre os tecidos doentes necessitam de água livre para se locomoverem e infectar a planta. Portanto, umidade elevada do solo, assim como temperatura entre 21 a 30° C, são fatores que favorecem o desenvolvimento da doença.

2.6. Espécies de *Phytophthora* em citros

Como patógeno de citros já foram relatadas as espécies *P. boehmeria*, *P. cactorum*, *P. capsici* (somente em plantas inoculadas artificialmente), *P. citrophthora*, *P. citricola*, *P. cinnamomi*, *P. drechsleri*, *P. hibernales*, *P. megasperma*, *P. nicotianae* (sinom. *P. parasitica*), *P. palmivora* e *P. syringae* (Feichtenberger et al., 2005). Essas espécies estão amplamente distribuídas mundialmente em pomares de citros e em outras plantas hospedeiras de alto valor econômico. Algumas são mais freqüentemente encontradas e causando danos mais severos do que outras.

Segundo Gallegly e Hong (2008), *P. boehmeriae* possui limitada gama de hospedeiros, causando podridão marrom em frutos de citros na China, Argentina, Austrália e Grécia.

P. cactorum foi primeiro relatada por Lebert e Cohn (1970), sendo mais comumente encontrada em regiões temperadas, causando podridões em raízes e frutos, requeima em folhas e plântulas.

Lopes e Ávila (2003) relataram que *P. capsici* apresenta várias hospedeiras, sendo a maioria delas pertencentes às famílias solanaceae e cucurbitaceae. Feichtenbeger (2001) relata que *P. capsici* infectou citros somente através de inoculação artificial.

Segundo Gallegly e Hong (2008), *P. cinnamomi* var. *cinnamomi* é patogênico, causando elevados danos, como apodrecimento de raízes em várias espécies de plantas, como abacaxi, cipreste, eucalipto, aveia e outras árvores florestais, e nos Estados Unidos, constitui o principal patógeno para a cultura do abacate. Segundo os autores, *P. citricola* constitui um complexo de espécies, abrangendo três espécies distintas, hoje classificadas como *P. citricola* I, *P. citricola* II e *P. citricola* III, cujas diferenças estão nas características do oósporo.

A espécie *P. drechsleri* está incluída no VI grupo (Stamps, 1990), possuindo extensa gama de hospedeiros, incluindo aproximadamente 40 famílias de plantas. Esta espécie é um patógeno, principalmente, de raízes, mas alguns isolados infectam também frutos, como melão e pepino, causando podridão e possui características morfológicas similares a *P. cryptogea*.

Com relação a *P. hibernales*, o patógeno tem sido relatado na Europa, América do Sul, Nova Zelândia, Estados Unidos e Austrália, infectando frutos de citros, e de acordo com Holiday (1980), ocasionalmente em folhas durante as estações frescas do ano.

P. megasperma é considerada como um complexo de espécies (*P. megasperma* I, II e III), sendo que as principais diferenças entre elas residem no tamanho e na forma das estruturas reprodutivas (Gallegly e Hong, 2008).

P. palmivora, segundo Erwin e Ribeiro (1996), é um patógeno de distribuição mundial em citros, coqueiros e várias outras plantas. Associadas

à citros, a espécie já foi relatada na Índia, Estados Unidos, Tailândia, Malásia, Argentina e Brasil.

P. syringae foi colocada no grupo III por Stamps (1990) e descrita como patógeno causador de podridão de frutos, raízes e gomose. Nessa espécie não tem sido relatado a presença de clamidósporos.

P. citrophthora e *P. nicotianae* são as espécies de maior ocorrência no Brasil, principalmente esta, a qual representa cerca de 90% dos relatos (FEICHTENBERGER, 2001).

2.6.1. *Phytophthora citrophthora*

As sinónimas de *Phytophthora citrophthora* incluem *Pythiacystis citrophthora* Smith e Smith (1906) e *P. imperfecta* var. *citrophthora* (Smith e Smith) Sarejanni (1936). Segundo Guiscafré (1932), *P. citrophthora* foi primeiramente isolada por Smith e Smith em 1906 de árvores e de frutos de limão na Califórnia (USA) e nomeada *Pythiacystis citrophthora* por Smith e Smith em 1906, que posteriormente foi transferido para o gênero *Phytophthora* (LEONIAN, 1925). Desde então, foi reconhecida não apenas como o mais importante patógeno de citros, causando podridão do coleto, gomose, podridão das raízes fibrosas e podridão marrom de frutos, bem como de várias outras culturas (Erwin e Ribeiro, 1996). Doenças similares em espécies de citros são causadas por *P. nicotianae* (= *P. parsitica*) (KLOTS, 1978).

De acordo com estudos realizados por Gallegly e Hong (2008), quanto à compatibilidade, *P. citrophthora* é considerado como heterotática, isto é, organismo que para reproduzir-se sexualmente e completar o ciclo de vida necessita que haja a conjugação de dois talos compatíveis, masculino e feminino com micélios fisiologicamente distintos, sendo que os dois tipos compatíveis foram encontrados dentro da espécie. O oogônio mede 35,0 µm de diâmetro e o oósporo é do tipo plerótico com 33,0 µm de diâmetro. O anterídio é anfígeno, com aproximadamente 17,0 µm perpendicular à parede oogonal e 15,0 µm tangencial a este. Os esporângios são muito variáveis na forma, de ovóide para obpiriforme para elipsóide, com a base arredondada ou afunilada. São papilados, persistentes e não caducos, medindo 37 a 65 x 24 a 38 µm (média 50 x 34 µm). Formas bizarras ocorrem com papilas múltiplas e a

junção do pedicelo é descentrada. Os clamidósporos e hifas ramificadas têm sido relatados quanto à ocorrência em alguns isolados. A temperatura máxima de crescimento das colônias é de aproximadamente 32°C, sendo a mínima de < 5°C e a ótima entre 24 a 28°C.

Vial et al. (2006), em trabalhos de caracterização morfofisiológica de isolados estéreis observaram esporângios papilados, persistentes com formas ovóides, obpiriformes, limoniformes ou distorcidas com um ou dois ápices, medindo $46,5 \pm 8,6 \times 29,9 \pm 4,3 \mu\text{m}$, sendo $1,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$ a relação C/L. Para os isolados estéreis, foram observados esporângios persistentes, papilados para semi-papilados, ovóides, obpiriformes ou distorcidos com um ou dois ápice medindo de $53,5 \pm 12,7 \times 31,9 \pm 5,8 \mu\text{m}$ e $1,7 \pm 0,4 \mu\text{m}$ a relação C/L. Oósporos apleróticos foram produzidos apenas quando pareados com *P. cinnamomi* A2. Em ambos os tipos não foram observados crescimento micelial a 35°C.

A espécie *P. citrophthora* é o mais importante patógeno desse gênero. Podridão da raiz e podridão de copa, gomose, requeima da inflorescência, podridão de frutos, cancro no caule e requeima das folhas estão entre os sintomas das doenças causadas pelo patógeno, que pode infectar mais de 80 espécies de plantas (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Nos Estados Unidos, *P. citrophthora* é de grande importância para citros e no mundo todo, é muito destrutiva em plantas ornamentais.

P. citrophthora está associada às doenças em citros em todo o mundo, podendo causar grandes danos. No Brasil, além dos citros, também pode infectar cacau, sendo nesta hospedeira, a mais patogênica dentre as espécies que ocorrem no País. Análises de seqüência de DNA revelaram que os isolados de *P. citrophthora* originados de cacau e de citros são mais distantes filogeneticamente entre si, do que de uma outra espécie desse gênero, como *P. capsici* (PAIM et al., 2005).

Em Porto Rico, desenvolvendo estudos sobre a podridão marrom em citros causada por *Phytophthora (Pythiacystis)*, Guiscafré (1932) descreveu os principais sintomas, hospedeiros susceptíveis e resistentes. O autor relatou que laranja azeda (*Citrus aurantium*) foi a espécie de *Citrus* mais resistente e o limão comum (*C. lemonum*) foi a espécie mais susceptível. Avaliando resistência varietal a isolados de *Phytophthora* sp. originados de Kiffutz Givat, Brener e Israel (AFEK e SZTEJNBERG (1990) observaram que, dos 32 híbridos (*P.*

trifoliata x 'poorman orange') testados, 14 híbridos foram resistentes, 8 foram moderadamente resistentes e 10 foram susceptíveis. No Arizona (USA), Matheron (1998), realizando testes de variações de susceptibilidade na colonização de tecidos do floema em citros por *P. citrophthora* e *P. nicotianae*, em quatro porta-enxertos e duas cultivares, observou flutuações temporais na colonização de porta-enxertos em tecidos de galhos pelas duas espécies estudadas. Verniere et al. (2004) realizando estudos de patogenicidade de 35 isolados de *P. citrophthora* originados da Região Mediterrânea, constataram que todos eles foram patogênicos a 20 diferentes espécies de *Citrus*. No entanto, houve grande variação na virulência entre os isolados. Nesse estudo, os autores obtiveram isolados de 17 localidades do Leste da Córnia. Entre as espécies de *Phytophthora* que causam doenças em citros, *P. citrophthora* é a mais destrutiva e predominante em importantes regiões produtoras de citros da bacia do Mediterrâneo estando presente na Córnia Oriental.

Thomidis et al. (2005) estudaram a susceptibilidade de diferentes porta-enxertos a vários isolados de *P. citrophthora*, *P. nicotianae*, *P. cactorum* e *P. citricola*. Todos os experimentos foram conduzidos de maio a junho e de setembro a outubro de 2004 na Grécia. Foi observado que os isolados de *P. nicotianae* foram mais virulentos e que a susceptibilidade dos porta-enxertos diferiram de um isolado para outro. Observaram também que o porta-enxerto Swingle citrumelo foi o mais resistente.

Vial et al. (2006) caracterizaram 27 isolados de *Phytophthora* spp. associadas à podridão de pé e raízes de citros no Chile de amostras coletadas durante os anos 2003 e 2004. Desses, 20 isolados foram identificados morfológicamente como *P. citrophthora*, com 11 isolados estéreis e nove isolados férteis. Com base na análise da amplificação da região ITS do rDNA, sete isolados foram identificados como pertencente a uma nova espécie: *P. inudata*, sendo que estes demonstraram baixa virulência em plantas cítricas.

Naqvi (2006) realizou levantamento da distribuição, incidência da doença e seus meting types de espécies de *Phytophthora* patogênicas a citros na região central da Índia. Os resultados mostraram que *P. citrophthora*, *P. nicotianae* e *P. palmivora* estão disseminadas em viveiros e pomares desta região, causando severo declínio e morte de plantas de laranja doce (*C. sinensis*) e lima ácida (*C. aurantifolia*) consideradas como altamente

susceptíveis ao patógeno. Foi também observado a ocorrência de ambos os *mating types* A1 e A2 devido a hibridização natural e a evolução de novas raças do patógeno.

Alvarez et al. (2008) observaram danos consideráveis na produção de citros na Espanha. Em levantamentos de *Phytophthora* spp., em 132 pomares de citros, empregando características do perfil da morfologia, fisiologia, testes moleculares e características culturais. Alvarez et al. (2008) identificaram a presença de *P. citrophthora* em 114 pomares, *P. nicotianae* em nove pomares e em apenas um pomar foi encontrado *P. citricola*.

2.6.2. *Phytophthora nicotianae* (sinon. *P. parasitica*)

De acordo com Waterhouse (1956), citado por Erwin e Ribeiro (1996), estão incluídas como sinonímias dessa espécie: *P. melogenae* SAWADA (1915), *P. allii* Sawada (1915), *P. terrestris* (*P. terrestria*) Sherbakoff (1917), *Blephaspora terrestris* Sherbakoff Peyronel (1920), *P. parasitica* var. *rhei* Godfrey (1923) , *P. jatrophae*, *P. tabaci* Sawada (1927), *P. parasitica* var. *piperina* Dastur (1913), *P. formosana* Sawada (1942), *P. lycopersici* Sawada (1942), *P. ricini* Sawada (1942) e *P. parasitica* var. *sesami* Kale e Prasad (1957). Erwin e Ribeiro (1996) citam que Waterhouse (1963 e 1974) descreveram as variedades *nicotianae* e *parasitica* a partir de *P. parasitica*, mas que essas são de pouca aceitação. Acrescente-se ainda que nome *P. parasitica* é mais aceito em relação à *P. nicotianae*, uma vez que esta foi inadequadamente descrita por Breda de Haan (1896).

P. nicotianae foi caracterizada por Waterhouse (1963) com descrição das seguintes características: produção de oogônios esféricos (de 20 a 35 µm de diâmetro, normalmente de 24 a 30 µm) em cultura única ou quando pareado com isolados de “mating type” oposto; oósporos esféricos não preenchidos com oogônio, mas sempre maior que 20 µm, normalmente entre 24 a 30 µm de diâmetro com anterídio anfígeno; clamidósporos abundantes medindo de 20 a 40 µm de diâmetro e espessura da parede de aproximadamente 1,5 µm; esporângios de formato ovóide ou elipsóide, persistentes e papilados. O autor também caracteriza essa espécie pela produção de oogônios esféricos de 16 a 31 µm de diâmetro, normalmente de 24 a 26 µm, oósporos esféricos com

diâmetro médio de 20 µm (máximo 26 µm); anterídios anfígenos, ovais ou esféricos.

Gallegly e Hong (2008) realizaram estudos morfofisiológicos e moleculares de vários isolados tidos como pertencentes a *P. parasitica* e *P. nicotianae*. Com base nos padrões SSCP idênticos e similaridade morfológica concluíram que se tratava de uma mesma espécie e propuseram que o nome mais correto seria *P. nicotianae*, uma vez que o termo sugere especificidade de hospedeiro e *P. parasitica* sugere tolerância quanto à patogenicidade. A forma esporangial mais comum é a ovóide, mas muitos estão entre esféricos e elipsóides; dimensão dos esporângios entre 45 a 37 µm (razão C/L 1.24); clamidósporo terminal ou intercalar (cerca de 30 µm de diâmetro) na maioria dos isolados e temperatura máxima de crescimento de 35°C.

P. nicotianae Dastur 1913 (*P. nicotianae* var. *parasitica* Breda de Haan, 1896) é uma das espécies de *Phytophthora* mais estudada e conhecida devido aos grandes danos causados à cultura de citros e sua distribuição no mundo todo. Para Lopes et al. (2005), *P. nicotianae* é considerada uma espécie muito frequente em diversas regiões do Brasil, parasitando 22 espécies hospedeiras.

Esta espécie tem sido assinalada nas mais importantes regiões citrícolas. Timmer et al. (1988) estimaram a população de *P. nicotianae* em pomares de citros na Flórida analisando amostras de solo coletadas debaixo de plantas cítricas com sintomas de gomose. Os autores relataram alta densidade populacional de propágulos, aproximadamente 5 propágulos/cm³ de solo contaminado. Lutz (1991) também estudou a flutuação de populações, número e tipos de propágulos de *P. nicotianae* em pomares irrigados na Califórnia. Mensurações realizadas em amostras de solo extraídas da rizosfera foram feitas e mostraram que populações de *P. nicotianae* aumentaram de 17 propágulos por grama (ppg) antes da irrigação para 70 ppg após a irrigação. Duncan (1993) avaliou mensalmente, durante um período de 27 meses, a população de *P. nicotianae* e o nematóide *Tylenchulus semipenetrans* em pomares de toranja em porta-enxertos de limão rústico no Pico Central da Flórida. Os resultados mostraram que a densidade da massa de raízes e a concentração de açúcar explicaram 86% da variação mensal de *P. nicotianae* na densidade de propágulos no solo.

Comparando plantas hospedeiras e susceptíveis à infecção de raízes fibrosas por *P. nicotianae* e *P. palmivora*, Widmer et al. (1998) utilizou porta-enxertos susceptíveis a *Phytophthora* como laranja azeda (*Citrus aurantium*) e tolerante, trifoliata orange (*Poncirus trifoliata*). Observaram, então, redução na colonização por ambos os patógenos e ficou evidenciado um suposto fator de resistência na hospedeira inibindo o crescimento de *Phytophthora* spp.

Crandall (1948) relata a ocorrência de *P. nicotianae* em El Salvador causando gomose em citros e sugere, para controle da doença, calda bordalesa ou pasta de carbonato de cobre. Em adição, o autor cita a reação varietal em ordem decrescente de susceptibilidade de plantas cítricas hospedeiras à *Phytophthora* spp: laranja doce (*Citrus sinensis*), limão (*Citrus limon*), toranja (*Citrus paradisi*), limão rústico (*Citrus lemonia*), Cleópatra Mandarin (West Indian Time) e laranja azeda (*Citrus aurantium*).

Sandler et al. (1989), realizando estudos sobre tratamento da podridão da raiz de citros causada por *P. nicotianae*, empregando os fungicidas fosetil-Al, em doses altas e baixas em aplicações foliares, e o fungicida metalaxil, em aplicações no solo, em pomares da Flórida, durante três anos, observaram que a densidade de raízes absorventes foi aumentada, bem como a quantidade de frutose suco por planta.

Em Taiwan Ann (1984) identificou sete espécies de *Phytophthora* em plantas de citros e outras espécies ainda não descritas através de pareamento 'mating type' com padrões A1 e A2 e também através de testes de patogenicidade. As espécies isoladas e identificadas foram *Phytophthora nicotianae*, *P. palmivora*, *P. citrophthora*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*. À exceção de *P. isolita* e *P. nicotianae*, todas as espécies foram patogênicas, não havendo significância de virulência entre elas.

No Brasil, as espécies mais comuns acometendo pomares de citros são *P. citrophthora* e *P. nicotianae*. Esta tem sido encontrada mais frequentemente associada com o complexo gomose de *Phytophthora*, sendo responsável por mais de 95% das ocorrências em viveiros e pomares comerciais do Estado de São Paulo (MEDINA FILHO et al., 2004).

Muniz et al. (2004) caracterizaram nove isolados de *Phytophthora* originados da rizosfera de laranjeiras infestadas por *Phytophthora* spp. patogênicos à laranja doce (*Citrus sinensis*) no Estado de Alagoas, região

Nordeste do Brasil. Com base na caracterização morfológica de colônia, morfologia e morfometria das estruturas reprodutivas e no crescimento micelial em diferentes temperaturas, os isolados foram identificados como *P. nicotianae* pertencentes ao tipo compatível A1.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização Morfofisiológica - Obtenção dos isolados em cultura pura

Pomares de laranja doce na região Noroeste e de tangerina na região do Vale do Ribeira do Estado do Paraná foram visitados entre dezembro de 2007 a maio de 2008 (Tabela 1; Figura 2). Plantas apresentando sintomas de gomose na parte aérea foram amostradas. No solo, sob a projeção da parte da copa da planta que apresentava os sintomas da doença, abriu-se uma trincheira, retirando cuidadosamente o solo e descobrindo as raízes, sem decepá-las (Figura 1A). Amostras de solo em contato e adjacente às raízes apresentando necrosamento recente, sem a presença de tecido em estado avançado de decomposição, foram retiradas, aproximadamente 500 g de solo/amostra (Figura 1B). Logo em seguida também foram coletados fragmentos de raízes necrosadas, que foram misturados com o solo amostrado. Todo esse material foi acondicionado em saco plástico e transportado para o Laboratório de Fitopatologia/UEM/Maringá, onde foi conservado à temperatura ambiente por no máximo dois dias.

Para isolamento, empregou-se a metodologia proposta por Matherom e Matejka (1991), com algumas modificações. Dentro de 48 horas após a amostragem, 50 g de cada amostra de solo+raízes foram colocados em um copo de vidro tipo béquer de 1000 mL de volume, acrescentando-se 300 mL de água destilada-esterilizados, seguido de suave homogeneização. Em seguida, um fruto maduro de pera cv D'anjou foi usado como isca. Lavou-se o fruto em água corrente de torneira, seguido da desinfestação em solução de hipoclorito de sódio a 1,0 % durante 1 min., com posterior enxugamento usando papel absorvente. Em seguida, o fruto foi mergulhado na suspensão de solo+raízes no copo, de modo que cerca 2/3 ficaram imersos. O copo foi coberto com uma tela de "nylon" de malha fina para permitir aeração e evitar a invasão de insetos. Este material foi mantido em laboratório, sob condições ambiente

(Figura 1 C), fotoperíodo de 12 h de luz fluorescente e temperatura variando 22 a 28^oC.

Após 5 a 8 dias, quando houve o aparecimento de manchas necróticas no fruto, de 3,0 a 5,0 cm de diâmetro, de coloração marrom escuro e de consistência dura, geralmente ao nível da água, o fruto foi retirado, lavado em água corrente de torneira e procedeu-se o isolamento de, possivelmente, *Phytophthora* spp. Fragmentos de tecido do fruto da região de interseção tecido sadio-tecido necrótico foram retirados e transferidos, diretamente para placa de Petri contendo 15 mL de meio de cultivo BDA (batata-destrose-ágar), acrescido de cloronfenicol, nistatina, rifampicina, ampicilina, benomil e PCNB (pentacloronitrobenzeno), todos na concentração 50 ppm. Em cada placa de Petri colocou-se quatro fragmentos equidistantes Figura 1D,E). As placas de Petri foram mantidas em prateleiras sob luz fluorescente contínua, à temperatura ambiente (22 a 28^o C). Passados três a cinco dias, quando se observou o desenvolvimento de colônias (Figura 1F) com aparência visual de *Phytophthora* (hifas com aspecto cotonoso, de coloração branca e asseptadas), fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo CA (cenoura-ágar: 200 g de cenoura, 18 ágar, água q.s.p. 1000 mL). Após a formação de colônia nesse meio, fragmentos de micélio foram transferidos para tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultivo, mantidos em câmara tipo BOD, sob escuro contínuo, a 25^o C, a fim de se obter crescimento vigoroso do micélio para posterior caracterização e identificação em nível de espécie.

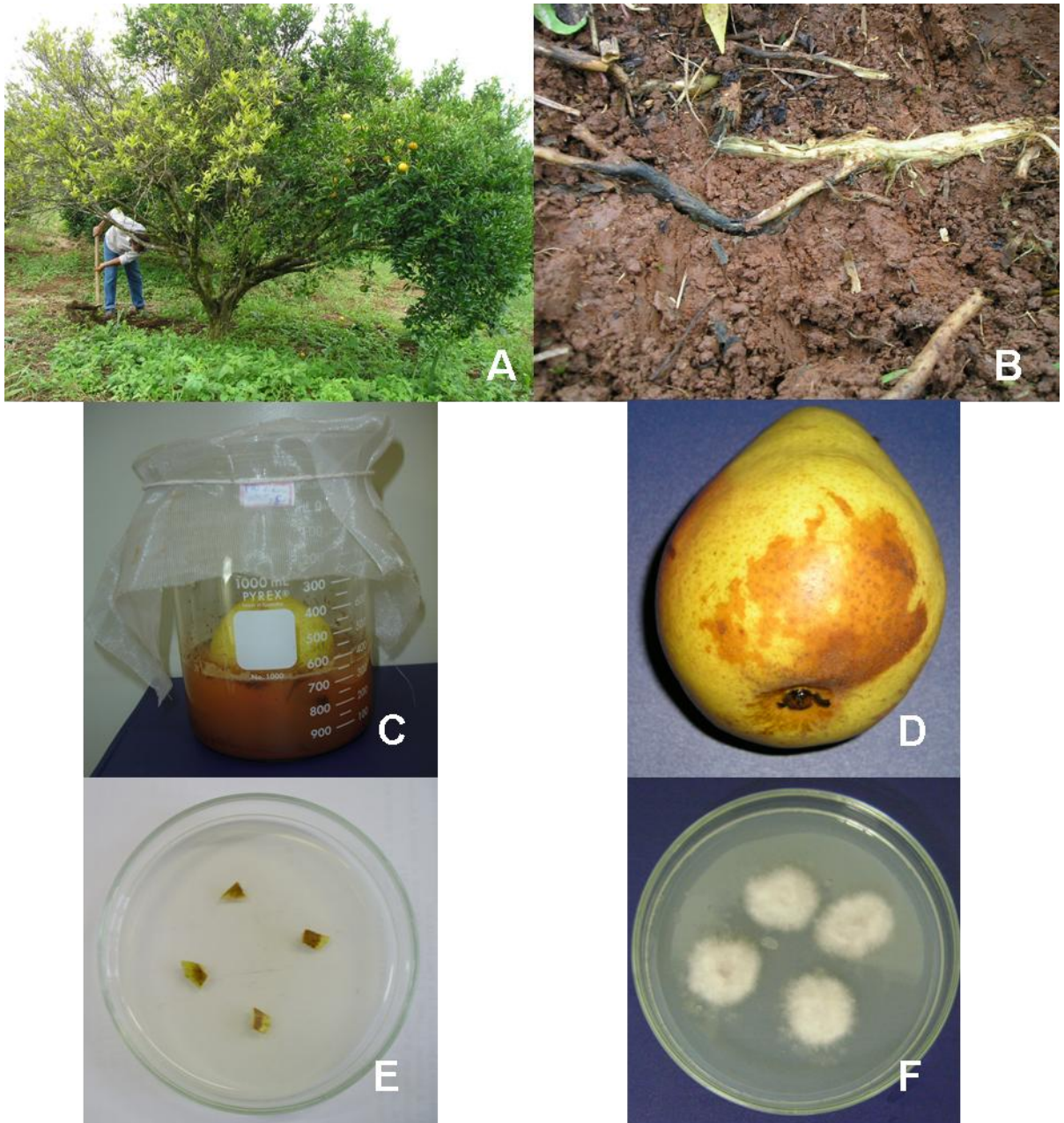


Figura 1. (A) Planta sintomática de tangerina 'Montenegrina'; (B) Raízes com sintomas de gomose; (C) Suspensão de solo com fruto de pera cv. 'D'anjou' parcialmente submerso; (D) Frutos de pera com sintoma típico (necrose) de *Phytophthora* spp.; (E) Fragmentos de tecidos necrosados de pera em meio de cultivo semi-seletivo para *Phytophthora* spp.; (F) Colônias de *Phytophthora* spp.

Tabela 1. Locais amostrados, características dos pomares de citros e isolados obtidos.

Isolado	Localidade/Município	Variedade	Idade do pomar
PR 1	Faz. Bom Sucesso / Apucarana	Laranja 'Pêra'	8 anos
PR 2	Faz. Bom Sucesso / Apucarana	Laranja 'Pêra'	8 anos
PR 3	Faz. Bom Sucesso / Apucarana	Laranja 'Pêra'	8 anos
PR 4	Faz. Bom Sucesso / Apucarana	Laranja 'Pêra'	8 anos
PR 5	Faz. Bom Sucesso / Apucarana	Laranja 'Pêra'	8 anos
PR 6	Faz. Limeira / Apucarana	Laranja 'Pêra'	5 anos
PR 7	Faz. Limeira / Apucarana	Laranja 'Pêra'	5 anos
PR 8	Apucarana	Tangerina 'Ponkan'	11 anos
PR 9	Cerro Azul	Tangerina 'Ponkan'	9 anos
PR 11	Cerro Azul	Tangerina 'Ponkan'	9 anos
PR 14	Cerro Azul	Tangerina 'Montenegrina'	9 anos
PR 17	Faz. Sílvia Jardim / Paranavaí	Laranja 'Pêra'	5 anos
PR 18	Faz. Sílvia Jardim / Paranavaí	Laranja 'Pêra'	5 anos
PR 19	Faz. Sílvia Jardim / Paranavaí	Laranja 'Pêra'	5 anos
PR 20	Faz. Sílvia Jardim / Paranavaí	Laranja 'Iapar'	5 anos
PR 22	Faz. Sílvia Jardim / Paranavaí	Laranja 'Iapar'	5 anos
PR 25	Faz. Limeira/ Congoinhas	Tangerina 'Montenegrina'	8 anos
PR 26	Faz. Limeira/ Congoinhas	Tangerina 'Montenegrina'	8 anos
PR 27	Faz. Werner / Marialva	Limão Taiti	11 anos
PR 30	Faz. Fortaleza / S. Jorge do Ivaí	Laranja 'Pêra'	5 anos
PR 32	Campus UEM/CTI Maringá	Limão Taiti	4 anos

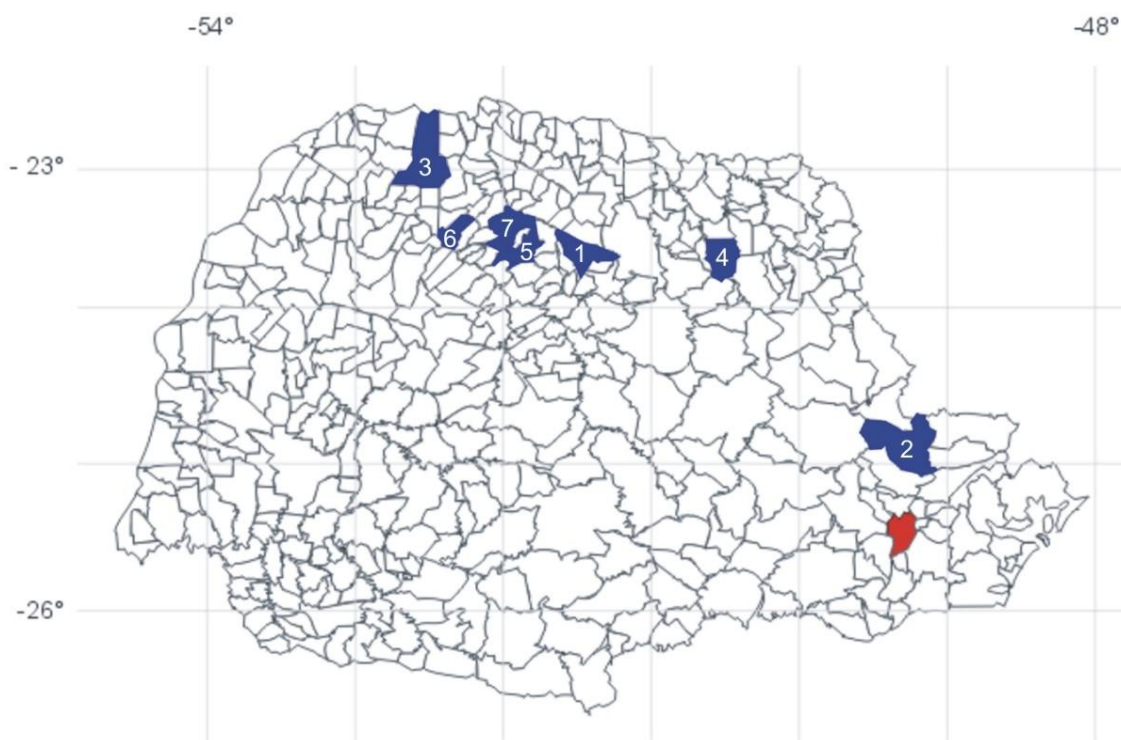


Figura 2. Localização no Estado do Paraná dos municípios onde foram obtidas amostras para isolamento de *Phytophthora*: 1- Apucarana; 2- Cerro Azul; 3- Paranavaí; 4- Congoinhas; 5 - Marialva; 6 - S. Jorge do Ivaí; 7 - Maringá; ● Curitiba-Capital (PR).

3.2. Teste de Patogenicidade dos isolados

Para avaliar a patogenicidade dos 42 isolados obtidos e supostamente de *Phytophthora* associados à gomose em citros, foi realizado teste em plantas de limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck), produzidas em sacos plásticos, com três meses de idade, em condição de casa-de-vegetação, utilizando o "método de inserção de disco de meio de cultivo contendo micélio", proposto por Siviero et al, (2002).

Para produção do inóculo, os isolados foram multiplicados em placas de Petri com meio CA, em estufa de cultura tipo BOD, a 26° C, na ausência de luz, durante sete dias.

Para inoculação, utilizando-se de uma lâmina cortante, retiraram-se discos de meio de cultivo com 5,0 mm de diâmetro, contendo micélio do patógeno e os fixou em ferimentos feitos no caule das plantas, com a superfície contendo micélio em contato com a superfície do hospedeiro. Os ferimentos nas plantas de limão foram realizados retirando-se discos da casca do caule de 5,0 mm de diâmetro. Em cada planta foram feitos três ferimentos, distanciados um do outro de 5,0 cm, com o primeiro a 8,0 cm da altura do caule (Figura 3A, Figura 3B). Logo após a inoculação, sobre o disco de micélio, foi retornado o disco da casca e cobriu-se o caule nesta região, diametralmente, com uma porção de algodão hidrofílico umedecido em água destilada/esterilizada (Figura 3C). O algodão umedecido foi coberto com uma fita plástica transparente (Figura 3D). Esse procedimento foi adotado para evitar a desidratação do inóculo e dos ferimentos. Em seguida, as plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida a 28°C por 48 horas visando proporcionar condições ideais de infecção e desenvolvimento da doença. Após esse tempo, as plantas foram transferidas para casa-de-vegetação.

Para cada isolado foram inoculadas duas plantas com três ferimentos cada. Como controle, foram utilizadas plantas só com ferimentos e disco de meio de cultura sem a presença de fungo.

Passados 11 dias da inoculação em casa de vegetação, retirou-se a fita plástica, o algodão e foram realizadas as avaliações, considerando o ferimento resultante da inoculação que apresentou maior diâmetro de lesão. Considerou-se isolado patogênico quando se observou, visualmente, a

presença de qualquer tecido necrosado na região da inoculação tanto da casca como do lenho. As lesões foram medidas apenas com a aferição do comprimento diametral, na superfície do lenho (diretamente sobre a zona cambial), com o auxílio de uma régua milimetrada, sendo a zona limite do comprimento a alteração da coloração do tecido hospedeiro causada pela colonização do patógeno. Após essa avaliação, acompanhou-se a formação de goma nas lesões até aos 60 dias.

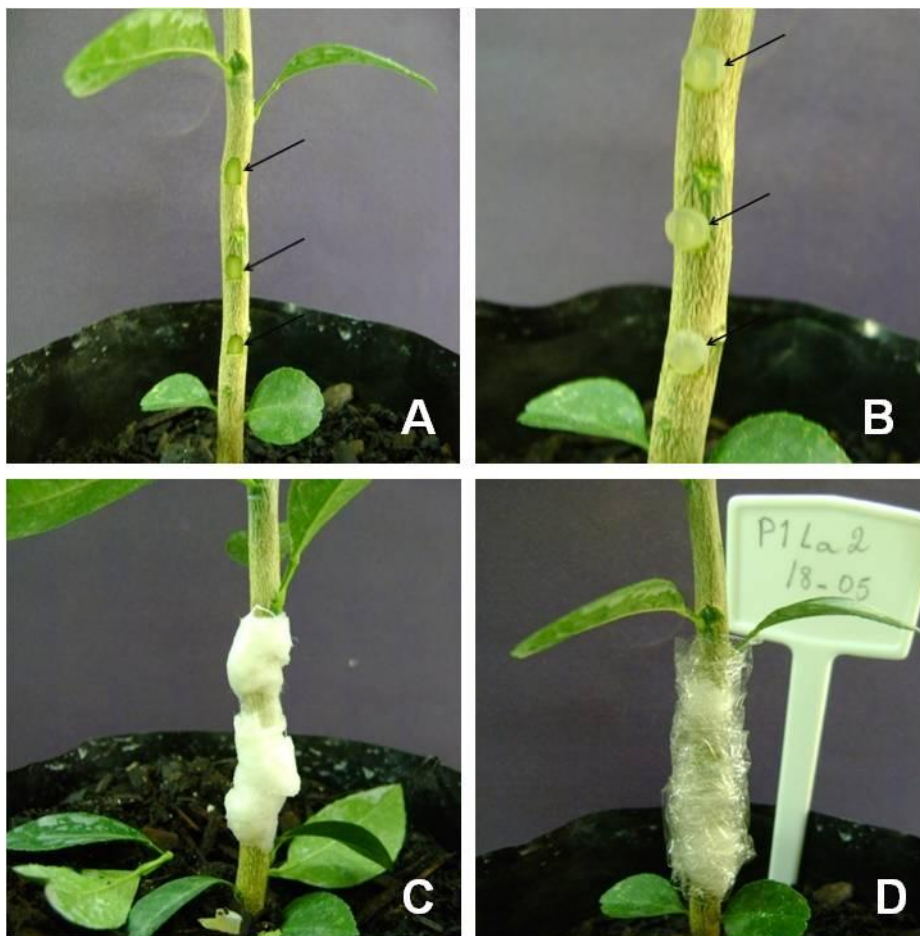


Figura 3. Plantas de limão 'Cravo': (A) Ferimento no caule; (B) Disco do inóculo no ferimento; (C) Câmara úmida com algodão umedecido em água; (D) Proteção com filme plástico.

3.3. Avaliação do crescimento micelial

Para este e os demais ensaios experimentais utilizaram-se somente os 21 isolados que foram patogênicos a limão 'Cravo', sendo que os demais foram descartados.

O inóculo foi produzido como no ensaio do teste patogenicidade (item 3.2). Discos de meio de cultivo de 5 mm de diâmetro, contendo micélio retirados das margens de colônias, foram transferidos para o centro de placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo 15 mL de meio CA. Em seguida, as placas de Petri foram mantidas em estufa tipo BOD a 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 35 e 36°C em escuro contínuo. Para cada temperatura, foram preparadas cinco placas de Petri (repetições) de cada isolado. As placas sob as prateleiras na estufa BOD foram distribuídas de forma inteiramente casualizada.

A partir do terceiro dia até o sexto dia, o crescimento micelial foi quantificado, diariamente. Procedeu-se a observação desse crescimento, medindo-se o diâmetro da colônia em dois sentidos diametralmente opostos, com o auxílio de uma régua milimetrada. O diâmetro da colônia foi expresso pela média aritmética dos dois diâmetros. Também se calculou a taxa de crescimento diário de cada isolado nas diferentes temperaturas. Além disso, foi avaliado o aspecto morfológico de cada colônia, observando-se o tipo de colônia e tipo de micélio presente nas culturas a 28°C.

3. 4. Avaliação da esporulação

3. 4.1. Produção de esporângio

A produção de inóculo procedeu-se como no ensaio do item 3.2, assim como o cultivo dos isolados após a transferência para as placas de Petri bem como a manutenção das culturas dos isolados na estufa BOD. A capacidade de esporulação dos isolados foi avaliada empregando os meios de cultivo CA (200g de cenoura, 18g de ágar, 1000 mL de água destilada) e V8-ágar (200 mL de suco V8-ágar, 4g de CaCO₃, 18g de ágar e 800 mL de água destilada), a temperatura ambiente (22 a 28° C), sob luz fluorescente contínua, durante 10 dias.

Ao final do décimo dia, com o auxílio de alça de ponta reta, retirou-se uma alíquota de micélio, transferindo-a para uma gota de lactofenol colocada sob lâmina de microscopia, e em seguida, cobrindo-se o material com lamínula, para observação ao microscópio de luz, com aumento de 100 vezes. A contagem de esporângio foi realizada em cinco campos da lâmina indicados

casualmente. A produção de esporângio de cada isolado foi expressa como pouca (+; variando de 1 a 5 esporângios por campo), mediana (++; 6 a 15 esporângios por campo) e alta (+++; mais de 16 esporângio por campo).

O experimento constou de três repetições para cada isolado em cada meio de cultivo, sendo considerada cada placa de Petri uma unidade experimental e o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado.

3.5. Produção de oósporos

Para determinar o grupo de compatibilidade dos 21 isolados de *Phytophthora*, a formação dos oósporos foi avaliada por meio do pareamento destes isolados, com os isolados padrões para os grupos de compatibilidade A₁ (isolado 61) e A₂ (isolado 65) obtidos da micoteca da Embrapa Floresta/Colombo/PR, ambos pertencentes à espécie *P. nicotianae* obtidos de plantas de acácia-negra. Todos os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo o meio CA, durante sete dias, em incubadora, tipo BOD, em escuro contínuo, a 26° C. Após esse tempo, discos de meio de cultivo de 5,0 mm de diâmetro, contendo micélio dos isolados A₁ e A₂, foram pareados com discos de todos os isolados a serem testados, em placas de Petri contendo o meio CA. Em cada placa de Petri, colocou-se um disco do isolado padrão e um disco do isolado a ser testados distanciados de 3,0 cm, de maneira que, em uma das metades da placa, ficasse o isolado do A₁ ou A₂ e, na outra metade, o isolado a ser teste.

Em seguida as placas foram incubadas a 25° C em BOD por sete dias, em condições de escuro contínuo. Para observação da formação de oósporos, com uma alça de ponta reta, raspou-se a superfície do meio de cultivo na região onde houve coalescência das duas colônias. O material fúngico raspado foi colocado em gota de lactofenol em lâmina de microscopia e observado ao microscópio óptico de luz. A compatibilidade foi constatada pela presença ou ausência de oósporos, indicando a qual grupo de compatibilidade os isolados pertencem.

Todos os isolados foram pareados com os dois grupos padrões, num total de três repetições para cada combinação de pareamento.

3.6. Morfologia e dimensão de esporângios e clamidósporos

Para avaliação das dimensões dos esporângios, os isolados foram cultivados em CA, em estufa de cultura tipo BOD, a 26⁰ C, na ausência de luz. Passados cinco dias de incubação, discos de meio de cultivo contendo micélio retirado das margens da colônia foram transferidos para placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo 15 mL de suspensões de extrato de solo não autoclavado, meio líquido ótimo para esporulação de *Phytophthora*, sendo oito discos para cada placa. As placas de Petri foram dispostas sob luz fluorescente contínua, a 26^o C, durante 48 horas. O solo utilizado foi do tipo nitossolo eutroférico, coletado da horta ensino/UEM/Departamento de Agronomia. O extrato foi obtido misturando 10 g do solo em 1000 mL de água destilada. Após homogeneização, a suspensão permaneceu em repouso por 24 horas para sedimentação da fração mais densa. Em seguida, a parte líquida foi retirada e filtrada para retirada da fração grosseira e usada no ensaio experimental.

Após as 48 horas sob luz fluorescente, nos dois discos de meio de cultivo onde se observou, visualmente, maior desenvolvimento de estruturas fúngicas, retirou-se alíquotas destas, transferindo-as para gota de lactofenol em lâmina de microscopia. Ao microscópio de luz, utilizando-se de lâmina e ocular micrométricas, mediram-se as dimensões (comprimento e largura) dos esporângios formados. De cada placa de Petri, foram preparadas oito lâminas (quatro lâminas de cada disco), medindo-se as dimensões de 50 esporângios para cada isolado, eleitos casualmente. Além disso, avaliaram-se as profundidade e largura da papila do esporângio, como também se observou a sua morfologia.

Para aqueles isolados onde houve formação de clamidósporos, foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente para medir o diâmetro e espessura da parede dessa estrutura.

3.7. Ontogenia dos esporângios

O meio de cultivo e o procedimento para produção dos esporângios foram os mesmos empregados no item anterior (3.6). Após as 48 horas em suspensão de extrato de solo, para os dois discos de meio de cultivo, onde observou visualmente maior desenvolvimento micelial, retirou-se a tampa de cada placa de Petri e, ao microscópio de luz, com aumento de 100 x (objetiva de aumento de 10 x) observou -se a ontogenia dos esporângios (umbelada ou simpodial). Para cada disco, observou-se cinco tipo de formação de esporângio.

3.8. Morfologia do anterídio e dimensões do oogônio e oósporo

O meio de cultivo e o procedimento para a produção dessas estruturas reprodutivas foram os mesmos do item (3.4), assim como a preparação das lâminas. O procedimento para preparação das lâminas constou da retirada de uma pequena alíquota de meio de cultura na linha de intersecção das duas colônias onde se dá a formação de tais estruturas. As medições do diâmetro, do oogônio e do oósporo foram feitas em 50 unidades de cada um para cada um dos 21 isolados. Cada anterídio observado foi classificado como anfígeno ou parágino, conforme o ponto de ligação com o oogônio.

3.9. Caracterização molecular

3.9.1. Isolamento do DNA

Para extração de DNA genômico, os isolados foram cultivados em meio líquido de cenoura (200g de cenoura; água destilada q.s.p. 1000 mL), por cinco dias, a temperatura de 25° C, em incubadora tipo BOD, em escuro contínuo. A massa micelial de cada isolado foi separada do meio líquido por filtragem em gaze e colocada em tubos tipo Eppendorf, e em seguida, preservada em 'freezer' a - 20⁰ C. Empregou-se o kit de extração DNAzol (Invitrogen) e, de acordo com as especificações do fabricante, aproximadamente 50 mg de micélio de cada isolado, macerados em cadinho

de porcelana com nitrogênio líquido até obter um fino pó que foi transferido para tubo de Eppendorf de 1,5 mL. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL do reagente DNAzol e a mistura foi homogeneizada com uma pipeta por realização de movimento de vai-vem. Posteriormente, foram feitos 10 movimentos de inversão nos tubos para melhor homogeneização da suspensão das amostras. Sequencialmente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g (11.600 rpm) por 10 minutos, removendo o sobrenadante para tubos de Eppendorf. Para precipitação do DNA, foram adicionados aos tubos 500 µL de etanol 100% e em seguida os tubos foram agitados invertendo-os gentilmente, seguido de repouso, em temperatura ambiente, por três minutos. Após esse tempo, as amostras foram novamente centrifugadas por dois minutos a 4.000g (7.500 rpm) e descartou-se o sobrenadante. Para a solubilização do DNA, os tubos foram mantidos abertos por 5 a 15 segundos para evaporação do etanol. Esse processo foi argilizado fazendo-se a secagem das paredes dos tubos com tiras de papel toalha autoclavadas. Após a evaporação do etanol, foi adicionado 0,3 mL de solução 8 mM de NaOH aos tubos e estes foram mantidos expostos ao ar por mais alguns segundos para garantir maior solubilização do DNA precipitado. As amostras de DNA foram mantidas a 4° C. Bandas de DNA genômico total, separadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, foram usadas para quantificação e como indicadoras da integridade do DNA extraído.

3.9.2. Reação da polimerase em cadeia (PCR) e sequenciamento

Para amplificação das regiões ITS1 e ITS2 e gene 5.8S do DNA ribossômico (rDNA) (Figura 4), foram empregados os pares de *primers* ITS5/ITS2 e ITS4/ITS3, conforme o protocolo descrito por White et al. (1990). A reação de PCR foi executada com volume total de 50 µL, contendo DNA genômico, 50 mM MgCl₂, 10x PCR Buffer, 0,2 mM de cada um dos dNTP, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 1 U da Taq polimerase e mais 1mM de cada *primer*. Todas as reações foram baseadas em 30 ciclos, sendo: 1 min a 94° C; 1 min a 61° C; e 2 min a 72° C. Previamente aos ciclos, as amostras foram submetidas à temperatura de 94° C por 1,0 min e de um período extra de extensão de 5 min a 72° C após os 30 ciclos. As reações de amplificação foram

conduzidas em um termociclador Tpersonal Whataman Biometra (Biometra GmbH, Geottingen, Alemanha).

Para o seqüenciamento do rDNA de *Phytophthora* spp., as amplificações de PCR foram realizadas em um volume de 50 µL contendo 39,25 µL de água, 5 µL de 10 x PCR buffer 1,5 µL, 50 mM MgCl₂, 1 µL de 10 mM de dNTP's, 1 µL de cada primer, 5 µL de DNA genômico e 0,25 µL da Taq DNA polimerase. Todas as amplificações de PCR foram feitas em um aparelho termociclador Tpersonal Whatman Biômetra (Biometra GmbH, Goettingen, Alemanha). Os produtos da reação de PCR foram purificados com o "Kit PureLinktm PCR Purification" (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Após a purificação, as amostras foram encaminhadas para o sequenciamento no Instituto Biológico de São Paulo/Laboratório de Bioquímica Fitopatológica. O sequenciamento direto foi realizado com aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer (PE Applied Biosystem, Noewalk, CT, EUA) para serem comparadas com seqüências de *Phytophthora* spp. disponíveis no *GenBank*.

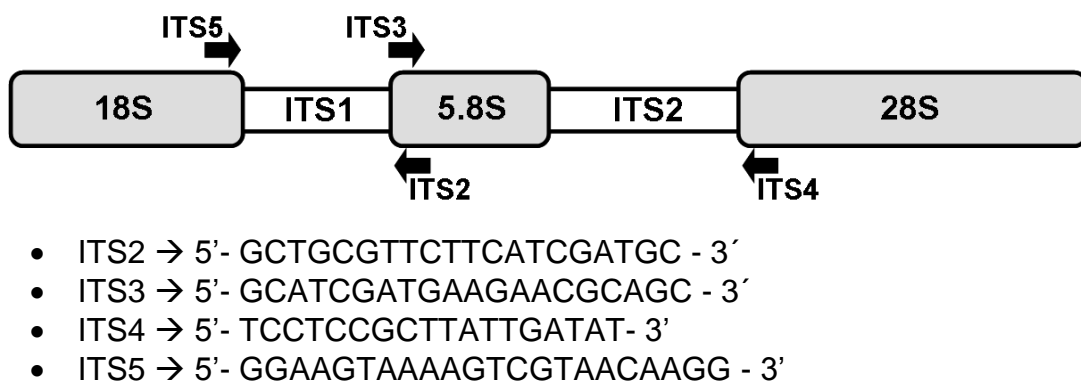


Figura 4. Mapa do gene do DNA ribossomal (rDNA) nuclear, com a localização dos *primers* (Baseado em WHITE et al., 1990).

3.9.3. Análise dos resultados

Seguindo a metodologia proposta por Schneider (2003), as seqüências do rDNA dos 21 isolados avaliados neste trabalho foram comparadas com as seqüências de *Phytophthora* spp. disponíveis no banco de dados do *Gen Bank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a mesma região ("blast search"). A comparação das seqüências de nucleotídeos do gene 5.8S, regiões ITS1 e

ITS2 do rDNA dos isolados de *Phytophthora* spp. foram realizadas através de alinhamentos múltiplos obtidos utilizando-se o programa CLUSTAL W disponível “on line” no endereço eletrônico (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>). A partir dos alinhamentos, foram preparadas árvores filogenéticas com o programa PAUP*4.0 (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, EUA) utilizando-se o método de máxima parcimônia (*maximum parsimony*), com o procedimento de busca heurística (*heuristic search/stepwise addition/random search*) e o método de agrupamento de vizinhos (“neighbor joining”). Os ramos das árvores foram testados por “bootstrap”, com 1000 repetições.

3.9.4. SSCP (single-strand-coformation polymorphism)

Para amplificação do DNA e realização das análises SSCP dos produtos da PCR, foi usado a metodologia de Kong et al. (2003), com algumas modificações. Para amplificação do DNA dos isolados de *Phytophthora*, utilizou-se um par de “primers” desenvolvido para Oomycetes (COOK et al., 2002), sendo o “primer forward” ITS6: 5'- GAA GGT GAA GTC GTA ACA AGG -3' localizado no gene 18S e o “primer reverse” ITS7: 5' - AGC GTT CTT CAT CGA TGT GC - 3' localizado no gene 5.8S do rDNA. A PCR foi executada com o volume total de 50 µL, contendo, assim, 39,25 µL de água ultrapura, 5 µL de 10 x PCR buffer, 1,5 µL de MgCl₂ a 50mM, 0,1 µL de dNTPs a 10 mM, 1 µL de cada um dos primers (“forward e reverse”) e 0,25 µL de taqTM polimerase. A reação de PCR se efetivou com o tempo inicial de desnaturação de 2,0 minutos a 96⁰ C, seguido de 30 ciclos de 94⁰ C por 30 segundos, 55⁰ C por 45 segundos e 72⁰ C por um minuto. Após os 30 ciclos, as amostras foram submetidas à temperatura de 72⁰ C por 10 minutos de um período extra de extensão. As reações de amplificação foram conduzidas em um aparelho Termociclador Tpersonal Whataman Biometra (Biometra GmbH, Geottingem, Alemanha). Em seguida, as amostras foram preparadas para corrida em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio para confirmar a amplificação do DNA. Para visualização das bandas e documentação, as imagens foram capturadas usando o equipamrnto fotográfico “Doc-Print II” (Vilber Lourmat) e fotografado.

3.9.4.1. Gel de Poliacrilamida - SSCP

Para 30 mL de gel de poliacrilamida a 8%, foram utilizados 18,6 mL de água destilada/autoclavada, 3 mL de TBE 5x, 8 mL de acrilamida (29:1), 350 µL de persulfato de amônia e 50 µL de TEMED. O tampão desnaturante foi preparado com 950 µL de formamida, 40 µL de EDTA a 500 mM e pH = 8,0, 10 µL de água e uma pequena pitada de bromofenol. As amostras foram preparadas colocando-se as mesmas quantidades de produto de PCR e de tampão desnaturante num microtubo de 0,2 µL de capacidade. A quantidade utilizada foi de 5 µL de DNA (produto de PCR) mais 5 µL de tampão desnaturante. As amostras foram levadas ao termociclador por 10 minutos a 96^o C. Após esse tempo, as amostras foram retiradas do termociclador rapidamente e colocadas em gelo por um período de um minuto e, na sequência, aplicadas em gel previamente pré-corrido por 10 minutos. O preparo do “DNA ladder” foi feito com 2,0 µL de Phx174/HaeIII diluído na proporção 1:5 e 2 µL de produto de PCR de *P. cinnamomi* amplificado com os “primers” ITS6 e ITS7 para 36 µL de SSCP com corante carregador. O tempo de corrida das amostras constou-se de 4 horas a 200 V. Após a corrida, o gel foi cuidadosamente retirado da cuba e transferido para um pote de vidro transparente para efetivação da revelação das bandas com nitrato de prata. A revelação do gel de poliacrilamida foi feita colocando inicialmente sobre o gel uma mistura de etanol a 10% mais 180 mL de água destilada por 10 minutos. Após esse tempo, o gel foi lavado rapidamente com água destilada. Em seguida, ao gel foi adicionada uma mistura de 3,08 mL de HNO₃ a 65% e 197 mL de água destilada durante 3,0 minutos. Em sequência, o gel foi lavado duas vezes com água destilada. Após essa lavagem, foi colocada a solução de nitrato de prata a 2% e deixou-se sob agitação leve durante 20 minutos. Novamente, o gel foi lavado duas vezes com água destilada. Em seguida, colocou-se a solução reveladora (200 mL de carbonato de cálcio a 3% mais 108 µL de formaldeído) até obter boa visão dos padrões das bandas. Após descartar a solução reveladora, adicionou-se 200 mL de solução de ácido acético a 5% por 15 minutos para interromper a reação. Após a revelação, a visualização e documentação do gel foram realizadas sob luz branca em

equipamento de fotodocumentação (UVPGDS- 8000 System) para comparação e análise entre as espécies.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção dos isolados

O uso de pera cv. D'anjou como isca biológica para obtenção de isolados de *Phytophthora* spp. em cultura pura, associada à gomose dos citros apresentou-se adequada. Entre o quarto ao quinto dia após imergir parcialmente o fruto de pera na suspensão de solo apareceram os primeiros sintomas de necrose. Para melhorar a eficiência de sucesso no resultado do isolamento do fungo, no mesmo dia em que se observaram os sintomas de necrose no fruto, foi necessário prosceder o isolamento. Caso contrário, o índice de contaminantes por micro-organismos saprófitas é muito grande, reduzindo o sucesso dessa técnica. Dos quatro fragmentos de fruto de pera colocados em cada placa de Petri, a partir da maioria, observou-se o crescimento micelial com características ao de *Phytophthora* spp., ou seja, hifas asseptadas, de coloração branca, delgadas e colônias de aspecto cotonoso denso. Assim foram obtidos 21 isolados de *Phytophthora* spp. associados à gomose em citros (Tabela 1).

Outros detalhes importantes que influenciaram muito no desenvolvimento dessa técnica foram os seguintes:

- O uso de frutos de pêra de outras variedades não resultou em sucesso dessa técnica, pois foram testados frutos de pera: 'Willians', 'D'água', 'Pêra-rocha', mas em nenhum houve formação de necrose;

- O estágio de maturação do fruto de pera foi muito importante, visto que o uso de frutos em estádios iniciais e mais avançados de maturação reduziu drasticamente o sucesso da técnica. Em frutos em estágio inicial de maturação, não ocorria infecção por *Phytophthora*, conseqüentemente, não havia formação de necrose. Em frutos em estágio avançado de maturação, o índice de contaminação por micro-organismos saprófitos foi muito elevado nas necroses, dificultando muito a obtenção das culturas puras;

- A amostragem também foi importante no sucesso da técnica. Geralmente, os primeiros sintomas de gomose na parte aérea aparecem de “um lado da planta” de citros, que corresponde ao “lado do sistema radicular” afetado pelo patógeno. A amostra de solo mais raízes deve ser retirada “desse lado”. Deve-se, também retirar amostras do solo nas regiões o mais próximo possível das raízes com necroses recentes. O uso de amostras de raízes em estágio avançado de necrosamento resultou em alto índice de contaminação com microrganismos saprófitos e, conseqüentemente na obtenção de cultura pura. Seguindo-se cuidadosamente estes passos, obtem-se 90% de aproveitamento da amostragem com sucesso no isolamento.

4.2. Teste de Patogenicidade

Dos 42 isolados obtidos em cultura pura, 21 isolados de *Phytophthora* spp. foram patogênicos às plantas de limão ‘Cravo’, causando sintomas típicos de gomose. Limão ‘Cravo’ constitui-se no principal porta-enxerto empregado na citricultura brasileira, em cerca de 95% nos pomares comerciais. Para estes isolados, houve formação de lesões necróticas no caule do hospedeiro, tanto no lenho, e principalmente, na casca. As dimensões longitudinal e radial das lesões variaram para os diferentes isolados (Quadro 1; Figura 5). Aos 14 dias após a inoculação, observou a exsudação de goma nas lesões, cuja intensidade também variou entre os isolados. Este sintoma se prolongou até 120 dias após a inoculação. Para os isolados PR7, PR11, PR22, PR26 e PR30, ocorreram a cicatrização parcial da lesão e para os demais isolados PR1, PR2, PR3, PR4, PR5, PR6, PR8, PR9, PR14, PR17, PR18, PR19, PR20, PR25, PR27 e PR32, ocorreram ininterruptos crescimentos longitudinal e radial da lesão, não se observando formação de quaisquer tecidos de cicatrização.

Aos 90 dias da inoculação, observou-se o início de amarelecimento das folhas (Figura 5D). Planta não inoculada (só com ferimento) não desenvolveu nenhum tipo de sintoma e ocorreu a cicatrização do tecido nos locais dos ferimentos (Figura 5E).

Muniz et al. (2004) testaram a patogenicidade de nove isolados de *Phytophthora nicotianae* obtidos da rizosfera de laranjeiras (*Citrus sinensis*) infectadas do Estado de Alagoas em mudas do porta-enxerto limão ‘Cravo’

(*Citrus limonia* Osbeck) com cinco meses de idade e em frutos de laranja 'Pêra'. Todos os isolados foram patogênicos quando inoculados em frutos de laranja 'Pêra' e apenas dois isolados não foram patogênicos em mudas de limão 'Cravo'. Plantas inoculadas com isolados de *P. nicotianae* produziram apenas lesões necróticas no caule, não observando clorose nas folhas ou morte de planta após 90 dias de inoculação.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que, de acordo com a observação do comprimento das lesões, ocorreu diferença de susceptibilidade de mudas de limão 'Cravo' aos isolados testados de *Phytophthora* spp. Lesões > 10 mm foram consideradas altamente susceptíveis (PR6, PR14, PR20), < 10mm e > 6mm, moderadamente susceptível, (PR1, PR4, PR18, PR19, PR25, PR26, PR27, PR32) e ainda = ou < 6mm, baixa susceptibilidade (PR2, PR3, PR5, PR7, PR8, PR9, PR11, PR17, PR22, PR30). Para todos os isolados, houve formação de goma (Figura 5A), mostrando que não existiu relação de formação deste sintoma com susceptibilidade do hospedeiro. Segundo Feichtenberger (1990,1996) e SIVIERO et al. (2002), limão 'Cravo' pode ser considerado moderadamente susceptível a *P. nicotianae*. Feichtenberger (1990,1996) também relatou que limão 'Cravo' pode ser considerado moderadamente susceptível a *P. citrophthora*.

Tabela 2. Patogenicidade de isolados de *Phytophthora* spp. a mudas de limão 'Cravo', aos 20 dias após a inoculação.

Isolado	Comprimento da lesão (mm)	Exsudação de goma	
		15 dias	60 dias
PR1	8	+++	-
PR2	6	+++	+++
PR3	5	+++	+
PR4	7	+++	+++
PR5	6	+++	-
PR6	13	+++	+++
PR7	5	+	-
PR8	6	+	-
PR9	5	+++	-
PR11	5	+++	-
PR14	13	++	+++
PR17	5	++	+++
PR18	7	++	+++
PR19	8	+++	+++
PR20	16	+++	++
PR22	6	+	-
PR25	9	+++	++
PR26	7	++	-
PR27	7	++	+
PR30	6	++	-
PR32	8	++	+

+ gota pouco visível de goma exsudada
 ++ gota facilmente visível de goma exsudada
 +++ goma formada em grande quantidade com escorrimento da gota
 - ausência de goma

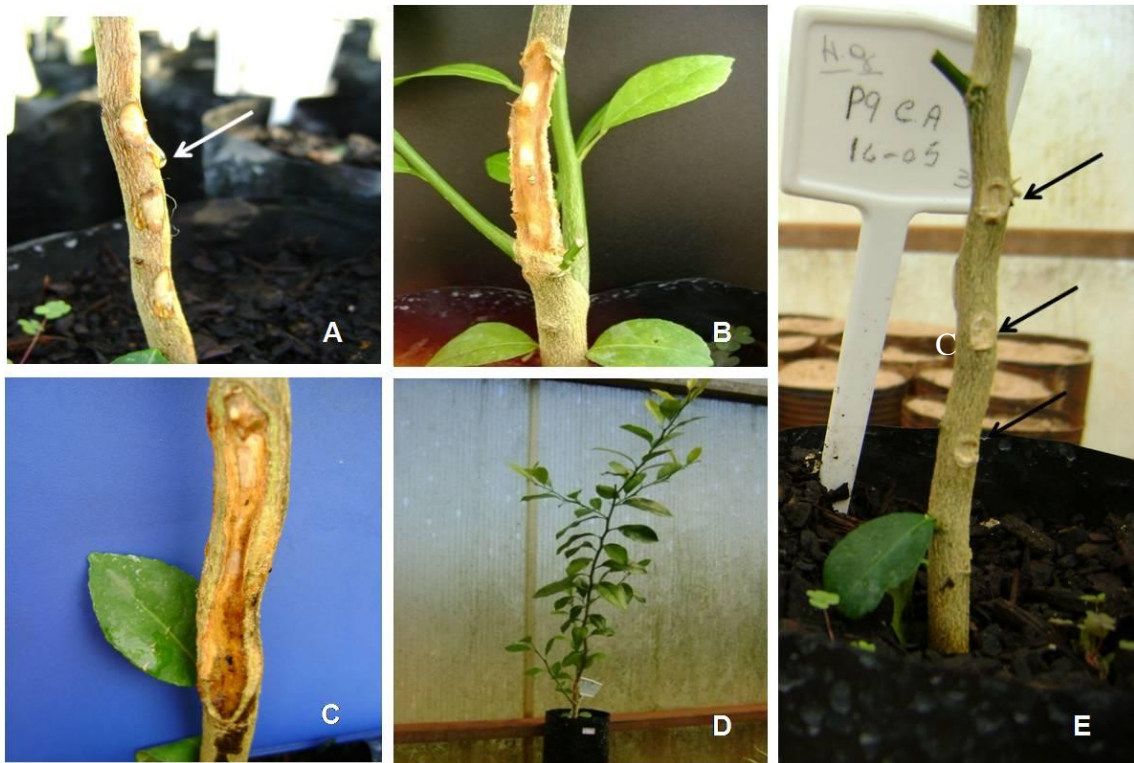


Figura 5. Sintomas de gomose em caule de mudas de limão 'Cravo' inoculadas com micélio do oomiceto *Phytophthora* spp. (A) exsudação de goma na lesão; (B, C) lesões em estágio avançado de desenvolvimento; (D) amarelecimento de planta; e (E) tratamento testemunha.

4.3. Efeito da temperatura no crescimento micelial

Os resultados mostraram que houve efeito significativo da temperatura sobre o crescimento micelial dos 21 isolados supostamente de *Phytophthora* spp., havendo comportamento diferenciado entre os isolados (Tabela 3). A exceção do isolado PR20 para a temperatura 36° C, todos os outros isolados apresentaram crescimento micelial em todas as temperaturas avaliadas, que variaram entre 8 a 36° C. Para o isolado PR20, o maior diâmetro das colônias foi observado entre 20 e 28° C, enquanto que para os demais isolados o maior diâmetro das colônias foi observado entre 24 e 32° C. Essa variação na faixa ótima de temperatura para o crescimento micelial indica diferença de espécies entre os isolados.

As curvas de crescimento para o desdobramento das diferentes temperaturas para cada isolado estão representadas pela Figura 6. Através das equações ajustadas por regressão, temperatura em função do crescimento

micelial, estimou-se a temperatura ótima de crescimento micelial, ou seja, temperatura na qual foi observado maior pico de crescimento micelial para cada isolado (Tabela 3). A partir das equações ajustadas pelas análises de regressão, foram calculadas as soluções para a equação de segundo grau $ax^2 + bx + c = 0$, o qual não ocorreria mais crescimento micelial (Tabela 4).

Tabela 3. Crescimento micelial (diâmetro de colônia em mm) de isolados do oomiceto, *Phytophthora* spp. em diferentes temperaturas no meio de cultivo cenoura-água.

Isolado	Temperaturas (°C)								
	8	12	16	20	24	28	32	35	36
PR1	9,2 b ¹	25,6 c	61,8 a	68,2 c	90,0 a	90,0 a	89,0 a	66,0 d	18,0 a
PR2	10,4 b	24,2 c	62,0 a	74,8 b	90,0 a	89,0 a	87,0 a	68,2 d	14,0 b
PR3	8,8 b	26,0 c	62,4 a	69,8 c	90,0 a	87,4 a	83,4 b	59,8 e	11,0 c
PR4	9,6 b	20,4 d	60,4 a	73,0 b	90,0 a	88,8 a	85,6 a	71,6 c	12,2 b
PR5	7,8 b	22,0 d	64,0 a	75,4 b	90,0 a	90,0 a	86,2 a	52,4 f	10,6 c
PR6	7,4 b	22,2 d	61,6 a	72,6 b	90,0 a	90,0 a	81,8 b	48,6 g	7,0 d
PR7	9,4 b	22,0 d	62,4 a	70,0 c	90,0 a	90,0 a	86,0 a	77,6 b	13,2 b
PR8	9,6 b	21,4 d	62,0 a	70,4 c	90,0 a	86,2 a	88,0 a	69,0 d	9,8 c
PR9	7,6 b	25,0 c	62,0 a	72,6 b	90,0 a	82,0 b	81,0 b	66,2 d	15,4 b
PR11	8,6 b	24,0 c	55,6 c	68,2 d	71,0 a	85,0 b	82,0 b	44,0 h	8,0 d
PR14	9,4 b	22,0 d	61,0 a	69,0 c	86,0 b	85,0 b	81,0 b	71,0 c	8,0 c
PR17	7,6 b	23,6 c	52,4 d	65,2 d	90,0 a	86,0 b	83,6 b	68,8 d	14,2 b
PR18	9,8 b	20,8 d	61,6 a	71,2 b	84,8 b	85,8 a	88,4 a	57,8 e	13,4 b
PR19	9,0 b	15,2 e	50,2 d	70,6 b	85,4 b	90,0 a	82,6 b	77,2 b	7,8 d
PR20	24,6 a	37,2 a	51,6 d	60,2 e	72,0 c	62,6 c	38,4 c	8,4 i	5,0 d
PR22	10,0 b	24,6 c	53,8 c	75,6 c	89,0 a	86,2 b	84,2 a	80,4 a	12,2 b
PR25	10,0 b	31,2 b	57,2 b	80,4 a	90,0 a	87,0 a	81,8 a	80,0 a	14,4 b
PR26	10,0 b	27,6 c	58,4 b	70,8 c	90,0 a	87,6 a	86,0 a	80,6 a	14,6 b
PR27	10,8 b	24,2 c	54,4 c	70,2 c	90,0 a	90,0 a	86,8 a	82,4 a	19,4 a
PR30	10,4 b	27,4 c	58,0 b	73,6 b	90,0 a	90,0 a	85,8 a	76,0 b	9,0 d
PR32	9,6 b	26,0 c	51,6 d	74,4 b	90,0 a	90,0 a	86,0 a	76,2 b	7,6 d

¹ Os dados são média de cinco repetições e médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knot, ao nível de 5% de probabilidade. CV 4,6 %.

A 8° C, os isolados apresentaram crescimento micelial baixo, enquadrando-se no mesmo grupamento, com exceção do isolado PR20, que apresentou crescimento relativamente maior (24,6 mm), diferindo-se estatisticamente dos demais. Houve crescimento micelial dos isolados aos 36° C, com exceção do isolado PR20, que não mostrou nenhum crescimento, embora não diferindo estatisticamente dos isolados PR6, PR11, PR19, PR30 e PR32. Deve-se ressaltar que presença ou ausência de crescimento micelial à temperatura de 36° C constitui característica importante para identificação de *Phytophthora citrophthora* uma vez que este micro-organismo não apresenta crescimento micelial a temperaturas acima de 35° C.

O maior diâmetro de colônia foi observado entre 24 e 32° C para todos os isolados, a exceção do isolado PR20, cujo maior diâmetro observado foi nas temperaturas 24 e 28° C.

As curvas de crescimento para o desdobramento de temperatura para cada isolado estão representadas pela Figura 6. Através das equações ajustadas por regressão, temperatura em função do crescimento micelial, estimou-se a temperatura ótima para crescimento micelial, ou seja, temperatura na qual se pôde observar o maior crescimento micelial para cada isolado (Tabela 4).

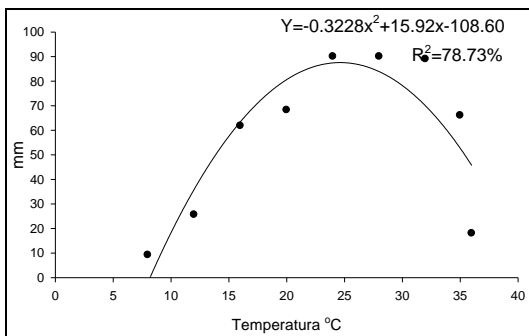
Tabela 4. Temperatura ótima e mínima estimadas para o crescimento micelial de isolados de *Phytophthora* originados de citros, através das equações ajustadas por regressão e equação de segundo grau, respectivamente, e pico de crescimento micelial observado para temperatura ótima.

Isolados	Crescimento micelial (mm)	Temperatura ótima (°C)	Temperatura mínima (°C), $y = 0$
PR1	87,6 ¹	24,6 ²	8,1 ³
PR2	88,6	24,4	8,1
PR3	87,0	24,1	8,2
PR4	87,4	24,6	8,3
PR5	89,2	23,9	8,4
PR6	87,2	23,8	8,4
PR7	87,3	24,8	8,2
PR8	87,1	24,4	8,3
PR9	85,9	24,3	8,2
PR11	78,9	23,9	8,1
PR14	84,2	24,5	8,2
PR17	82,7	24,9	8,3
PR18	85,7	24,3	8,2
PR19	82,7	25,0	8,6
PR20	66,7	21,3	5,8
PR22	86,7	24,9	8,2
PR25	89,9	24,7	7,9
PR26	87,4	24,9	8,0
PR27	86,0	25,3	8,1
PR30	87,8	24,5	8,1
PR32	86,8	24,6	8,2

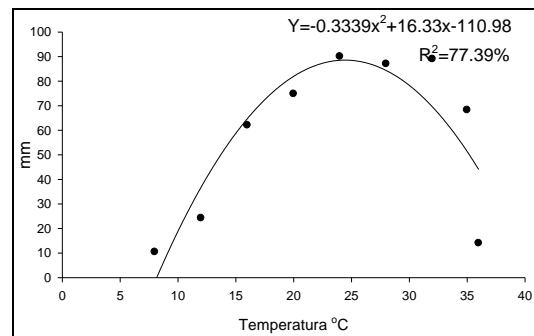
¹ Maior crescimento micelial correspondente à temperatura ótima;

² Temperatura ótima estimada pelas equações ajustadas por regressão;

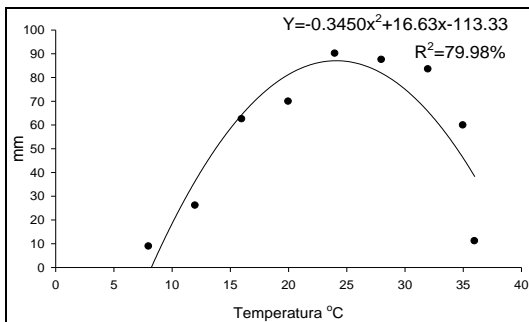
³ Temperatura mínima estimada pelo ajuste das equações de segundo grau.



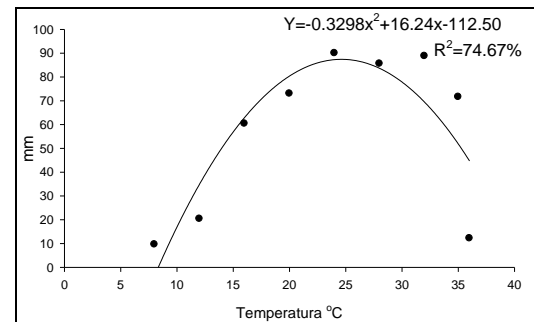
Isolado PR1



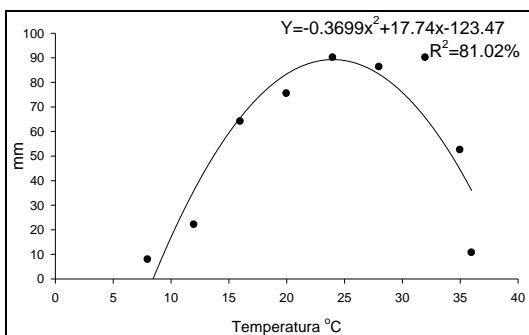
Isolado PR2



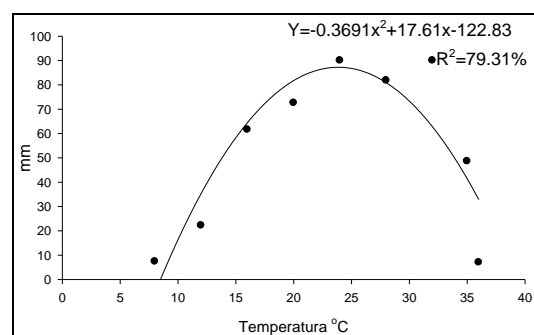
Isolado PR3



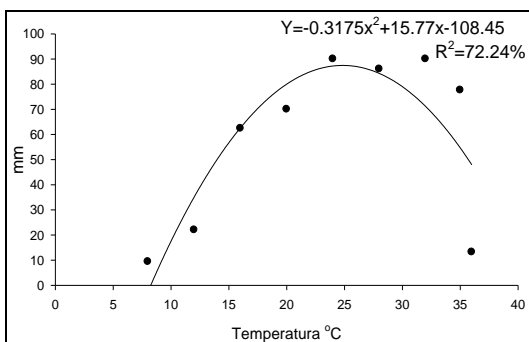
Isolado PR4



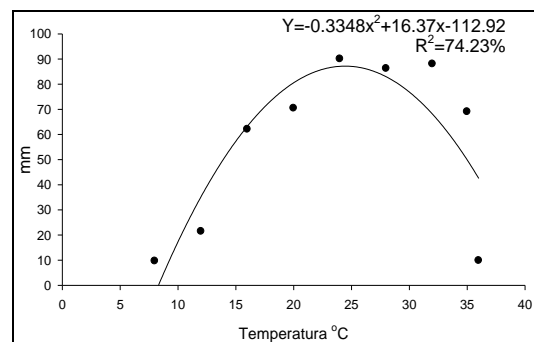
Isolado PR5



Isolado PR6

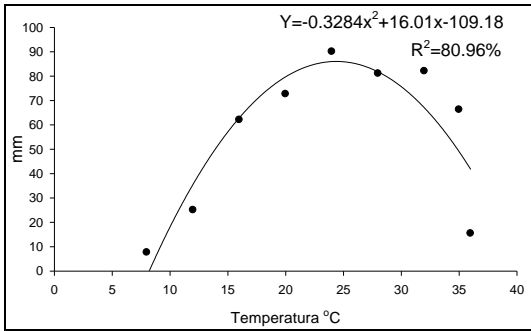


Isolado PR7

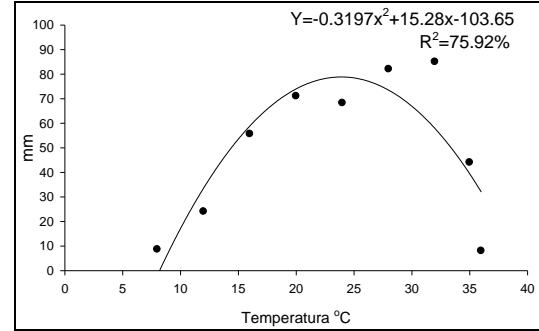


Isolado PR8

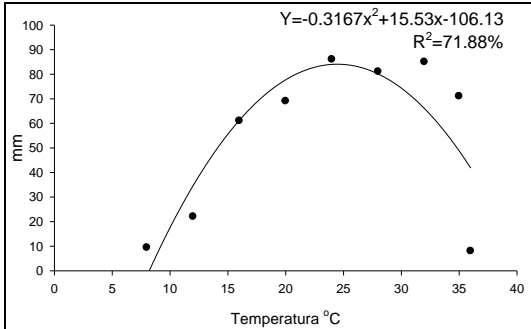
Figura 6. Equações ajustadas a partir do desdobramento da variável temperatura dentro de cada isolado (diâmetro/mm).



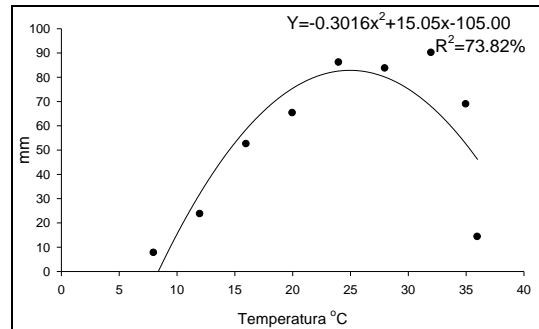
Isolado PR9



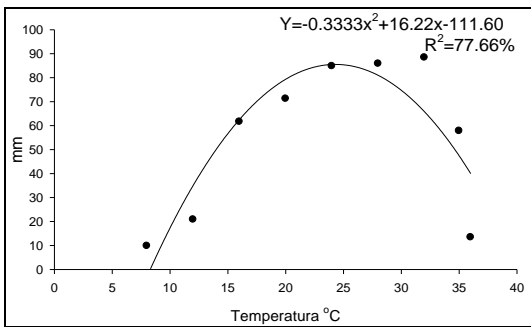
Isolado PR11



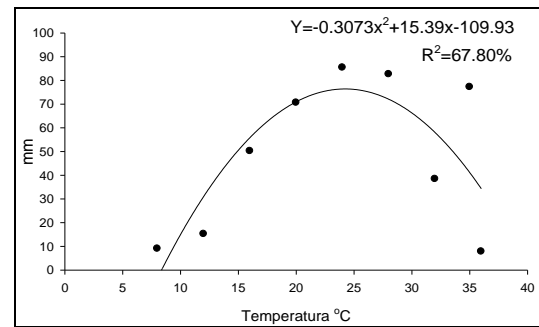
Isolado PR14



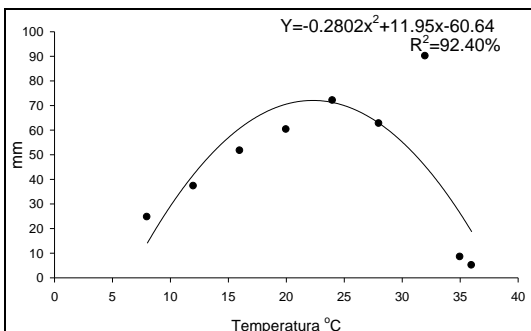
Isolado PR17



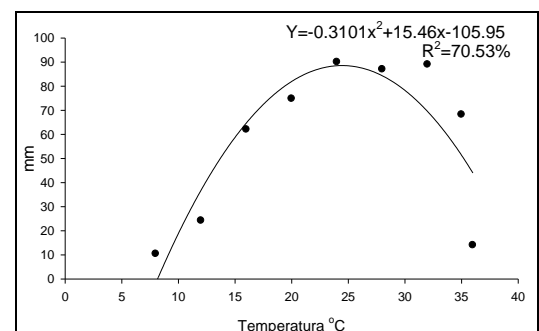
Isolado PR18



Isolado PR19

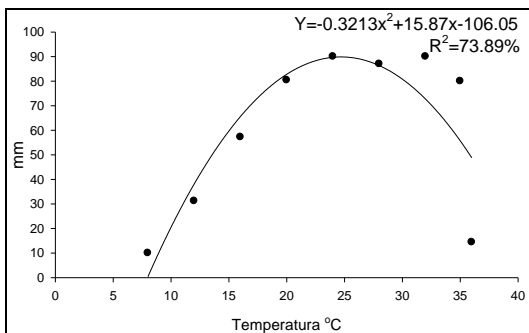


Isolado PR20

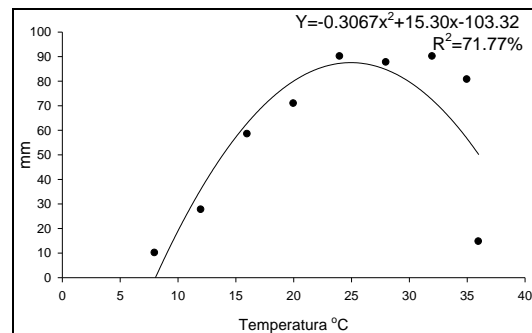


Isolado PR22

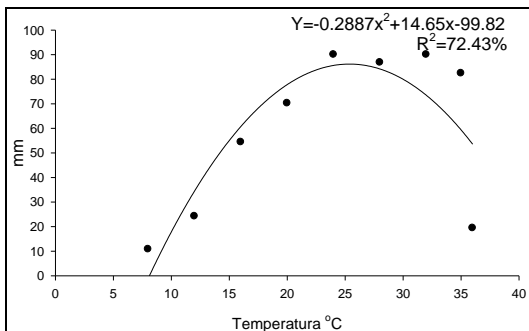
Continuação... (Figura 6).



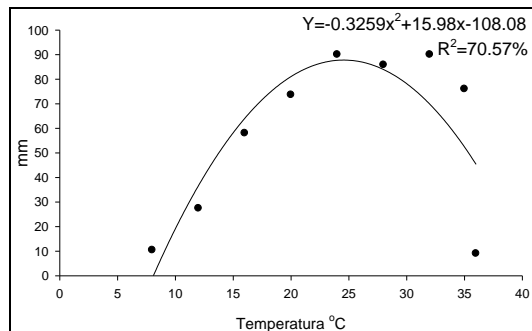
Isolado PR25



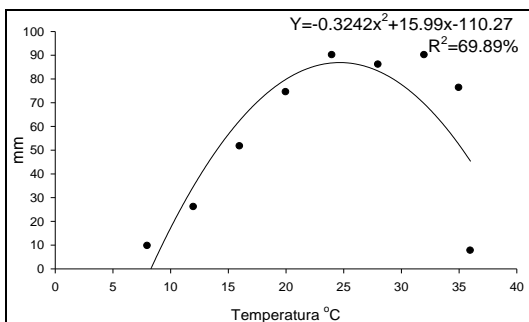
Isolado PR26



Isolado PR27



Isolado PR30



Isolado PR32

Continuação... (Figura 6).

Segundo Erwin e Ribeiro (1996), o crescimento micelial em altas temperaturas, máxima de 37° C para o gênero *Phytophthora*, é um caráter fisiológico que tem sido comumente usado para auxiliar na identificação de espécies desse gênero, que crescem bem em temperaturas altas, uma vez que as espécies possuem diferentes temperaturas máximas de crescimento. Essa característica pode ajudar a separar espécies que sejam morfologicamente semelhantes. Alves (2008) considerou o efeito da temperatura no crescimento micelial uma importante variável para classificar espécies de *Phytophthora* associadas a doenças em acácia-negra (*Acacia mearnsii*).

Muniz et al. (2004) também relataram que os limites de temperatura máxima e mínima para o crescimento micelial são uma característica, que pode ser muito importante na identificação de algumas espécies de *Phytophthora*.

Neste trabalho, a faixa de temperatura ótima para o crescimento micelial de 20 dos 21 isolados foi semelhante à descrição de temperatura ótima para a espécie *P. nicotianae* proposta por Erwin e Ribeiro (1996), compreendida entre 24 a 32° C. De acordo com Holliday (1980), a temperatura ótima para crescimento micelial de *P. nicotianae* está entre 25 a 30° C.

Apenas um isolado, PR20, teve como temperatura ótima para crescimento 21,3° C sendo a faixa ótima para crescimento micelial compreendida entre 20 a 28° C. Segundo Erwin e Ribeiro (1996), *P. citrophthora* apresenta pico de crescimento micelial a 21° C. No entanto Graham e Timmer (1995), estudando a podridão marrom em citros em regiões do Mediterrâneo, observaram que, nessa espécie, a temperatura ótima para crescimento micelial se situa na faixa de 18 a 25° C.

Para McLennas (1936) essa faixa se situa entre 25 a 27,5 °C. Também Matheron e Matejka (1992) testaram o efeito da temperatura no crescimento micelial das espécies *P. nicotianae* e *P. citrophthora* causando podridão do pé e raízes em citros no Arizona e concluíram que a melhor temperatura para *P. nicotianae* foi de 30° C e que esta desenvolveu um crescimento micelial apreciável a 35° C, enquanto que *P. citrophthora* foi de 25° C não apresentando nenhum crescimento aos 35° C.

4.4. Características culturais e morfológicas de colônias

Os 21 isolados que foram patogênicos ao limão 'Cravo' pertencente a *Phytophthora* spp., em meio de cultivo CA (cenoura-agar), apresentaram três padrões de crescimento micelial. Somente o isolado PR20 apresentou micélio superficial pouco denso; oito isolados apresentaram micélio aéreo pouco denso (PR7, PR8, PR9, PR11, PR14, PR17, PR18, PR19) e 12 isolados apresentaram micélio aéreo denso (PR1, PR2, PR3, PR4, PR5, PR6, PR22, PR25, PR26, PR27 PR30, PR32). Os padrões de colônias observados se enquadraram quatro tipos: cotonoso (isolados PR1, PR2, PR3, PR4, PR5, PR6, PR17, PR18, PR22, PR30), estrelado (isolado PR20), ligeiramente rosáceo

(isolados PR9, PR11, PR14, PR19, PR25, PR26, PR27), estrelado para rosáceo (isolados PR7, PR8, PR32) (Tabela 8 e Figura 7). Alves (2008), trabalhando com *Phytophthora nicotianae* associada à gomose em acácia-negra da região Sul do Brasil, observou em meio CA que houve variações entre isolados quanto às características de formação do micélio aéreo, variando de denso a pouco denso e colônias com padrões estrelado, cotonoso, rosácea, estrelado para rosáceo, ligeiramente estrelado e ligeiramente rosácea.

Islam et al. (2005) sugerem que essa variação entre isolados da mesma espécie pode ser atribuída ao genótipo de cada isolado, cuja expressão fenotípica está relacionada com a interação entre genótipo e condições do meio, principalmente meio de cultura e temperatura de incubação. Segundo Erwin e Ribeiro (1996), os padrões de colônias e tipo de micélio são características pouco úteis na identificação de espécies de *Phytophthora*.

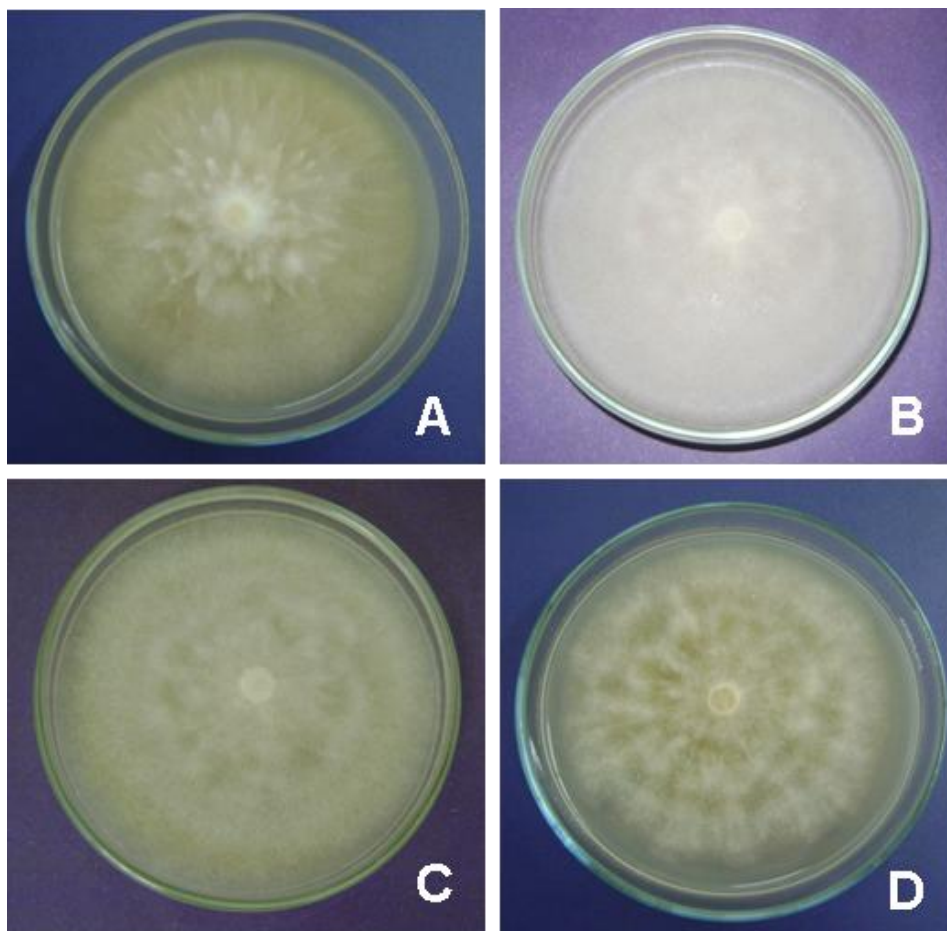


Figura 7. Morfologia das colônias de *Phytophthora*. (A) estrelado- *P. citrophthora*; (B) cotonoso, (C) rosáceo, (D) estrelado para rosáceo- *P. nicotianae*.

4.5. Avaliação da esporulação

Quanto à produção de esporângios, houve diferenças entre os 21 isolados, dependendo do meio de cultivo, à temperatura ambiente (22 a 28^o C) (Tabela 5). De maneira geral, para o meio de cultivo V8-ágar, houve maior esporulação, do que para o meio de cultivo CA. No entanto, o isolado PR20 não esporulou em ambos os meios de cultivo e os isolados PR4 e PR19 apresentaram baixa formação de esporângios. Os isolados PR8 e PR18 esporularam, abundantemente, em V8-ágar. Os isolados PR14, PR17, PR19, PR20, PR22 e PR25 não esporularam no meio CA e os demais isolados apresentaram baixa esporulação neste meio de cultivo. Em meio líquido extrato de solo não autoclavado, todos os isolados esporularam abundantemente.

Silva e Doihara (2003) testaram diferentes meios de cultura para obter uma abundante esporulação com isolado de *Phytophthora palmivora* em meio sólido. Foram testados os meios de cultura CA, V-8 + CaCO₃ e BDA em BOD a 25^o C sob iluminação constante durante dez dias. Nesse estudo, foi observado uma maior produção de esporângios do isolado no meio de cultura V-8 + CaCO₃. Abdanur et al. (2003) também testaram estes mesmos meios de cultura utilizando isolados de *Phytophthora* sp. patogênicos à acácia-negra e observaram que os isolados produziram raros esporângios. Uma maior esporulação foi obtida na presença de meio líquido (solução de KNO₃ e água destilada esterilizada), na presença de luz contínua.

Tabela 5. Esporulação de isolados de *Phytophthora* spp. associados à gomose do citros nos meios V8-ágar e cenoura-agar (CA).

Isolado	Meio V8-ágar	Meio CA	Isolado	Meio V8-ágar	Meio CA
PR1	**	*	PR17	**	-
PR2	**	*	PR18	***	*
PR3	**	*	PR19	*	-
PR4	*	*	PR20	-	-
PR5	**	*	PR22	**	-
PR6	**	*	PR25	**	-
PR7	**	*	PR26	**	*
PR8	***	*	PR27	**	*
PR9	**	*	PR30	**	-
PR11	**	*	PR32	***	*
PR14	**	-			

- * Poucos esporângios (de 1 a 5 por campo de observação);
 ** Quantidade mediana (de 6 a 15 por campo de observação);
 *** Esporângios abundantes (acima de 16 por campo);
 - Ausência de esporângios;
 Campo de observação com aumento de 100 x

4.6. Avaliação das estruturas reprodutivas

4.6.1. Morfologia e dimensão de esporângios e clamidósporos

Para as dimensões comprimento (C) e largura (L) dos esporângios formados no meio extrato de solo, houve variações entre os isolados. O maior comprimento foi verificado para o isolado PR20, com média de 52,6 µm, e o menor foi verificado para o isolado PR3, com média de 36,0 µm. Com relação aos limites superiores e inferiores, no intervalo de dimensão de esporângio, observaram-se valores de 25,5 - 65,8 µm para comprimento e de 18,6 - 49,6 µm para largura. A relação C/L foi de 1,3:1, profundidade média da papila foi de 6,1 µm e abertura média de 5,8 µm (Tabela 6). Estas dimensões estão dentro daquelas preconizadas para *P. citrophthora* quanto aos valores máximos encontrados e para *P. nicotianae* os demais valores.

Muniz et al. (2004), caracterizando nove isolados de *Phytophthora*, encontraram intervalos de dimensões de esporângios cujo comprimento foi de

24,6 - 78,7 μm e largura de 16,4 - 49,2 μm , semelhantes aos observados neste trabalho, enquadrando-os na espécie *P. nicotianae*. Santos et al. (2005), também classificando espécie de *Phytophthora* associada à doença em acácia-negra, encontraram resultados semelhantes para dimensões de esporângios e enquadraram o patógeno na espécie *P. nicotianae*. Embora Erwin e Ribeiro (1996) caracterizando *P. nicotianae*, citaram a ocorrência de intervalos de dimensões de esporângios um pouco menores para a espécie *P. nicotianae*, os autores afirmaram que essas pequenas variações podem ocorrer, não caracterizando como uma espécie diferente. Já Feichtenberger (1990), Luz et al. (2001) observaram valores de 27 - 60 μm para o comprimento e de 18,7 - 40,0 μm para a largura, também para isolados de *P. nicotianae* originados de citros. Estes valores são pouco menores em relação aos encontrados neste trabalho, mas, segundo Feichtenberger (1990), esses valores estão dentro das possibilidades de variações das dimensões de esporângios, não evidenciando, assim, ser outra espécie que não *P. nicotianae*. Gallegly e Hong (2008) observaram em isolados de *P. nicotianae* como forma esporangial mais comum a ovóide, mas muitos estão entre esféricos e elipsóides, sendo as dimensões médias dos esporângios entre 45 a 37 μm (razão C/L 1.2:1).

Em 1906, Smith e Smith relataram pela primeira vez a existência de *P. citrophthora* em pomares de citros da Califórnia. Os esporângios observados eram ovalados ou limoniformes, e às vezes, alongados com protuberância terminal medindo entre 20 a 30 μm de largura por 60 a 90 μm de comprimento (média de 35 a 50 μm). Esses valores são semelhantes aos encontrados nos isolados de citros deste estudo quanto aos valores referentes ao comprimento dos esporângios, porém são relativamente menores quanto à largura dessas estruturas. Assim, apenas o isolado PR20, cujas medidas foram 40,3 - 65,8 μm de comprimento e 27,9 - 37,2 μm de largura, é o que mais se aproxima e pode-se enquadrar nessa classificação proposto pelos autores para a espécie *P. citrophthora*.

No entanto, Feichtenberger (1990) encontrou valores bem maiores para as dimensões de esporângios em isolados de citros para a espécie *P. citrophthora* que variaram de 33 - 108 μm para o comprimento e de 22 - 64 μm para a largura. Também Erwin e Ribeiro (1996) descrevem os esporângios da espécie *P. citrophthora* com formas muito variadas: elipsóide amplamente

ovóide, globoso, limoniforme ou muito distorcidos com papila proeminente alguns isolados com duas ou mais papilas. A dimensão dos esporângios variou de 27 - 65,3 μm para o comprimento e de 18,8 - 40,4 μm para a largura com uma relação C/L variando de 1,3:1 - 1,8:1. Paim (2005) observou dimensões de esporângios de isolados de *Phytophthora citrophthora* originados de cacauero de 49,8 \pm 2,8 x 28,2 \pm 1,2 μm . Esses resultados foram um pouco menores que os do isolado PR20, provavelmente pertencente a espécie *P. citrophthora*. No entanto, esses valores estão dentro dos padrões descritos por Waterhouse (1963) e Stamps et al. (1990).

Embora os esporângios de *P. citrophthora* serem descritos por Stamps et al. (1990) como sendo caducos em alguns isolados, mas não em outros, Mchau e Coffey (1994), numa análise de 77 isolados, todos foram não caducos. As formas são variáveis estendendo-se de esférico, ovóide, obpiforme, obturbinado para elipsóide, cujas dimensões são 23 a 90 x 18 a 60 μm (média 45 a 30 μm) e a relação C/L é de 1,2:1 para 2,0:1, (média 1:4). Esses valores são também similares aos encontrados nesta pesquisa.

Tabela 6. Dimensões de esporângios de isolados de *Phytophthora* spp. originados de citros e produzidos no substrato extrato de solo.

Isolado	Dimensão do esporângio (μm)		C/L	Dimensão da papila (μm)	
	Comprimento (C)	Largura (L)		Profundidade	Largura
PR1	62,0 ¹ - 48,4 ² - 34,1 ³ ($\pm 5,76$) ⁴	46,5 - 33,8 - 24,8 ($\pm 3,6$)	1,4	12,4 - 7,7 - 3,1 ($\pm 1,7$)	9,3 - 6,9 - 3,1 ($\pm 1,6$)
PR2	62,0 - 36,6 - 26,8 ($\pm 7,6$)	40,3 - 25,6 - 18,6 ($\pm 4,9$)	1,4	9,3 - 5,7 - 3,1 ($\pm 2,0$)	9,3 - 4,8 - 3,1 ($\pm 1,9$)
PR3	58,9 - 36,0 - 25,5 ($\pm 6,8$)	43,4 - 27,8 - 21,7 ($\pm 5,2$)	1,3	9,3 - 6,1 - 3,1 ($\pm 1,4$)	9,3 - 6,1 - 3,1 ($\pm 1,9$)
PR4	55,8 - 43,4 - 27,9 ($\pm 6,5$)	49,6 - 31,3 - 24,8 ($\pm 4,2$)	1,3	9,3 - 6,3 - 3,1 ($\pm 1,3$)	9,3 - 7,3 - 4,6 ($\pm 1,4$)
PR5	55,8 - 39,9 - 27, ($\pm 6,6$)	40,3 - 28,9 - 21,7 ($\pm 3,9$)	1,3	9,3 - 5,4 - 3,1 ($\pm 1,5$)	9,3 - 5,7 - 3,1 ($\pm 1,4$)
PR6	58,9 - 46,4 - 34,1 ($\pm 5,8$)	40,3 - 30,7 - 24,8 ($\pm 2,7$)	1,5	10,8 - 7,0 - 4,6 ($\pm 1,4$)	9,3 - 6,5 - 4,6 ($\pm 1,3$)
PR7	55,8 - 43,9 - 34,1 ($\pm 4,9$)	46,5 - 31,8 - 24,8 ($\pm 4,2$)	1,3	9,3 - 6,2 - 4,6 ($\pm 1,1$)	9,3 - 6,0 - 3,1 ($\pm 1,2$)
PR8	58,9 - 48,7 - 31,0 ($\pm 6,1$)	46,5 - 33,2 - 27,9 ($\pm 4,5$)	1,4	9,3 - 6,0 - 3,1 ($\pm 1,1$)	9,3 - 6,1 - 3,1 ($\pm 1,4$)
PR9	55,8 - 43,1 - 34,1 ($\pm 6,2$)	40,3 - 31,6 - 24,8 ($\pm 3,7$)	1,4	9,3 - 5,7 - 3,1 ($\pm 1,3$)	9,3 - 5,3 - 3,1 ($\pm 1,4$)
PR11	49,6 - 42,2 - 34,1 ($\pm 3,5$)	37,2 - 29,8 - 24,8 ($\pm 2,4$)	1,4	7,7 - 5,2 - 3,1 ($\pm 1,2$)	7,7 - 5,3 - 3,1 ($\pm 1,2$)
PR14	55,8 - 43,8 - 27,9 ($\pm 5,8$)	40,3 - 30,6 - 24,8 ($\pm 3,7$)	1,4	9,3 - 5,9 - 3,1 ($\pm 1,2$)	9,3 - 5,7 - 3,1 ($\pm 1,6$)
PR17	55,8 - 45,5 - 37,2 ($\pm 4,9$)	37,2 - 31,1 - 18,6 ($\pm 3,3$)	1,4	9,3 - 5,6 - 3,1 ($\pm 1,4$)	9,3 - 5,7 - 3,1 ($\pm 1,3$)
PR18	62,0 - 47,4 - 37,2 ($\pm 5,6$)	40,3 - 33,3 - 24,8 ($\pm 3,6$)	1,4	9,3 - 4,6 - 3,1 ($\pm 1,3$)	9,3 - 4,5 - 3,1 ($\pm 1,4$)
PR19	49,6 - 40,5 - 31,0 ($\pm 5,3$)	37,2 - 29,6 - 24,8 ($\pm 3,0$)	1,3	9,3 - 4,7 - 3,1 ($\pm 1,4$)	6,2 - 4,4 - 3,1 ($\pm 1,1$)
PR20	65,8 - 52,6 - 40,3 ($\pm 3,3$)	37,2 - 31,2 - 27,9 ($\pm 2,1$)	1,4	6,2 - 5,0 - 3,1 ($\pm 1,1$)	6,2 - 5,3 - 3,1 ($\pm 0,9$)
PR22	55,8 - 46,9 - 31,0 ($\pm 5,3$)	45,8 - 33,7 - 27,9 ($\pm 3,9$)	1,4	9,3 - 5,5 - 3,1 ($\pm 1,2$)	9,3 - 6,2 - 4,6 ($\pm 1,4$)
PR25	55,8 - 50,2 - 40,3 ($\pm 4,1$)	40,3 - 33,2 - 27,9 ($\pm 3,4$)	1,5	9,3 - 5,5 - 3,1 ($\pm 1,2$)	9,3 - 5,6 - 3,1 ($\pm 1,2$)
PR26	55,8 - 45,5 - 34,1 ($\pm 6,4$)	40,3 - 32,1 - 27,9 ($\pm 3,8$)	1,4	9,3 - 5,5 - 3,1 ($\pm 1,1$)	9,3 - 5,9 - 3,1 ($\pm 1,7$)
PR27	58,9 - 47,6 - 37,2 ($\pm 5,7$)	40,3 - 32,9 - 27,9 ($\pm 4,0$)	1,4	9,3 - 6,3 - 3,1 ($\pm 1,3$)	9,3 - 6,6 - 3,1 ($\pm 1,6$)
PR30	55,80 - 46,5 - 34,1 ($\pm 5,4$)	40,3 - 31,1 - 24,8 ($\pm 3,2$)	1,4	6,2 - 5,3 - 3,1 ($\pm 1,1$)	9,3 - 5,8 - 3,1 ($\pm 1,3$)
PR32	52,7 - 46,9 - 37,2 ($\pm 3,9$)	37,2 - 30,5 - 24,8 ($\pm 2,9$)	1,5	9,3 - 5,4 - 3,1 ($\pm 1,2$)	9,3 - 6,0 - 3,1 ($\pm 1,3$)

¹Limite superior; ²Média de 50 esporângios; ³Limite inferior; ⁴Desvio padrão.

Todos os isolados, a exceção do PR20, formaram clamidósporos em abundância no meio de cultura CA e em meio líquido extrato de solo (Tabela 7, Figura 8). Os clamidósporos se apresentaram de formato globoso (esférico), com paredes lisas, às vezes, amareladas, terminais ou intercalares com

diâmetro variando de 21,7 - 43,4 μm (média de 32,2 μm) e espessura da parede de 1,2 - 3,1 μm (média 1,9 μm).

Os 20 isolados que produziram clamidósporos abundantemente, nos referidos meios de cultivo, foram classificados como *P. nicotianae*. Já o isolado PR20, classificado como *P. citrophthora*, não produziu clamidósporos em nenhum dos meios testados.

De acordo com Stamps (1990), as características dos clamidósporos podem ser usadas como caráter taxonômico para diferenciar algumas espécies de *Phytophthora*. Erwin e Ribeiro (1996) citaram que, pelo fato da morfologia dos clamidósporos não variarem apreciavelmente entre as espécies de *Phytophthora*, a significância desse caráter na taxonomia, na maioria das vezes, se limita à sua presença ou ausência. Segundo Smith (2007), entre cerca de 80 espécies de *Phytophthora* descritas, 35 delas formaram estruturas de sobrevivência tipo clamidósporos e segundo Erwin e Ribeiro (1996), entre elas, está *P. nicotianae*. Luz et al. (2001) classificaram os clamidósporos desta espécie como sendo esporos de resistência, produzidos abundantemente após alguns dias de idade da colônia, com dimensão entre 22 a 30 μm de diâmetro e parede espessa (3 a 4 μm). Ainda segundo os autores, a produção de clamidósporos ocorre quando as condições são desfavoráveis ao seu crescimento micelial. Sob condições favoráveis, os clamidósporos germinam indiretamente, produzindo esporângios e zoósporos, ou diretamente, formando micélio.

Alves (2008) observou a presença de clamidósporos em 12 isolados de *P. nicotianae* da acácia-negra, cujo diâmetro foi de 24,8 a 55,8 μm (média de 37,16 μm). Estes eram de paredes espessas, variando de 1,55 a 6,2 μm , apresentando-se globosos, terminais ou intercalares. Muniz et al. (2004), na caracterização de nove isolados de *P. nicotianae*, observaram a formação de clamidósporos, predominantemente terminais com diâmetro variando de 13,1-45,9 μm (média = 27,3 μm). No entanto Gallegly e Hong (2008) observaram em *P. nicotianae* clamidósporo terminal ou intercalar (cerca de 30 μm de diâmetro), na maioria dos isolados, e temperatura máxima de crescimento de 35° C.

Em meio líquido de cenoura, PAIM (2005) observou produção rara de clamidósporos por *P. citrophthora* originada de citros. No entanto, Vial et al.

(2006), caracterizando espécies de *P. citrophthora* e *P. inundata*, observaram a ausência de formação de clamidósporos para essas duas espécies.

P. citrophthora é classificada no grupo II (STAMPS et al., 1990). Segundo Erwin e Ribeiro (1996), os clamidósporos presentes em alguns isolados são terminais e intercalares, semi-esféricos, 10 a $43 \pm 5,2$ μm de diâmetro, alguns com forma irregular, hialinos, formando dentro de sete dias, paredes grossas com 0,5 a 1,5 μm quando produzidos em meio de cultivo V8 ágar em escuro a 25° C. Mchau e Coffey (1994) relataram que clamidósporos dessa espécie foram encontrados apenas em isolados de cacau no Brasil, com 10 a 43 μm de diâmetro e hialinos. Estes foram produzidos isoladamente ou em cachos.

Tabela 7. Dimensões dos clamidósporos produzidas por isolados de *Phytophthora* spp. originados de citros em extrato de solo.

Isolado	Dimensões do clamidósporo (μm)	
	Diâmetro	Espessura da parede
PR1	40,3 ¹ - 34,4 ² - 29,4 ³ ($\pm 3,1$) ⁴	3,1 ¹ - 1,5 ² - 1,2 ³ ($\pm 0,2$) ⁴
PR2	40,3 - 31,4 - 23,2 ($\pm 4,1$)	1,5 - 1,5 - 1,5 ($\pm 0,0$)
PR3	37,2 - 31,3 - 24,8 ($\pm 3,0$)	2,1 - 1,5 - 1,5 ($\pm 0,1$)
PR4	40,3 - 31,8 - 24,8 ($\pm 3,4$)	3,1 - 1,4 - 1,5 ($\pm 0,4$)
PR5	37,2 - 29,0 - 24,8 ($\pm 3,0$)	1,5 - 1,5 - 1,5 ($\pm 0,0$)
PR6	40,3 - 32,2 - 24,8 ($\pm 4,5$)	3,1 - 2,3 - 1,5 ($\pm 0,7$)
PR7	43,4 - 36,5 - 27,9 ($\pm 4,0$)	3,1 - 2,5 - 1,5 ($\pm 0,7$)
PR8	43,4 - 33,0 - 24,8 ($\pm 4,1$)	3,1 - 1,8 - 1,5 ($\pm 0,6$)
PR9	40,3 - 32,3 - 27,9 ($\pm 3,4$)	3,1 - 2,0 - 1,5 ($\pm 0,7$)
PR11	43,4 - 35,5 - 27,9 ($\pm 3,8$)	3,1 - 2,7 - 1,5 ($\pm 0,6$)
PR14	40,3 - 34,2 - 27,9 ($\pm 3,9$)	3,1 - 2,5 - 1,5 ($\pm 0,7$)
PR17	35,6 - 30,2 - 24,8 ($\pm 2,8$)	3,1 - 2,1 - 1,5 ($\pm 0,7$)
PR18	37,2 - 33,0 - 27,9 ($\pm 2,8$)	3,1 - 2,4 - 1,5 ($\pm 0,7$)
PR19	40,3 - 30,4 - 21,7 ($\pm 4,6$)	3,1 - 2,0 - 1,5 ($\pm 0,7$)
PR20	---	---
PR22	43,4 - 34,0 - 24,8 ($\pm 4,8$)	3,1 - 1,5 - 1,5 ($\pm 0,2$)
PR25	37,2 - 30,1 - 24,8 ($\pm 3,8$)	1,5 - 1,5 - 1,5 (0,0)
PR26	37,2 - 29,6 - 24,8 ($\pm 2,8$)	3,1 - 2,0 - 1,5 ($\pm 0,7$)
PR27	43,4 - 32,5 - 21,7 ($\pm 4,9$)	3,1 - 1,9 - 1,5 ($\pm 0,7$)
PR30	40,3 - 29,6 - 23,2 ($\pm 3,4$)	1,5 - 1,5 - 1,5 (0,0)
PR32	40,3 - 33,2 - 24,8 ($\pm 3,8$)	3,1 - 1,8 - 1,5 ($\pm 0,6$)

¹Limite superior; ²Média de 50 clamidósporos; ³Limite inferior; ⁴Desvio padrão.

--- Não forma clamidósporo.

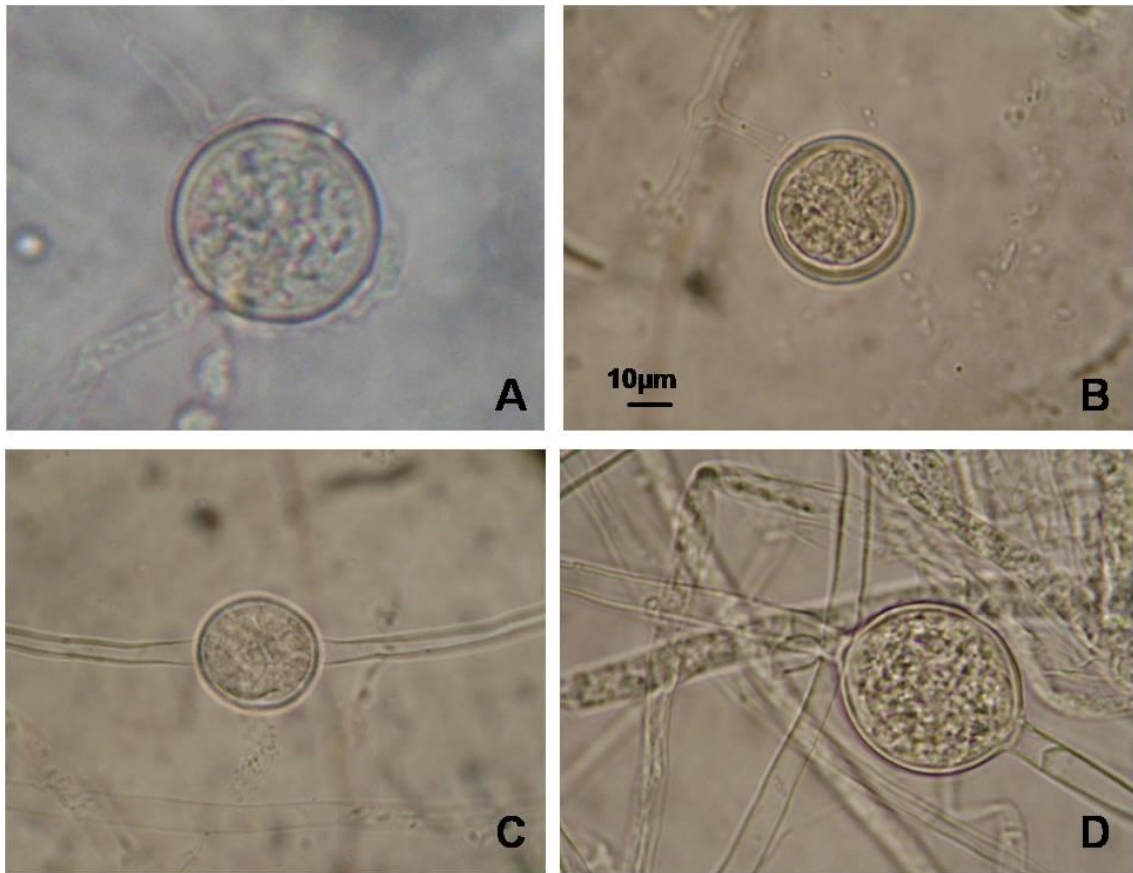


Figura 8. Imagem microscópica-Clamidosporos: (A e B) terminal; (C e D) intercalar.

4.6.2. Ontogenia dos esporângios

Em extrato de solo não autoclavado, todos os isolados produziram esporângios papilados e persistentes (Figura 9). Quanto ao formato dos esporângios houve diferenças entre isolados (Tabela 8), com variações entre ovóide, globoso, limoniforme, obpiriforme, distorcida, papilados e bipapilados, com predominância das formas ovóide, globoso, limoniforme e papilados, dependendo do isolado. Isolados PR1, PR2, PR3, PR5, PR8, PR14, PR17, PR19, PR22, PR25, PR26, PR27 e PR30 formaram esporângios ovóides globosos, isolados PR4 e PR9 formaram esporângios obpiriformes globosos e os isolados PR6, PR7, PR11, PR18, PR20 e PR32 formaram isolados limoniformes globosos, sendo que o isolado PR20 apresentou vários esporângios bipapilados e formas distorcidas.

Quanto à disposição do esporângio no esporangióforo, observaram-se diferenças entre os isolados: simpodial simples ou irregularmente simpodial (Figura 9E e 9F).

Alves (2008), testando sete meios líquidos para esporulação de *P. nicotianae*, constatou que extrato de solo não autoclavado foi o melhor, observando-se maior produção de esporângio para observação dessas estruturas e sua ontogenia.

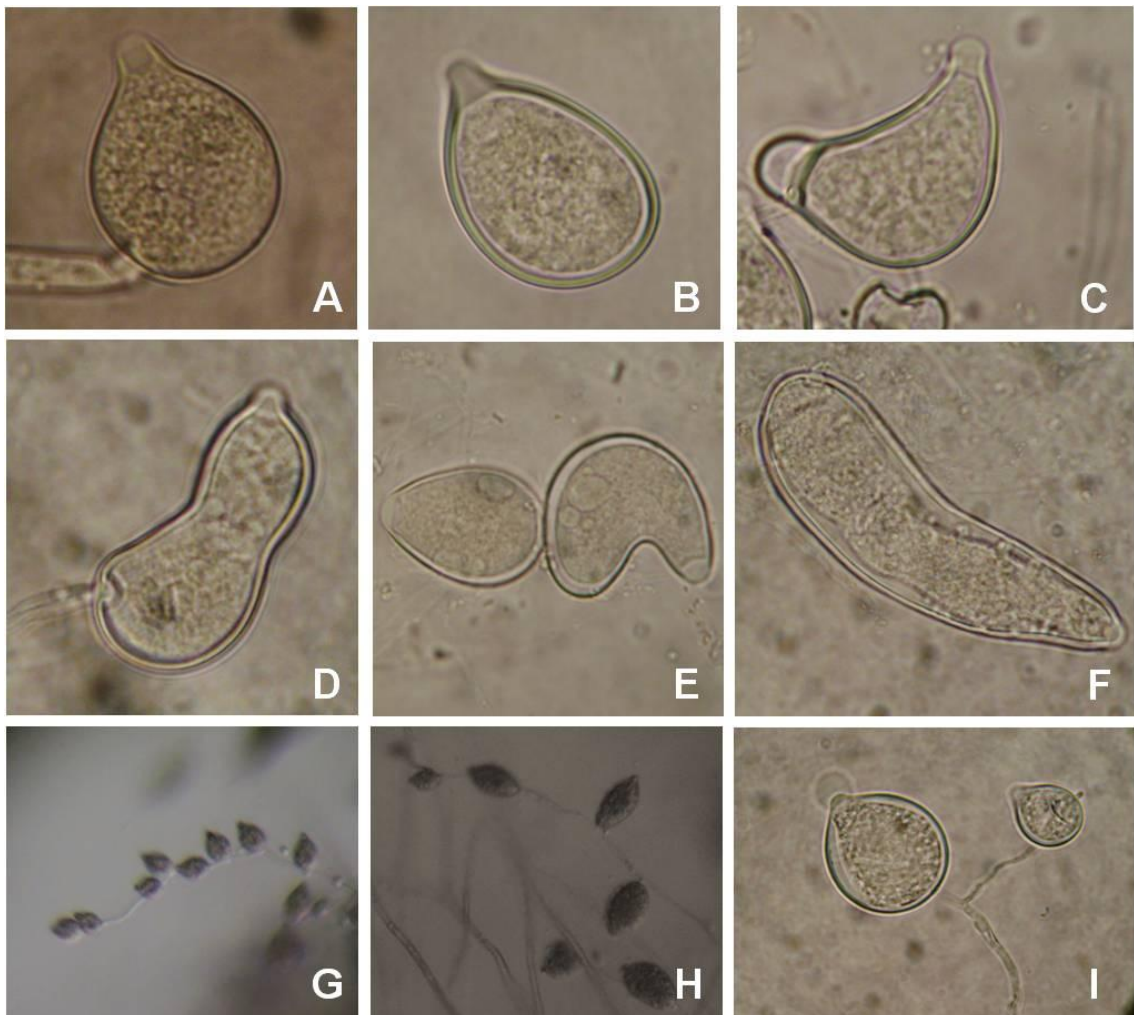


Figura 9. Tipos de esporângios produzidos por *Phytophthora* e sua ontogenia: (A) ovóide; (B) limoniforme; (C) bipapilado; (D, E e F) distorcido; (G) simpodial irregular; (H e I) simpodial simples.

Tabela 8. Características de colônias formadas por isolados de *Phytophthora* originado de citros em meio de cultivo cenoura-ágar (CA).

Isolado	Colônia		Esporângio
	Colônia	Micélio	Forma
PR1	Cotonosa	Aéreo, denso	Papilado, ovóide, globoso
PR2	Cotonosa	Aéreo, denso	Papilado, ovóide, globoso
PR3	Cotonosa	Aéreo, denso	Papilado, ovóide, globoso
PR4	Cotonosa	Aéreo, denso	Papilado, obpiriforme globoso
PR5	Cotonosa	Aéreo, denso	Papilado, ovóide, globoso
PR6	Cotonosa	Aéreo, denso	Papilado limoniforme, globoso
PR7	Estrelada para rosácea	Aéreo, pouco denso	Papilado, limoniforme, globoso
PR8	Estrelada para rosácea	Aéreo, pouco denso	Papilado, ovóide, globoso
PR9	Ligeiramente rosácea	Aéreo, pouco denso	Papilado, obpiriforme globoso
PR11	Ligeiramente rosácea	Aéreo, pouco denso	Papilado, limoniforme, globoso
PR14	Ligeiramente rosácea	Aéreo, pouco denso	Papilado, ovoide, globoso
PR17	Cotonosa	Aéreo, pouco denso	Papilado, ovóide, globoso
PR18	Cotonosa	Aéreo, pouco denso	Papilado, limoniforme, globoso
PR19	Ligeiramente rosácea	Aéreo, pouco denso	Papilado, ovóide, globoso
PR20	Estrelada	Superficial, pouco denso	Papilado, limoniforme, globoso
PR22	Cotonosa	Aéreo, denso	Papilado, ovóide, globoso
PR25	Ligeiramente rosácea	Aéreo, denso	Papilado, ovóide, globoso
PR26	Ligeiramente rosácea	Aéreo, denso	Papilado, ovóide, globoso
PR27	Ligeiramente rosácea	Aéreo, denso	Papilado, ovóide, globoso
PR30	Cotonosa	Aéreo, denso	Papilado, ovóide, globoso
PR32	Estrelada para rosácea	Aéreo, denso	Papilado, limoniforme, globoso

4.6.3. Compatibilidade de isolados de *Phytophthora* spp.

A formação dos oósporos foi observada após sete dias de incubação à temperatura de 26° C em escuro contínuo no meio de cultivo CA. Os oósporos se formaram na região de interseção das duas colônias dos isolados pareados na placa de Petri (Figura 10).

Dos 21 isolados testados, 20 isolados (*P. nicotianae*) foram compatíveis com o isolado padrão do grupo A2, formando oósporos. Isto indica que esses isolados são heterotáticos pertencentes ao grupo A1. Apenas um isolado (PR 20: *P. citrophthora*) foi compatível com o isolado padrão do grupo A1, também formando oósporos indicando pertencer ao grupo A2 (Tabela 9).

Pela análise morfométrica, dos 21 isolados testados, 20 isolados foram classificados como sendo *P. nicotianae* e apenas o isolado PR20 como *P. citrophthora*, com base na chave taxonômica de Stamps et al. (1990) (Tabela 10). Segundo esses autores, a formação de esporos não faz parte do ciclo de vida da espécie *P. citrophthora*, entretanto Mchau e Coffey (1994) relataram a produção desses esporos sexuais por alguns isolados (menos de 30%) dos 77 isolados por ele estudado de *P. citrophthora*, quando pareados com isolados do tipo compatível A2 de *P. capsici*. No presente trabalho o pareamento foi feito com o tipo compatível A1 (*P. nicotianae*), resultando na formação abundante de oósporos.

Também, Gallegly e Hong (2008) descreveram *P. nicotianae* como heterotático, capaz de formar estrutura sexual abundante em meio de cultura ágar-feijão lima, quando pareados com isolados dos tipos A1 e A2; oogônio esférico e liso, com diâmetro de 24 µm aproximadamente (entre 23 a 30 µm); oósporo aplerótico com diâmetro de 20 µm aproximadamente; anterídio anfígeno e essencialmente esférico, com cerca de 13 µm de diâmetro; esporângio papilado (ocasionalmente bipapilado) e persistente, porém raramente caduco com pedicelo curto deslocado. Em adição, os autores também relatam que espécie *P. citrophthora* é considerada heterotática produzindo oósporos quando pareadas com tipo A1 de isolados de *P. capsici* e *P. cinnamomi*. Portanto, existe a possibilidade de cruzamento entre as espécies.

Tabela 9. Grupo de compatibilidade, dimensões do oogônio e oósporo, e tipo do anterídio de isolados de *Phytophthora* spp. originados de citros.

Isolado	Grupo de compatibilidade	Diâmetro (μm)		
		Oogônio	Oósporo	Anterídio
PR1	A1	23,2 ¹ - 28,4 ² - 32,5 ³ ($\pm 2,0$) ⁴	18,6 ¹ - 23,0 ² - 27,9 ³ ($\pm 2,4$) ⁴	Anfígeno
PR2	A1	23,2 - 28,3 - 32,5 ($\pm 2,7$)	18,6 - 22,7 - 27,9 ($\pm 2,7$)	Anfígeno
PR3	A1	23,2 - 28,6 - 34,1 ($\pm 2,6$)	18,6 - 23,3 - 29,4 ($\pm 2,9$)	Anfígeno
PR4	A1	23,2 - 28,5 - 34,1 ($\pm 2,8$)	18,6 - 22,5 - 27,9 ($\pm 2,8$)	Anfígeno
PR5	A1	23,2 - 27,3 - 32,5 ($\pm 2,5$)	18,6 - 21,7 - 26,3 ($\pm 2,62$)	Anfígeno
PR6	A1	23,2 - 27,1 - 32,5 ($\pm 2,4$)	18,6 - 21,9 - 26,3 ($\pm 2,3$)	Anfígeno
PR7	A1	21,7 - 26,9 - 34,1 ($\pm 2,7$)	18,6 - 21,6 - 27,9 ($\pm 2,3$)	Anfígeno
PR8	A1	21,7 - 28,3 - 31,0 ($\pm 2,16$)	18,6 - 22,8 - 27,9 ($\pm 2,2$)	Anfígeno
PR9	A1	21,7 - 25,3 - 34,1 ($\pm 2,4$)	13,9 - 20,2 - 27,9 ($\pm 2,2$)	Anfígeno
PR11	A1	21,7 - 27,8 - 34,1 ($\pm 2,7$)	18,6 - 22,1 - 27,9 ($\pm 2,5$)	Anfígeno
PR14	A1	24,8 - 29,3 - 35,6 ($\pm 2,3$)	18,6 - 23,2 - 27,9 ($\pm 2,2$)	Anfígeno
PR17	A1	21,7 - 26,2 - 31,0 ($\pm 2,8$)	18,6 - 21,2 - 26,3 ($\pm 2,2$)	Anfígeno
PR18	A1	23,2 - 27,1 - 32,5 ($\pm 2,3$)	18,6 - 22,3 - 29,4 ($\pm 2,8$)	Anfígeno
PR19	A1	21,7 - 27,1 - 32,5 ($\pm 2,2$)	18,6 - 22,0 - 26,3 ($\pm 2,2$)	Anfígeno
PR20	A2	22,4 - 27,5 - 31,3 ($\pm 2,4$)	17,8 - 21,9 - 26,8 ($\pm 2,4$)	Anfígeno
PR22	A1	21,7 - 26,7 - 31,0 ($\pm 2,0$)	18,6 - 21,2 - 26,3 ($\pm 2,0$)	Anfígeno
PR25	A1	21,7 - 26,1 - 29,4 ($\pm 1,9$)	18,6 - 21,0 - 24,8 ($\pm 1,9$)	Anfígeno
PR26	A1	21,7 - 25,1 - 31,0 ($\pm 1,9$)	17,0 - 19,9 - 24,8 ($\pm 1,6$)	Anfígeno
PR27	A1	20,1 - 25,1 - 31,0 ($\pm 2,2$)	17,0 - 19,9 - 24,8 ($\pm 1,6$)	Anfígeno
PR30	A1	24,8 - 27,0 - 32,5 ($\pm 2,2$)	18,6 - 22,1 - 27,9 ($\pm 2,5$)	Anfígeno
PR32	A1	20,1 - 25,7 - 31,0 ($\pm 2,6$)	17,0 - 21,2 - 27,9 ($\pm 3,0$)	Anfígeno

¹Limite inferior; ²Média de 50 oogônios ou oósporos; ³Limite superior; ⁴Desvio padrão.



Figura 10. Teste de compatibilidade: (A) Placa de Petri com culturas pareadas de *Phytophthora*; Oósporo aplerótico com anterídio em posição anfígeno, (B) *P. nicotianae*, (C) *P. citrophthora*.

4.6.4. Morfologia do anterídio e dimensões do oogônio e oósporo

Aos sete dias de incubação em câmara climatizada do tipo BOD, a $\pm 26^{\circ}$ C em escuro contínuo, observou-se a formação de oósporos em meio de cultura CA (Figura 10). O oogônio apresentou diâmetros variando de 20,1 - 35,6 μm (média 27,1 μm). Os oósporos apresentaram-se globosos, com diâmetro variando de 17,0 - 29,4 μm (média 21,6 μm). Não foram observadas ornamentações nas paredes dos oogônios de nenhum dos isolados. A forma do anterídio de todos os isolados apresentou-se na posição anfígeno e não houve formação de oogônios e anterídios em monocultura, tratando-se, portanto, de culturas heterotálicos.

P. nicotianae foi caracterizada por Waterhouse e Waterston (1964b) por produzir oogônios esféricos de 20 a 35 μm de diâmetro e oósporos com diâmetros de 20 a 30 μm e anterídios anfígenos. Por outro lado, Muniz et al. (2004) observaram em nove isolados de *P. nicotianae*, oogônios globosos, com 14,8 - 45,9 μm de diâmetro (média 26,4 μm), contendo oósporos apleróticos, medindo 11,5 - 29,5 μm de diâmetro (media 22,7 μm). Gallegly e Hong (2008) observaram oogônios lisos medindo de 23 - 30 μm de diâmetro (média 24 μm) e oósporos apleróticos com diâmetro médio de 20 μm .

As médias da dimensão dos oogônios e dos oósporos de cada isolado estão de acordo com os intervalos apresentados por Waterhouse e Waterston (1964b), Muniz et al. (2004), Gallegly e Hong (2008) em relação a *P. nicotianae*. Os valores apresentados para o isolado classificado como *P. citrophthora* estão dentro das mesmas médias apresentados pelos isolados de *P. nicotianae*.

4.7. Caracterização molecular

4.7.1. Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Os segmentos das regiões ITS1 e ITS2 e do gene 5.8S do rDNA amplificados de *Phytophthora* spp. apresentaram o mesmo tamanho para cada par de *primers*, sendo o par ITS3/ITS4 produzindo uma amplificação de aproximadamente 600 pares de base e ITS2/ITS5 com amplificação de aproximadamente 350 pares de base (Figura 11).

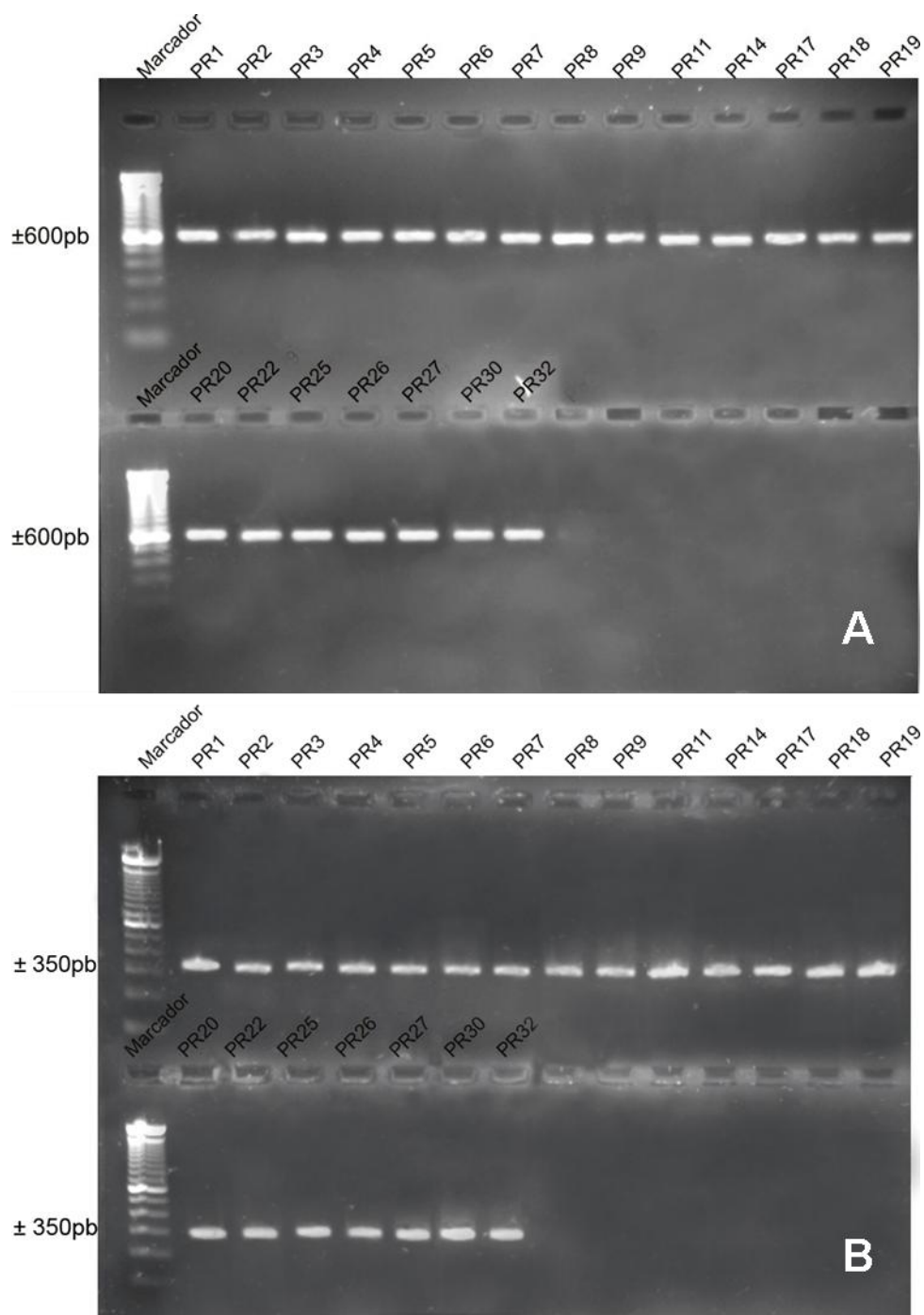


Figura 11. Bandas em gel de agarose mostrando o produto de PCR obtido com os pares de *primers* ITS4/ITS3 (A) e ITS5/ITS2 (B), compreendendo as regiões ITS1 ITS2 e 5.8S do rDNA de *Phytophthora* spp. de citros.

A homologia de bases de DNA entre os isolados de *Phytophthora* de citros, analisados neste estudo, variou de 90 a 100%. Isto significa que a similaridade dos isolados, baseada em segmentos amplificados com os *primers* ITS3/ITS4, foi de 90 a 100%, sendo que, entre os isolados de *P. nicotianae*, esta homologia foi de 99 a 100%. A menor homologia foi

encontrada entre o isolado PR20 (90% identificado como *P. citrophthora*), em relação aos demais isolados identificados como *P. nicotianae*.

As regiões do rDNA, ITS1 e ITS2 são amplamente usadas para estudos filogenéticos, por apresentarem variações entre espécies dentro do gênero, mas nenhuma ou muita variação intraespecífica (CHOWDAPPA et al., 2003). Outra vantagem é que esta região foi extensivamente sequenciada para a maioria das espécies de *Phytophthora* e outros fungos relacionados (COOKE et al., 2000). Segundo Hayden et al. (2004), esse fato tem ajudado no desenho de *primers* específicos para identificação de espécies.

Segundo Berbee e Taylor (1992) e Lee e Taylor (1992), as sequências de nucleotídeos das regiões internas transcritas (ITS1 e ITS2) do gene ribossomal 5.8S do rDNA, bem como o próprio gene 5.8S do rDNA, têm sido utilizadas na taxonomia de *Phytophthora* visando um rápido diagnóstico.

Em relação às espécies do gênero *Phytophthora*, a maioria dos trabalhos tem utilizado a técnica da PCR, geralmente associada à análise de sequência de genoma e outras técnicas moleculares, com a finalidade de detectar, identificar, caracterizar e diferenciar os isolados de espécies. MARTIN et al. (2009), estudando 47 isolados de *Phytophthora* sp. através da PCR, baseado na amplificação das regiões ITS, Cox1 e β -tubulina, juntamente com análises SSCP, classificaram todos eles em nível de espécies. Shen et al. (2005), trabalhando na identificação de 106 isolados fúngicos empregando a técnica da PCR, enquadraram-nos em 14 espécies de *Phytophthora* e 20 outras espécies de outros gêneros. Os autores usaram '*primers*' específicos PB1 e PB2, resultando numa amplificação de aproximadamente 750 pb. Ippolito et al. (2004) utilizaram dois *primers* específicos para *P. nicotianae* e *P. citrophthora* de citros com o objetivo de detectar e identificar, em tempo real, esses patógenos em solos e raízes de citros em viveiros com muito sucesso.

Estudos comparativos das sequências nucleotídicas de genes do RNA ribossomal (rDNA) permitem analisar e classificar isolados de espécies fúngicas com base filogenética em vários níveis taxonômicos (WHITE et al., 1990). Estes estudos têm elucidado a ligação evolucionária de muitas espécies de oomicetos (CRAWFORD et al., 1996; ERWIN e RIBEIRO 1996; APPIAH et al., 2004). Vários autores estudaram a região ITS de espécies de *Phytophthora*, entre eles pode se destacar: Lee e Taylor, (1992); Foster et al.,

(2000) e Ordonez et al., (2000). Appiah et al. (2004) analisaram 161 isolados de *Phytophthora* oriundos de cacau identificando quatro espécies e a análise das sequências rDNA permitiu dividir os isolados em dois grupos, sendo um representado por *P. capsici* e *P. citrophthora* e o outro por *P. palmivora* e *P. megakarya*. A comparação das sequências com aquelas da literatura publicada sugeriu que os isolados de *P. capsici* de cacau pertenceriam a espécie *P. tropicalis*, recentemente descrita infectando *Cyclamen* sp. e *Dianthus* sp..

Lee e Taylor (1992) estudando a diversidade filogenética da região ITS de 27 isolados de *Phytophthora* pertencentes a cinco espécies, observaram que existe maior similaridade entre isolados de *P. capsici* e *P. citrophthora*, do que isolados de *P. palmivora* e *P. megakarya*. A espécie *P. cinnamomi* distinguiu-se gradativamente das demais.

A árvore filogenética inferida pelo método de máxima parcimônia, resultante do consenso de cinco árvores mais parcimoniosas, mostrou que os 21 isolados de *Phytophthora* spp. provenientes de citros do Estado do Paraná, quando analisadas em conjunto com outros isolados de *Phytophthora* do *Gen Bank*, agruparam originando dois grupos com suporte pelo teste de “bootstrap” de 100% (Figura 12). O isolado PR20 agrupou-se com os isolados de *P. citrophthora* e os isolados PR1, PR2, PR3, PR4, PR5, PR6, PR7, PR8, PR9, PR17, PR18, PR19, PR25, PR26, PR27, PR30 e PR32 agruparam-se com *P. nicotianae*. Esses dois grupos formaram um clado com “bootstrap” de 100%, o qual incluem as espécies do “GenBank” *P. citrophthora* e *P. nicotianae* (= *P. parasitica*).

4.7.2 - Análise do Sequenciamento

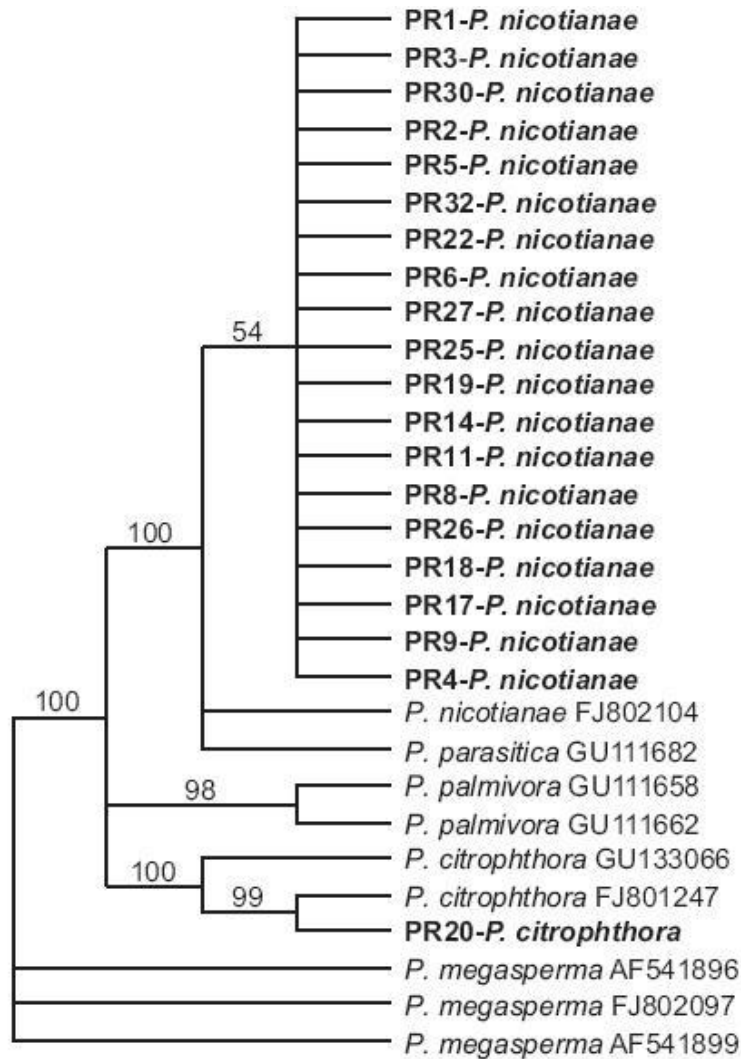


Figura 12. Árvore filogenética consenso inferida pelo método de máxima parcimônia a partir de sequências de DNA das regiões ITS1 e parte do gene 5.8S do rDNA de isolados de *Phytophthora* sp. de citros. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* nas quais as repetições foram observadas (1000 repetições). As sequências de rDNA dos isolados em negrito foram obtidas neste trabalho, enquanto as demais sequências foram obtidas do *GenBank* (com o número de acesso).

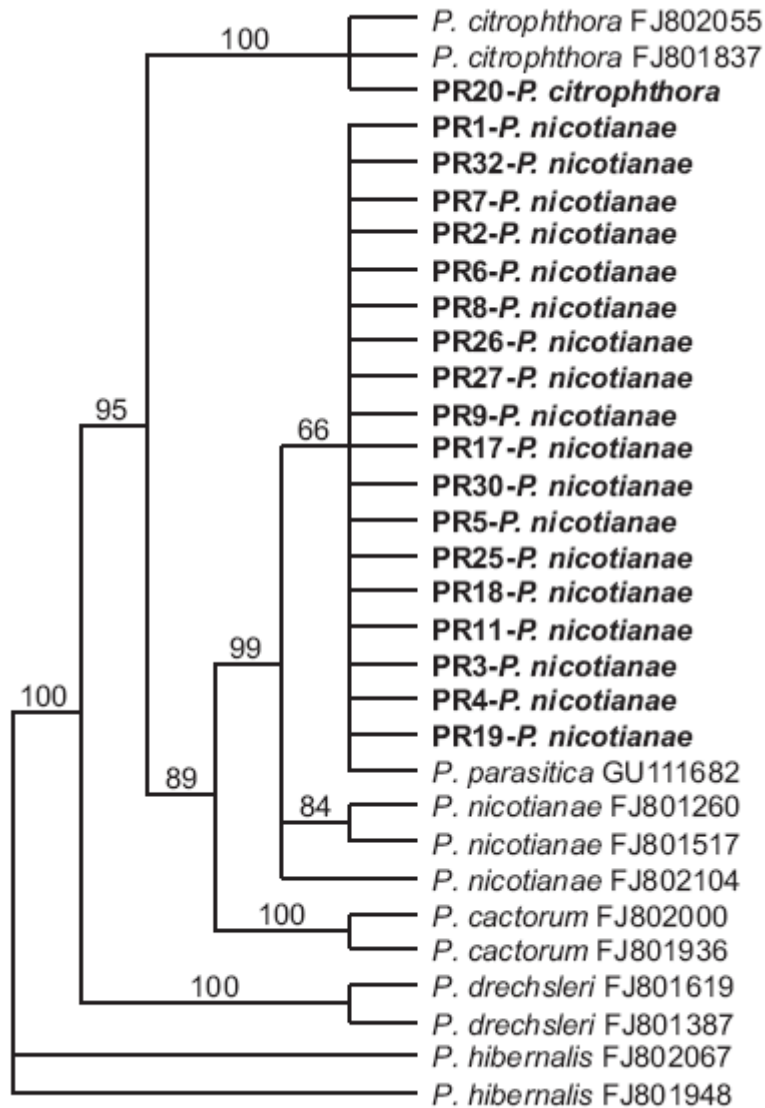


Figura 13. Árvore filogenética consenso inferida pelo método de máxima parcimônia a partir de sequências de DNA das regiões ITS2 e parte do gene 5.8S do rDNA de isolados de *Phytophthora* sp. de citros. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* nas quais as repetições foram observadas (1000 repetições). As sequências de rDNA dos isolados em negrito foram obtidas neste trabalho, enquanto as demais sequências foram obtidas do *GenBank* (com o número de acesso).

A análise dos resultados do sequenciamento do DNA dos isolados de *Phytophthora* originados de citros baseados na região ITS1 - 5.8S - ITS2 teve como finalidade a confirmação das duas espécies, que foram identificadas empregando características morfofisiológicas. Essas análises demonstraram que os 21 isolados de *Phytophthora*, associados à gomose em plantas de

citros utilizados nesse estudo, pertencem às espécies *P. citrophthora* (Isolado PR20) e *P. nicotianae* (20 isolados), que estão próximas às espécies depositadas no *Gen Bank*.

Os 21 isolados de *Phytophthora* de citros desse estudo além de apresentarem similaridade em relação às sequências das regiões ITS1, ITS2 e 5.8S gene do DNA ribossomal com as espécies depositadas no GenBank, morfológicamente apresentaram similaridades compatíveis com a chave taxonômica de Stamps (1990). Portanto, foi possível confirmar as espécies de *Phytophthora* de citros que causam danos nos pomares do Estado do Paraná, tanto pelos dados moleculares como pelos dados morfológicos a existência das duas espécies predominantes no Brasil, *P. nicotianae* sempre relatada com muita frequência e *P. citrophthora* com menor frequência.

Dos 21 isolados estudados, o maior número encontrado para *P. nicotianae* (20 isolados) evidencia o que a literatura tem relatado (FEICHTENBERGER, 2001), sendo esta a espécie predominante não só no Brasil como no mundo todo. O pequeno número de isolados de *P. citrophthora* também justifica tal afirmativa e sugere que número maior de amostragem poderia aumentar esse número em relação à citricultura paranaense, baseando-se no fato de ter sido encontrado pelo menos um isolado da referida espécie no conjunto de isolados deste estudo.

4.7.3. Análise SSCP

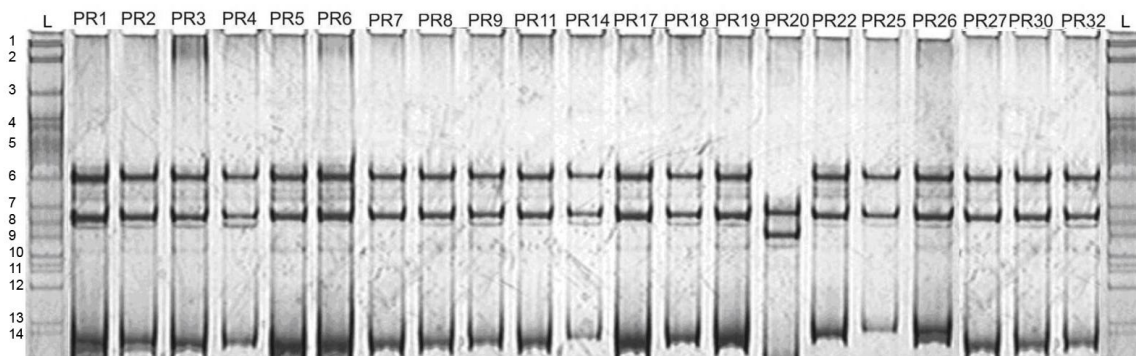


Figura 14. Alinhamento de padrões de bandas single-strand conformational polymorphism (SSCP) de isolados de *Phytophthora nicotianae* e *P. citrophthora* do Estado do Paraná.

Todos os isolados estudados apresentaram padrão de bandas SSCP., sendo que, dos 21 isolados, 20 deles formaram bandas uniformemente distribuídas com o ponto mais alto do que 6.1 e o mais baixo do que 8.6 para o “ladder SSCP”. Esses resultados estão de acordo com a chave de classificação proposta por KONG et al. (2003), onde os respectivos valores apontam para a espécie *P. nicotianae*. Um isolado teve suas bandas com o ponto mais alto em 7.9 e o mais baixo em 9.0 para o “ladder SSCP”. Esses resultados também estão de acordo com a chave de classificação proposta por KONG et al. (2003) que apontam para a espécie *Phytophthora citrophthora*.

Kong et al. (2003) caracterizaram por SSCP da amplificação do rDNA da região ITS1 282 isolados que representaram seis grupos e 59 espécies de *Phytophthora*. Os autores caracterizaram variações intra e interespecíficas, bem como investigaram como os padrões SSCP correspondem a entidades taxonômicas, visando avaliar a confiabilidade da técnica no comportamento de 277 isolados não caracterizados. Para 24 das 29 espécies, cada uma tem padrões SSCP idênticos entre todos os isolados examinados independente da origem do isolado e tipo cruzado. Kong et al (2004) caracterizaram 12 isolados de *Phytophthora ramarum*, onde todos os isolados testados apresentaram padrões de bandas SSCP idênticos independentes de suas origens. Quatro bandas uniformemente distribuídas para o ‘ladder SSCP’ mostrando um único padrão para *P. ramarum*, quando comparado com espécies geneticamente próximas como, por exemplo, *P. lateralis*. Isso indica que a técnica é útil para

distinguir espécies geneticamente próximas e com um alto grau de confiabilidade. Além disso, estudando isolados de *Pythium*, aplicando tal técnica, os autores caracterizaram 58 isolados representando 41 espécies de grupos de “Plaats Niterink”. Os testes com o protocolo SSCP do rDNA do espaço 1 da região ITS1 demonstrou que ser uma ferramenta prática e confiável na identificação de patógenos do gênero *Pythium* neste estudo.

Neste mesmo estudo, os autores relataram que o uso dessa técnica fornece taxa de suporte essencial para a análise SSCP uma efetiva alternativa para distinguir espécies de *Phytophthora* próximas, permitindo avaliar o potencial da técnica para detecção rápida, segura e positiva para confirmação direta do patógeno em materiais como plantas, amostras de solo e água. Além disso, Gallegly e Hong (2008) relataram que a técnica PCR-SSCP se caracteriza pela mais alta resolução em menor tempo para identificação de espécies dentro do gênero *Phytophthora*.

Sousa et al. (2003) investigaram, por meio das técnicas SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism), PCR RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism-Polimerase Chain Reaction) e DS-PCR (Double-Strand Polymorphism-Polimerase Chain Reaction), as mutações no DNA mitocondrial de populações de *Milipona rufiventris* no Estado do Espírito Santo, buscando identificar a técnica mais adequada para esse tipo de análises de abelhas. Nesse estudo, os autores concluíram que a técnica SSCP foi a mais eficiente e adequada para detectar mutações no DNA mitocondrial de *M. rufiventris*.

Tabela 10. Espécies de *Phytophthora* identificadas por características morfofisiológicas e confirmadas por método molecular.

Isolados	Características morfofisiológicas	Comparação com sequências do GenBank ¹	Padrões SSCP ²
PR 1	<i>P. nicotianae</i>	<i>Phytophthora nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 2	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 3	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 4	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 5	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 6	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 7	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 8	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 9	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 11	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 14	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 17	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 18	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 19	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 20	<i>P. citrophthora</i>	<i>P. citrophthora</i>	<i>P. citrophthora</i>
PR 22	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 25	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 26	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 27	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 30	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>
PR 32	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. nicotianae</i>

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> search

² Gallegly e Hong (2008)

5. CONCLUSÕES

- ▶ Em teste de patogenicidade, os 21 isolados causaram doenças em mudas de limão 'Cravo', com reprodução dos sintomas de gomose.
- ▶ Os resultados das análises das características morfofisiológicas e moleculares e o seu confronto com a bibliografia comprovaram que, dos 21 isolados obtidos de *Phytophthora*, 20 se enquadraram como *P. nicotianae* e um como *P. citrophthora*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDANUR, A.; SANTOS, A.F dos; TRATCH, R. Crescimento micelial e esporulação de isolados de *Phytophthora* sp. patogênicos à Acácia-negra. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.47, p.33-42, 2003.

AFEK, U.; SZTEJNBERG, A. A rapid method for evaluating citrus seedlings for resistance to foot rot caused by *Phytophthora citrophthora*. **Plant Disease**. v.74, p.66-68,1990.

ALVAREZ, L.A.; VICENTE, A.; DE LA ROCA, E.; BASCÓN, J. ABAD-CAMPOS, P.; ARMENGOL, J.; GARCIA-JIMÉNES. Branch canker on citrus trees in Spain caused by *Phytophthora citrophthora*. **Plant Pathology**. v.57, p. 84-91, 2008.

ALVES, T.C.A. **Caracterização morfofisiológica e molecular de isolados de *Phytophthora* da acácia negra (*Acacia mearnsii* De Wild) na região Sul do Brasil**. Dissertação Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, PR, 70p. 2008.

ANN, P.J. Species, mating types and pathogenicity of *Phytophthora* distributed in citrus orchards in Taiwan. **Transactions of the British Mycological Society**. v.82, n.4, p.631-634, 1984.

ANN, P.J.; KO, W.H.; An asexual variant of *Phytophthora insolita*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 40, p.810-815, 1994.

APPIAH, A.A.; FLOOD, J.; ARCHER, S.A.; BRIDGE, P.D. Molecular analysis of the major *Phytophthora* species on cocoa. **Plant Pathology**. v.53, n.2, p.209-219, 2004.

BERBEE, M.L.; TAYLOR, J.W. Two ascomycetes classes based on fruiting-body characters and ribosomal DNA sequence. **Molecular Biology Evolution** v.9, p. 278-284. 1992.

BRASIER, C.M. **Current questions in *Phytophthora* systematics: the role of the population approach**. In: Lucas, J.A.; Shattock, R.S.; Shaw, D.S.; Cooke, L.R. (Ed.) *Phytophthora*. Cambridge University Press, p.104-120, 1991.

BRASIER, C.M.; HAMM, P.B.; HANSEN, E.M. Cultural characters, protein patterns and unusual mating behaviour of *Phytophthora gonapodeydes* isolates from Britain and North America. **Mycological Research**, v.97, p.1287-1298, 1993.

BREDA DE HAAN, J. VAN. The root disease in Delitabacco causeda by *Phytophthora nicotianae*. **Mededeelingen uit's Lands Plantentuin**, v.15, p.107, 1896.

- BRIAND, M.; DIETERT, M.; ROUXEL, F.; BRYGOO, Y. Ribosomal RNA sequence divergence within the Pythiaceae. **Mycology Research**. London, v.99, n.4, p.1119-1127, 1995.
- CHEN, W.; HOY, J.W. Molecular and morphological comparison of *Pythium arrhenomanes* and *P. graminicola*. **Mycological Research**. v.97, p.1371-1378, 1993.
- CHOWDAPPA, P. SHARMA, M.; DIKSHIT, A.; PANDEY, M.C.; BHAADURIA, S.; GOULD, J.C.; VABREUSEGBEN, R.; JAIN, N.; SHAHI, K.S.; ROXBURGH, A.C. Identification of *Phytophthora* species affecting plantation crops by RFLP of PCR-amplified internal transcribed spacer regions of ribosomal RNA. **Current Science**, Bangalore, v.85, n.1, p.34-36, 2003.
- CLAPP, J.P.; VAN DER STOEL, C.D.; VAN DER PUTTEN, W.H. Rapid identification of cyst (*Heterodera* spp. *Globodera* spp.) and rootknot (*Meloidogyne* spp.) nematodes on the basis of ITS2 sequence variation detected by PCR-single-strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) in cultures and field samples. **Molecular Ecology**, v.9, n.9, p.1223-1232, 2000.
- COOKE, D.E.L., DRENTH, A.; DUNCAN, J.M.; WAGELS, G. BRASIER, C.M.A. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v.30, n.1, p.17-32, 2000.
- COSTA, P.S.C. **Expressão de genes em *P. nicotianae* que codificam proteínas indutoras de respostas de defesa em plantas**. Tese Doutorado, Universidade Federal de Lavras, 2007, 55p.
- CRANDALL, B.S. Gomosis de los citrus. **Revista Applied Mycology**. v.30, p.35-39, 1948.
- CRAWFORD, A.R.; BASSAM, B.J.; DRENTH, A.; MACLEAN, D.J.; IRWIN, J.A.G. Evolutionary relationships among *Phytophthora* species deduced from rDNA sequence analysis. **Mycological Research**. v.100, p.437-443, 1996.
- CUBERO, J.; GRAHAM, J.H. Quantitative real-time polymerase chain reaction for bacterial enumeration and allelic discrimination to differentiate *Xanthomonas* strains on citrus. **Phytopathology**, v.95, p.1333-1340, 2005.
- CVITANICH, C.; JUDELSON, H.S. A gene expressed during sexual and asexual sporulation in *Phytophthora infestans* is a member of the puf family of translational regulators. **Eukaryotic Cell**, v.2, n.3, p.465-473, June 2003.
- 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, n.4, p.177-231, 1913.
- DAVIS, R.M. *Phytophthora*-Induced diseases. In: Whiteside, J.O., Garnsey, S.M.; Timmer, L.W. (Eds.). **Compendium of Citrus Diseases**. St. Paul. APS. p.22-24, 1988.

DE BARY, A. Researches into the nature of the potato fungus, *Phytophthora infestans*. **Journal of the Royal Agricultural Society of England**, v.12, p.239-269, 1876.

DE BARY, A. Zur Kenntniss der Peronosporéen (Information on peronosporas). **Botanische Zeitung**, v.39, p.585-625, 1881.

DONADIO, L.C.; MOURÃO FILHO, F.A.; MOREIRA, C.S. **Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil**. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M; POMPEU JUNIOR, J. Citros. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag. Centro APTA Citros Sylvio Moreira. p.1-18, 2005.

DU, Z.; CHEN, J.; HIRUKI, C. Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of five potato viruses using 18S rRNA as an internal control. **Plant Disease**, v.90, p.185-189, 2006.

DUART, V.; BOA, E. Enfoque usado nas diagnoses de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)**, v.13, p.31-48, 2005.

DUNCAN, L.W.; GRAHAM, J.H.; TIMMER, W.L. Seasonal Patterns Associated with *Tylenchulus semipenetrans* and *Phytophthora parasitica* in the citrus Rhizosphere. **Phytopathology**, v.83, p.573-581, 1993.

ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. *Phytophthora* diseases worldwide. St. Paul: **The Americam Phytopathological Society**, 1996.

FEDORKO., P.D.; NELSON, N.A. DIDIERE. S.; FERTUCCI, D.; DELGADO, R.M.; HRUSZKEWYCZ, A.M. Speciation of human microsporidia by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.65, n.4, p.397-401, 2001.

FEICHETNBERGER, E. Gomose de *Phytophthora* dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, n.11, v.1, p.97-122, 1990.

FEICHETNBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JUNIOR, J. Doenças dos citros. **Manual de fitopatologia - doenças das plantas cultivadas**, v.2, p.239-269, 2005.

FEICHETNBERGER, E. **Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros**. in.: LUZ, E.D.M.N.; MATSUOKA, K.; SANTOS, A.F. dos. Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Livraria Rural Editora, p.283-342, 2001.

FEICHETNBERGER, E.; MULLER, G.W.; GUIRADO, N. **Doenças dos citros**. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; RESENDE, J.A.M. (Eds.). Manual de Fitopatologia v.2: Doenças das plantas cultivadas. 3ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997, p.261-296.

FEICHETNBERGER, E.; SPÓSITO, M.B. **Doenças fúngicas dos citros: Manejo integrado**. Visão Agrícola , USP, ESALQ. v.2. p.44-47, 2004.

FEICHTENBERBER, E. **Manejo ecológico de gomose de *Phytophthora* do citros**. São Paulo, RHODIA AGRO. 1996, 41p.

FÖRSTER, H.; COFFEY, M.D. Molecular taxonomy of *Phytophthora megasperma* based on mitochondrial and nuclear DNA polymorphisms. **Mycological Research**. v.97, p.1101-1112, 1993.

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

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

FREZZI, M.J. Las especies de *Phytophthora* en la Argentina. **Revista de Investigaciones Agrícolas**. Buenos Aires, v.4, p.47-133, 1950.

FUNDECITRUS. **Cancro cítrico, 2007**. Disponível em <http://www.fundecitrus.com.br/cancro.html> (acessado em janeiro de 2008).

GALLEGLY, M.E.; HONG, C. *Phytophthora* Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, Minnesota U.S.A. 155p., 2008.

GASSER, R.B.; MONTI, J.R.; ZHU, X.; CHILTON N.B.; HUNG, G.C.; GULDBERG, P. Polymerase chain reation-linked single-strand conformation polymorphism of ribosomal DNA of fingerprint parasites. **Electrophoresis**, v.18, p.1564-1566, 1997.

GODFREY, G.H. A *Phytophthora* foot rot of rhubarb. **Journal of Agricultural Research**. v.23, p.1-26, 1923.

GRAHAN, J.H.; TIMMER, L.W. Identification and control of phytophthora species causing brown rot of citrus. **Citrus Ind.** v. 76, n. 8, p. 38-39, 1995.

GUISCAFRE, J.R. The brown rot fungus in Puert Rico. **Journal of the Department of Agriculture of Puerto Rico**. Puerto Rico, p.193-204, 1932.

GUSI, L.D.; LEITE JUNIOR, R.P.; ANDRADE, P.F.S. Estudo de cadeias produtivas do agronegócio paranaense. Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento. Departamento de Economia Rural. **Laranja**. Curitiba - PR, 1998.

HARDHAM, A.R.; CAHILL, D.M.; COPE, M.; GUBLER, F.; HYDE, G.J. Cell surface antigens of *Phytophthora* spores: biological and taxonomic characterization. **Protoplasma**, v.32, p.181-213, 1994.

HARTIG, R. Der Buchenkeimlingspilz, *Phytophthora* (*Peronospora fagi* M.). **Untersuche. Forstb. Inst.** München, v.1, p.33-57, 1880.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**. v.95, p.641-655, 1995.

HAYDEN, K.J. RIZZO, D.; TSE, J.; GARBELOTTO, M. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum* from California Forests using a real-time polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**, Saint Paul, v.94, p.1075-1083, 2004.

HEMMES, D.E.; LERMA JUNIOR, A.P. The ultrastructure of developing and germinating chlamidospores of *Phytophthora palmivora*. **Mycologia**, v.77, p.743-755, 1985.

HENSON, J.M.; FRENCH, R. The polymerase Chain Reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review Phytopathology**, v.31, p.81-109, 1993.

HIRATA, M.H.; TAVARES, V.; HIRATA, R.D.C. Da biologia molecular a medicina: Metodos comumente utilizados em farmacogenética. **Métodos Moleculares em Farmacogenética**. Medicina, Ribeirão Preto, v.39, n.4, p.522-534, 2006.

HOLLIDAY, P. **Fungus Diseases of Tropical Crops**. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K. 1980, 607p.

HUANG, Z.; RUNDELL, P.A.; GUAN, X.; POWELL, C.A. Detection and isolate differentiation of *Citrus tristeza virus* in infected field trees based on reverse transcription–polymerase chain reaction. **Plant Disease**, v.88, p.625-629, 2004.

IAPAR, 2000 - **Cartas Climáticas**. Disponível em <http://www.200.201.27.90/site/cartasclimaticas>. Acessado em 02/10/2007.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2007. Levantamento Sistemático da produção agrícola. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/ca/default.asp> (acessado em 10/12/2009).

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2009. Levantamento Sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro, v. 21, n. 12, p. 1-80, dezembro de 2009. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/ca/default.asp> (acessado em 15/12/2009).

IPOLITO, 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, n.9, p.855-868, 2004.

ISLAM, S.Z.; BABADOOST, M.; LAMBERT, Z.N.; NDEME, A. Characterization of *Phytophthora capsici* Isolates from processing pumpkin in Illinois. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 2, p. 191-197, 2005.

JUNG, T.; NECHWATAL, J.; COOKE, D.E.L.; HARTMANN, G.; BLASCHKE, M.; OBWALD, W.F.; DELATOUR, C. *Phytophthora pseudosyringae* sp. nov., a new species causing root and collar rot of deciduous tree species in Europe. **Mycological Research**, London, v.107, n.7, p.772-789, 2003.

KALE, G.B.; PRASAD, N. *Phytophthora* blight of *Sesamum*. **Indian Phytopathol.** v. 10, p. 38-47, 1957.

KAMOUN, S. ***Phytophthora***. In: KRONSTAD, J. (Ed.) Fungal pathology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.237-265, 2000.

KENNEDY, D.M.; DUNCAN, J.M. A papillate *Phytophthora* species with specificity to *Rubus*. **Mycological research.** v.99, p.57-68, 1995.

KERR, Jr.; CUNAN, M.D. PCR-SSCP: applications to microbiology. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology.** v.49, p.315-320, 1996.

KLOTS, L.J. **Fungal, bacterial, and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery, and orchard.** In: Reuther. W.; Calavan, E.C.; Carman, G.E. (eds). The Citrus Industry. Crop Protection. v.4. University of California Division of Agriculture Science. p.1-66, 1978.

KONG, P.; HONG, C.X.; TOOLEY, P.W.; IVORS, K.; GARBELOTTO, M.; RICHARDSON, P.A. Rapid identification of *Phytophthora ramorum* using PCR-SSCP analysis of ribosomal DNA ITS-1. The Society for Applied Microbiology, **Letters in Applied Microbiology.** v.38, p.433-439, 2004.

KONG, P.; HONG, C.; RICHARDSON, P.A.; GALLEGLY, M.E. Single-strand conformational polymorphism of ribosomal DNA for rapid species differentiation en genus *Phytophthora*. **Fungal Genetics and Biology.** v.39, p.238-249, 2003.

KONG, P.; RICHARDSON, P.A.; MOORMAN, G.W.; HONG, C. Single-strand conformational polymorphism analysis of the ribosomal internal transcribed spacer 1 for rapid species identification within the genus *Pythium*. **FEMS Microbiology Letters,** v.240, p.229-236, 2004.

KONG, P.; RUBIO, L .; POLEK, M.L.; FALK, B.W. Population structure and genetic diversity within California *Citrus Tristeza Virus* (CTV) isolates. **Virus Genes.** v.21, p.139-145, 2000.

KROON, L.P.N.M.; BAKKER, F.T.; VAN DEM FOSCH, G.B.M.; BONANTS, P.J.M. Phylogenetic analyses of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Fungal Genetics and Biology.** Orlando, v.41, p.766-782, 2004.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR VILDOSO, C.A.; COLLETA FILHO, H.D. **Fungos procariotos e doenças abióticas.** In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; PONPEU JÚNIOR, J. Citros. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. Centro APTA Citros Sylvio Moreira, p.509-566, 2005.

- LEBERT, H.; COHN, F. Über die Fäule der Cactusstämme (On the rot of cactus stems). **Beitrage zur Biologie der Pflanzen**, v.1, p.51-57, 1870.
- LEE, S.B.; TAYLOR, J.W.; Phylogeny of five fungus-like protocistam *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.9, n.2, p.636-653, 1992.
- LEE, S.B.; WHITE, T.J.; TAYLOR, J.W. Detection of *Phytophthora* species by oligonucleotide hybridization to amplified ribosomal DNA spacers. **Phytopathology**, v.62, p.177-181, 1993.
- LEITE JUNIOR, R.P. **Cultivares de copa e porta-enxertos**. In: IAPAR. A citricultura no Paraná. Londrina: IAPAR, p.91-116, 1992. (Circular, 72).
- LEONIAN, L.H. Physiological studies on the genus *Phytophthora*. **American Journal of Botany**, v.12, p.444-498, 1925.
- LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. Doenças do pimentão - Diagnose e controle. Brasília, **Embrapa Hortaliças**, 2003, 96p.
- LOPES, C.A.; SANTO, A.F.; BOITEUS, L.S. **Doenças Fúngicas**. In: LOPES, C.A. (ed). Doenças do Tomatero. Brasília, Embrapa Hortaliças, p.19-51, 2005.
- LUTZ, A.L.; MENGE, J.A. Population fluctuations and the numbers and types of propagules of *Phytophthora parasitica* That Occur in irrigated Citrus Groves. **Plant Disease**, v.75, p.173-179, 1991.
- LUZ, E.D.M.N.; MATSUOKA, K. ***Phytophthora*: Fungo Protista ou Chomista?**. In: LUZ, E.D.M.N.; SANTOS, A.F. dos; MATSUOKA, K. BEZERRA, J.L. (eds). Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil, Campinas, Livraria Rural, p.1-22, 2001.
- LUZ, E.D.M.N.; MATSUOKA, K. Taxionomia e sistemática do gênero *Phytophthora*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)**, Passo Fundo, v.4, p.297-328, 1996.
- MARIMOTO, F. **Situação atual da citricultura**. In: GARCIA JUNIOR, J.B.; CROCE FILHO, J.; ANDRADE, J.M.B.; STENZEL, N.M.C.; LEITE JUNIOR, R.P.; CARVALHO, S.L.C. (eds). 2º Encontro Paranaense de Citricultura, Maringá: Associação dos Engenheiros Agrônomos do Paraná. Anais. p.51-56, 1990.
- MARTIN, F.N.; COFFEY, M.D.; ZELLER, K.; HAMELIN, R.C.; TOOLEY, P.; GARBELOTTO, M.; HUNHES, K.G.D.; KUBISIAK, T.; BILODEAU, G.J.; LEVY, L.; BLOMQUIST, C.; BERGER, P.H. Evaluation of molecular markers for *Phytophthora rumorum* detection and identification: testing for specificity using a standardized library of isolates. **Phytopathology**, n.99, p.390-403, 2009.

- MARTIN, F.N.; TOOLEY, P.W. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of the mitochondrially-encoded cytochrome oxidase I and II genes. **Mycologia**, n.95, p.269-284, 2003.
- MATHERON, M.E.; MATEJKA, J.C. Effect of sodium tetrathiocarbonate, metalaxyl and fosetyl-AI on development and control of *Phytophthora* root rot of citrus. **Plant Disease**, v.75, p.264-268, 1991.
- MATHERON, M.E.; MATEJKA, J.C. Efectes of temperature on sporulation and growth of *Phytophthora citrophthora* and *P. parasitica* and development of foot and foot rot em citrus. **Plant Disease**, v. 76, p. 1103-1109, 1992.
- MATHERON, M.E.; MATEJKA, J.C. Temporal changes in susceptibility of citrus phloem tissue to colonization by *Phytophthora citrophthora* and *Phytophthora parasitica*. **Plant Disease**, v.73, p.408-411, 1998.
- McLENNAN, E. I. Notes on the organisms causing brown rot of citrus fruit in Victoria, Australia (*Phytophthora citrophthora* (Sm & Sm) Leon & *P. hibernalis* Carne). **Royal. Society of Victoria**. v. 48, p. 95-102, 1936.
- MATSUDA, Y.; SAMESHIME, T.; MORIURA, N.; INOUE, K.; NONOMURA, T.; KAKUTANE, K.; NISHIMURA, H.; KUSAKARI, S.; TAKAMATSU, S.; TOYODA, H. Identification of individual powdery mildew fungi infecting leaves and direct detection of gene expression by single conidium polymerase chain reaction. **Phytopathology**, v.95, p.1137-1143, 2005.
- MCHAU, G.R.A.; COFFEY, M.D. An integrated study of morphological and isozyme patterns found a worldwide collection of *Phytophthora citrophthora* and a redescription of the species. **Mycological Research**, v.98, p.1291-1299, 1994.
- MEDINA FILHO, H.P. BORDIGNON, R.; SIQUEIRA, W.J.; FEICHTENBERGER, E.; CARVALHO, M.R.T.; TEOFILSOBRINHO, J. Resistência de clones e híbridos de porta-enxertos de citros à gomose de tronco causado por *Phytophthora parasitica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.5, p.534-540, 2003.
- MORICCA, S.; FORJA, I.; VANDRAMIN, G.G.; RADDI, P. Differentiation of *Seiridium* species associated with virulent cankers on cypress in the Mediterranean region by PCR-SSCP. **Plant Pathology**, v.49, p.774-781, 2000.
- MÜLLER, G.W. Use of mild haplotypes of citrus tristeza virus (CTV) to reestablish commercial production of Pera sweet orange in São Paulo, Brazil. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.93, p.62-64, 1980.
- MUNIZ, M.F.S.; ANDRAD, F.W.R.; QUIROZ, F.M.; MOURA FILHO, G.; MENEZES, M. Caracterização de isolados de *Phytophthora drechsleri*, agente causal da podridão mole de raízes de mandioca. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.2, p.195-198, 2006.

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

NAQVI, S.A.M.H. Distribution of citrus *Phytophthora* spp. and mating types pathogenic to citrus in Central India. **Jornal of Mycology and Plant Pathology**, v.36, n.1, p.44-49, 2006.

NEVES, M.F.; JANK, M.S.; LOPES, F.F.; TROMBIM, V.G. Ações para aumentar a competitividade da cadeia de laranja no Brasil. **Laranja**, Cordeirópolis, v.27, n.2, p.213-229, 2006.

NEVES, M.F.; LOPES, F.F. **Estratégias para laranja no Brasil**. São Paulo: Atlas, 2005, 225p.

NUNES, W.M.C.; MEDINA, C.L.; MACHADO, M.A.; MACHADO, E.C.; CORAZZA-NUNES, M.J.; MÜLLER, G. Transmissão de *Xylella fastidiosa* para mudas de citros através de encostia de plantas-inóculo. **Laranja**, v.25, n.2, p.349-356, 2004.

ORDOÑEZ, M.E.; HOHL, H.R.; VELASCO, A.; RAMON, M.P.; OYARZUN, P.J.; SMART, C.D.; FRY, W.E.; FORBES, G.A.; ERSELIUS, L.J. A novel population of *Phytophthora*, similar to *P. infestans* attacks wild *Solanum* species in Ecuador. **Phytopathology**, v. 90, p.197-202, 2000.

ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v.86, p.2766-2770, 1989.

PAIM, M.C.A. **Diversidade genética, taxonomia e patogenicidade de *P. citrophthora* e *P. palmivora***. Dissertação Mestrado. Universidade Estadual Santa Cruz - Bahia, 93p, 2005.

PALLOIX, A.; DAUBEZE, A.M.; POCHARD, E. Time sequences of root infection and resistance expression in an artificial inoculation method of pepper with *Phytophthora capsici*. **Journal of Phytopathology**, v.123, p.12-24, 1988.

RICCI, P.; TRENTIN, F.; BONNET, P.; VENARD, P. MOUTON-PERONNET, F.; BRUNETEAU, M. Differential production of parasiticein, an elicitor of necrosis and resistance in tobacco, by isolates of *Phytophthora parasitica*. **Plant Pathology**, v.41, p.298-307, 1992.

ROSA, D.D.; MACHADO, M.A.; TARGON, M.L.P.N.; FURTADO, E.L. Diversidade de *Phytophthora parasitica* isolados de citros usando seqüências de nucleotídeos da região ITS-5.8S rDNA. **Summa Phytopathologica**, v.32, n.2, p.188-191, 2006.

ROSSETTI, V.V. **Doenças causadas por fungos**. Manual ilustrado de doenças dos citros - Fundecitros. p.103-170, 2001.

SANBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. (3ed). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

SANDLER, H.A.; TIMMER, W.L.; GRAHAM, J.H.; ZITKO, S.E. Effect of Fungicide Applications on Populations of *Phytophthora parasitica* and on Feeder Root Densities and Fruit yields of Citrus Trees. **Plant Disease**, v.73, p.902-906, 1989.

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

SANTOS, A.F.; LUZ, E.D.M.N.; SOUZA, J.T. *Phytophthora nicotianae*: agente etiológico da gomose de acácia-negra no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p.81-84, 2005.

SAWADA, K. Two new species of the genus *Phytophthora* causing disease of anion and eggplant. Rep. Dep. Agric Gov. Res. Inst. **Formosa Bulletin**, v.11, p.1-139, 1915.

SAWADA, K. Descriptive catalogue of the Formosan fungi. Rep. Dep. Agric Gov. Res. Inst. **Formosa Bulletin**, v.27, p.1-62, 1927.

SAWADA, K. *Phytophthora* species on tobacco. **Formosa Agriculture Review**, v.38, p.7-25, 1942.

SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética**: um guia prático. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2003, p.114.

SEKIYA, T. Detection of mutant sequences by single-strand conformation polymorphism analysis. **Mutation Research**, v.288, p.79-83, 1993.

SAREJANNI, J.A. A collar rot of cultivated *Solanum* and the classification of the genus *Phytophthora*. **Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki**, Greece, v.2, p.35-52, 1936.

SHEN, G.; WANG, Y.C.; ZHENG, X.B. Development of PCR assay for molecular detection of *Phytophthora boehmeriae* in infected cotton. **Journal of Phytopathology**. v.153, n.5, p.291-296, 2005.

SHERBAKOFF, C.D. Buckeye rot of tomato fruit. **Phytopathology**. v.7, p.119-129, 1917.

SHURTLEFF, M.C.; AVERRE III, C.W. **The Plant Disease Clinic and Field Diagnosis of abiotic Diseases**. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, 1997, 245p.

SILVA, K.S.; REBOUÇAS, T.N.H.; BOMFIM, D.S.S.; SÃO JOSÉ, A.R.; BENETT, C.G.S. Atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.29, n.4. p.749-754, 2008.

SILVA, P.P. da; VALENCIO, A.G.R.B.; REIS, A.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S.; LOPES, C.A. Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Phytophthora* causando podridões de frutos e colo em espécies solanáceas no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.266, 2004. (Resumo).

SILVA, G.S.; DOIHARA, I.P. Uma técnica para obter abundante esporulação de *Phytophthora palmivora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.5, p.568, 2003.

SILVIERO, A. **Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* x *Poncirus trifoliata* à gomose**. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, Dr. Diss. 2001.

SILVIERO, A.; FURTADO, E. L.; MACHADO, M. A. Métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.23, n.1, p.203-219, 2002.

SMITH, A.L. **Biology of Chlamydo-spores of *Phytophthora ramorum***. 140p. Thesis (Masler of Scienc in Botany and Plant Pathology). Oregon Stat University, Oregon, 2007.

SMITH, R.E.; SMITH, E.H. A new fungus of economic importance. **Botanical Gazette**. v.42, p.215-221, 1906.

SOUSA, A.A.; TARGON, M.L.P. M.; SANTOS, A.F.; MÜLLER, G.W.; MACHADO, M.A. Técnicas moleculares para diagnóstico e caracterização do vírus da tristeza dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.22, n.2, p.503-516, 2001.

SOUSA, C. S.; KERR, W. E.; BONETTI, A. M.; SANTANA, F. A.; GOULART, L. R.; OLIVEIRA, R. C.; VIEIRA, C. U.; VASCONCELOS. S. M. Comparação das técnicas de sscp, DS-PCR, PCR-RFLP para detecção de mutação no gene mitocondrial 16S RRNA em populações de *Melipona rufiventris*. **Bioscience Journal (UFU)**, Uberlândia-MG, v.19, n.1, p.65-70, 2003.

SOUZA, J.T.; LUZ, E.D.M.N.; PAIM, M.C.; CERQUEIRA, A.O. Uso de ferramentas moleculares na taxonomia de *Phytophthora*. **Fitopatologia Brasileira**. v.32 (suplemento) p. 40-41, 2007.

STAMPS, D.J.; WATERHOUSE, G.M.; NEWHOOK, F.J.; HALL, G.S. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. **Mycological Papers, Wallingford**, v.162, n.1, p.1-28, 1990.

STAMPS, D.J. *Phytophthora drechsleri*. **Commonwealth Mycological Institute Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**. n.840, p.2, 1985.

STEDDOM, K.; BECKER, O. MENGE, J.A. Repetitive applications of the biocontrol agente *Pseudomonas* and effects on populations of *Phytophthora parasitica* in citrus orchards. **Phytopathology**. Lancaster, v. 92, n.8, p. 850-856, 2002.

TAZIMA, Z.H.; AULER, P.A.M.; NEVES, C.S.V.J.; YADA, I.F.U.; LEITE JR, R.P. Comportamento de clones de laranja 'Valência' na região norte do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. v.30, n.4, p.970-974, 2008.

TEIXEIRA, J.E.C. **Genes de defesa de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*: expressão constitutiva e induzida por *Phytophthora parasítica***. Tese Mestrado, Universidade Federal de Lavras, MG; 105p, 2005.

THOMIDIS, T.; EXADAKTYLOU, E.; SOTIROPOULOS, T. Susceptibility of three citrus rootstocks towards *Phytophthora cactorum*, *P. citrophthora*, *P. parasitica* and *P. citricola*. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**. v.112, n.2, p.204-207, 2005.

TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.M. **Compendium of citrus diseases**. ST Paul: APS Press, 2000. 80p.

TIMMER, L.W.; SANDLER, H.A.; GRAHAM, J.H.; ZITKO, S.E. Sampling citrus orchards in Florida to estimate populations of *Phytophthora parasitica*. **Phytopathology**, v.78, p.940-944, 1988.

TUCKER, C.M. Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. **Missouri Agricultural. Expérimental. Station Research Bulletin**. n.153, 208p., 1931.

UGA, H., TSUDA, S.A one-step reverse transcription-polymerase chain reaction system for the simultaneous detection and identification of multiple tospovirus infections. **Phytopathology**, v.95, p.166, 2005.

USDA - United States of Department of Agriculture, safra 2005/2006. Disponível em <<http://www.usda.gov>> Acesso em 5 de fevereiro de 2007.

VERNIERE, C.; COHEN, S.; RAFFANEL, B.; DUBOIS, A.; VENARD, P.; PANABIÈRES, F. Variability in Pathogenicity among *Phytophthora* spp. Isolated from citrus in Corsica. **Phytopathology**. v.152, p. 476-483, 2004.

VIAL, A.; LATORRE, B.A.; ORTÚZAR, J. Caracterización de *Phytophthora citrophthora* and *P. inundata* associated to foot and root rot of citrus trees in Chile. **Ciencia e Investigacion Agraria**. v.33, n.3, p.173-184, 2006.

WATERHOUSE, G.M. The Genus *Phytophthora*. **Commonw. Mycol. Inst. Misc. Publ.** 1956, n.12, 120p.

.

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

WATERHOUSE, G.M.; WATERSTON, J.M. *Phytophthora hibernalis*. **Commonw. Mycol. Inst. Descriptions of Pathogenic Fungi and a Bacteria**. 1964a, n.31, 2p.

WATERHOUSE, G.M.; WATERSTON, J.M. *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae* Commonw. Mycol. Inst. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. 1964b, n.34, p.2.

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

WATERHOUSE, G.M. The Genus *Phytophthora* De Bary. Diagnoses (or descriptions) and figures from original papers. Kew, Commonwealth Mycological Institute. **Mycology**, Papers 122, 1970b.

WATERHOUSE, G.M.; NEWHOOK, F.J.; STAMPS, D.J. **Present criteria for classification of *Phytophthora***. In: Erwin, D.C.; BARTNICKI-GARCIA, S.; TSAO, P.H. its biology, taxonomy, ecology, and pathology. St. Paul, American Phythopatological Society, p.138-47, 1983.

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. (eds), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, p.315-322, 1990.

WIDMER, T.L.; GRAHAM, J.H.; MITCELL, D.J. Histological comparison of fibrous root infection of disease-tolerant and susceptible citrus hosts by *Phytophthora nicotianae* and *P. palmivora*. **Phytopathology**, v.88, p.389-395, 1998.

ZHANG, Z.G.; LI, Y.Q.; FAN, H.; WANG, Y.C.; ZHENG, X.B. Molecular detection of *Phytophthora capsici* in infected plant tissues, soil and water. **Plant Pathology**, v.55, p.770-775, 2004.

APÊNDICES

A: Alinhamento de nucleotídeos de sequência do gene ITS1 (primers ITS5/ITS2) de isolados de *Phytophthora* spp. de citrus e de amostras disponíveis no GenBank¹

```

P_citrophthora_FJ802055      AATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTG 311
P_citrophthora_FJ801837      AATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTG 309
PR20                         -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
PR1                           -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
PR32                         -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
PR7                           -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
PR2                           -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
PR6                           -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
PR8                           -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
PR26                         -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
PR27                         -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
PR9                           -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
PR17                         -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
PR30                         -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
PR5                           -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
PR25                         -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
PR18                         -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
PR11                         -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
PR3                           -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
PR4                           -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
PR19                         -----AAATTTTGAACGCATATTG 19
P_parasitica_GU111682        AATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTG 394
P_nicotianae_FJ801260        AATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTG 342
P_nicotianae_FJ801517        AATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTG 342
P_nicotianae_FJ802104        AATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTG 342
P_cactorum_FJ802000          AATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTG 332
P_cactorum_FJ801936          AATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTG 332
P_drechsleri_FJ801619        AATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTG 321
P_drechsleri_FJ801387        AATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTG 321
P_hibernalis_FJ802067        AATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTG 317
P_hibernalis_FJ801948        AATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTG 317

```

***** *****

Continuação

P_citrophthora_FJ802055	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGGA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	358
P_citrophthora_FJ801837	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGGA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	356
PR20	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGGA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	66
PR1	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	66
PR32	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	66
PR7	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	66
PR2	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	66
PR6	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	66
PR8	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	66
PR26	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	66
PR27	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	66
PR9	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	66
PR17	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	66
PR30	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	66
PR5	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	66
PR25	CACTTCCGGCATTAGTCCTGGAATGTATGCCTGTATCAGAAGTCCGTACA	69
PR18	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	66
PR11	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	66
PR3	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	66
PR4	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	66
PR19	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	66
P_parasitica_GU111682	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	441
P_nicotianae_FJ801260	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTA--	387
P_nicotianae_FJ801517	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	389
P_nicotianae_FJ802104	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGAA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	389
P_cactorum_FJ802000	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGGA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	379
P_cactorum_FJ801936	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGGA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	379
P_drechsleri_FJ801619	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGGA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	368
P_drechsleri_FJ801387	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGGA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	368
P_hibernalis_FJ802067	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGGA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	364
P_hibernalis_FJ801948	CACTTCCGG-GTTAGTCCTGGGA-GTATGCCTGTATCAGT-GTCCGTACA	364

***** * *****

Continuação

P_citrophthora_FJ802055	TCAAACCTTGGCTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGC-CAG	406
P_citrophthora_FJ801837	TCAAACCTTGGCTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGC-CAG	404
PR20	TCAAACCTTGGCTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGC-CAG	114
PR1	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	114
PR32	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	114
PR7	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	114
PR2	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	114
PR6	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	114
PR8	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	114
PR26	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	114
PR27	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	114
PR9	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	114
PR17	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	114
PR30	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	114
PR5	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	114
PR25	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	117
PR18	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	114
PR11	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	114
PR3	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	114
PR4	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	114
PR19	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	114
P_parasitica_GU111682	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	489
P_nicotianae_FJ801260	---AACTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	432
P_nicotianae_FJ801517	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	437
P_nicotianae_FJ802104	TTAAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGT-CAG	437
P_cactorum_FJ802000	TCAAACCTTGGCTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGC-CAG	427
P_cactorum_FJ801936	TCAAACCTTGGCTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGA-GGAGATGC-CAG	427
P_drechsleri_FJ801619	CTAAACCTTGGCTCCCTTCCGTGTAGTCGGTGATGGGGACGCGCAG	418
P_drechsleri_FJ801387	CTAAACCTTGGCTCCCTTCCGTGTAGTCGGTGATGGGGACGCGCAG	418
P_hibernalis_FJ802067	TCAAACCTTGCCTCCCTTCCGTGTAGTCGGTGATGGGGACGTGCAG	414
P_hibernalis_FJ801948	TCAAACCTTGCCTCCCTTCCGTGTAGTCGGTGATGGGGACGTGCAG	414

***** ** ***** ** * **

Continuação

P_citrophthora_FJ802055	ATGTGAAGTGTCTTGCGGTTTTGTGCCTTCGGGCCATGGCTGCGAGTCC	456
P_citrophthora_FJ801837	ATGTGAAGTGTCTTGCGGTTTTGTGCCTTCGGGCCGTGGCTGCGAGTCC	454
PR20	ATGTGAAGTGTCTTGCGGTTTTGTGCCTTCGGGCCGAGGCTGCGAGTCC	164
PR1	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	158
PR32	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	158
PR7	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	158
PR2	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	158
PR6	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	158
PR8	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	158
PR26	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	158
PR27	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	158
PR9	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	158
PR17	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	158
PR30	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	158
PR5	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	158
PR25	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	161
PR18	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	158
PR11	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	158
PR3	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	158
PR4	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	158
PR19	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	158
P_parasitica_GU111682	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	533
P_nicotianae_FJ801260	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	476
P_nicotianae_FJ801517	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	481
P_nicotianae_FJ802104	ATGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGACC--GGCTGCGAGTCC	481
P_cactorum_FJ802000	ATGTGAAGTGTCTTGCGGCTG----GTTTTTCGGACC--GACTGTGAGTCC	471
P_cactorum_FJ801936	ATGTGAAGTGTCTTGCGGCTG----GTTTTTCGGACC--GACTGCGAGTCC	471
P_drechsleri_FJ801619	ATGTGAAGTGTCTTGCGGCTG----GTCTTCGGTCC--GGCTGCGAGTCC	462
P_drechsleri_FJ801387	ATGTGAAGTGTCTTGCGGCTG----GTCTTCGGTCC--GGCTGCGAGTCC	462
P_hibernalis_FJ802067	ACGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGGCC--GGCTGCGAGTCC	458
P_hibernalis_FJ801948	ACGTGAAGTGTCTTGCGATTG----GTCTTCGGGCC--GGCTGCGAGTCC	458

* ***** * * ***** * * *****

Continuação

P_citrophthora_FJ802055 TTTGAAATGACTGAACTGACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGGTGTT 505
P_citrophthora_FJ801837 TTTGAAATGACTGAACTGACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGGTGTT 503
PR20 TTTGAAATGACTGAACTGACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGGTGTT 213
PR1 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 208
PR32 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 208
PR7 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 208
PR2 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 208
PR6 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 208
PR8 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 208
PR26 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 208
PR27 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 208
PR9 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 208
PR17 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 208
PR30 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 208
PR5 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 208
PR25 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 211
PR18 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 208
PR12 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 208
PR3 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 208
PR4 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 208
PR19 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 208
P_parasitica_GU111682 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 583
P_nicotianae_FJ801260 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 526
P_nicotianae_FJ801517 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 531
P_nicotianae_FJ802104 TTTTAAATGACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGCGTT 531
P_cactorum_FJ802000 TTTTAAATGACTGAACTGACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGGCGTT 520
P_cactorum_FJ801936 TTTTAAATGACTGAACTGACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGGCGTT 520
P_drechsleri_FJ801619 TTTTAAATGACTACACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGACGTT 511
P_drechsleri_FJ801387 TTTTAAATGACTACACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCG-TGACGTT 511
P_hibernalis_FJ802067 TTTTAAATGTACGAAACGGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCA-TAATGGA 507
P_hibernalis_FJ801948 TTTTAAATGTACGAAACGGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCA-TAATGGA 507
*** ***** ** * ***** * *

Continuação

P_citrophthora_FJ802055 GCTGGTTGTGAGGCTGCCTGCGTGCCAGTCGGCGACCGTTTGTCTGC 555
P_citrophthora_FJ801837 GCTGGTTGTGAGGCTGCCTGCGTGCCAGTCGGCGACCGTTTGTCTGC 553
PR20 GCTGGTTGTGAGGCTGCCTGCGTGCCAGTCGGCGACCGTTTGTCTGC 263
PR1 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 258
PR32 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 258
PR7 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 258
PR2 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 258
PR6 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 258
PR8 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 258
PR26 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 258
PR27 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 258
PR9 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 258
PR17 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 258
PR30 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 258
PR5 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 258
PR25 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 261
PR18 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 258
PR11 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 258
PR3 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 258
PR4 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 258
PR19 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 258
P_parasitica_GU111682 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 633
P_nicotianae_FJ801260 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 576
P_nicotianae_FJ801517 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 581
P_nicotianae_FJ802104 GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGC 581
P_cactorum_FJ802000 GCTGGTTGTGAGGCTGCTATTGTAGCAAGTTGGCGACCGTTTGTCTGC 570
P_cactorum_FJ801936 GCTGGTTGTGAGGCTGCTATTGTAGCAAGTTGGCGACCGTTTGTCTGC 570
P_drechsleri_FJ801619 GCTGGTTGTGAGGCTGCCTGTGTGGCATGTCGGCGACCGTTTGTCTGC 561
P_drechsleri_FJ801387 GCTGGTTGTGAGGCTGCCTGTGTGGCATGTCGGCGACCGTTTGTCTGC 561
P_hibernalis_FJ802067 ATTGGTTGTGGAAGCTTCCCG-GTGGCAAGTCGGCGACTGGTTTGTCTGC 556
P_hibernalis_FJ801948 ATTGGTTGTGGAAGCTTCCCG-GTGGCAAGTCGGCGACTGGTTTGTCTGC 556

***** * *** * ** ** * ***** *****

Continuação

P_citrophthora_FJ802055	TGCGGCGTTT--AATGGAGGAGTGTTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGG	604
P_citrophthora_FJ801837	TGCGGCGTTT--AATGGAGGAGTGTTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGG	602
PR20	TGCGGCGTTT--AATGGAGGAGTGTTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGG	312
PR1	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	306
PR32	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	306
PR7	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	306
PR2	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	306
PR6	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	306
PR8	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	306
PR26	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	306
PR27	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	306
PR9	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	306
PR17	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	306
PR30	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	306
PR5	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	306
PR25	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	309
PR18	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	306
PR11	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	306
PR3	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	306
PR4	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	306
PR19	TGCGGCGTT--CATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	306
P_parasitica_GU111682	TGCGGCRTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	681
P_nicotianae_FJ801260	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	624
P_nicotianae_FJ801517	TGCGGCATT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	629
P_nicotianae_FJ802104	TGCGGCATT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGG	629
P_cactorum_FJ802000	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGG	618
P_cactorum_FJ801936	TGCGGCGTT--AATGGAAGAGTGTTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGG	618
P_drechsleri_FJ801619	TGCGGCGTTTTAATGGAGGAGTGTTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGG	611
P_drechsleri_FJ801387	TGCGGCGTTTTAATGGAGGAGTGTTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGG	611
P_hibernalis_FJ802067	TACGGCGTTT--AATGGAGGAATGTTTCGATTCGCGGTATGGTTAGCTTCGG	605
P_hibernalis_FJ801948	TACGGCGTTT--AATGGAGGAATGTTTCGATTCGCGGTATGGTTAGCTTCGG	605
	* * * * *	

Continuação

P_citrophthora_FJ802055	CTGAACAG-GCGCTTATTGTATGCTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGGCTG	653
P_citrophthora_FJ801837	CTGAACAG-GCGCTTATTGTATGCTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGGCTG	651
PR20	CTGAACAG-GCGCTTATTGTATGCTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGGCTG	361
PR1	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	356
PR32	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	356
PR7	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	356
PR2	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	356
PR6	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	356
PR8	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	356
PR26	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	356
PR27	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	356
PR9	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	356
PR17	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	356
PR30	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	356
PR5	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	356
PR25	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	359
PR18	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	356
PR11	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	356
PR3	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	356
PR4	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	356
PR19	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	356
P_parasitica_GU111682	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	731
P_nicotianae_FJ801260	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	674
P_nicotianae_FJ801517	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	679
P_nicotianae_FJ802104	CTGAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTG	679
P_cactorum_FJ802000	CTGAACAATGCGCTTATTGGATGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACCG	668
P_cactorum_FJ801936	CTGAACAATGCGCTTATTGGATGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACCG	668
P_drechsleri_FJ801619	CTGAACAG-ACGCTTATTGGGTGCTTTTTCTGCTGCGCGGGATGGACTG	660
P_drechsleri_FJ801387	CTGAACAG-ACGCTTATTGGGTGCTTTTTCTGCTGCGCGGGATGGACTG	660
P_hibernalis_FJ802067	CTGAACAATGCGCTTATTGGATGTTTTTCCTGCTGTGGTGGTAATGACTG	655
P_hibernalis_FJ801948	CTGAACAATGCGCTTATTGGATGTTTTTCCTGCTGTGGTGGTAATGACTG	655

***** * ***** * ***** ***** ** * * * * *

Continuação

```
P_citrophthora_FJ802055      GTGAACCGTAGCTGTGTGGCTTGGCTTTTGAATCGGCTTTGCTGTTGC 703
P_citrophthora_FJ801837      GTGAACCGTAGCTGTGTGGCTTGGCTTTTGAATCGGCTTTGCTGTTGC 701
PR20                          GTGAACCGTAGCTGTGTGGCTTGGCTTTTGAATCGGCTTTGCTGTTGC 411
PR1                            GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 404
PR32                          GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 404
PR7                            GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 404
PR2                            GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 404
PR6                            GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 404
PR8                            GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 404
PR26                          GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 404
PR27                          GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 404
PR9                            GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 404
PR17                          GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 404
PR30                          GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 404
PR5                            GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 404
PR25                          GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 407
PR18                          GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 404
PR11                          GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 404
PR3                            GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 404
PR4                            GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 404
PR19                          GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 404
P_parasitica_GU111682        GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 779
P_nicotianae_FJ801260        GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGT 722
P_nicotianae_FJ801517        GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGGTGTACT 727
P_nicotianae_FJ802104        GTGAACCATAGCTCGGTG--GCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC 727
P_cactorum_FJ802000          GTGAACCATAGCTCAGTT--GCTTGGCTTTTGAATCGGCTTTGCTGTTGC 716
P_cactorum_FJ801936          GTGAACCATAGCTCAGTT--GCTTGGCTTTTGAATCGGCTTTGCTGTTGC 716
P_drechsleri_FJ801619        GTGAACCGTAGCTGTGCTAGGCTTGGCGTTTGAACCGCGGTATTGT-GC 709
P_drechsleri_FJ801387        GTGAACCGTAGCTGTGCTAGGCTTGGCGTTTGAACCGCGGTATTGT-GC 709
P_hibernalis_FJ802067        GTGAACCGTAGCTATGCAGGGATTGGCCTTTGAACTGAGGATGTTGT-GT 704
P_hibernalis_FJ801948        GTGAACCGTAGCTATGCAGGGATTGGCCTTTGAACTGAGGATGTTGT-GT 704
***** ***** *      * ***** ***** *      *      ***
```


Continuação

P_citrophthora_FJ802055	GAAGTAGAGTGCC-----GGCTTCGGCTGTCGAGTGTGCGATCC	741
P_citrophthora_FJ801837	GAAGTAGAGTGCC-----GGCTTCGGCTGTCGAGTGTGCGATCC	739
PR20	GAAGTAGAGTGCC-----GGCTTCGGCTGTCGAGTGTGCGATCC	449
PR1	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	442
PR32	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	442
PR7	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	442
PR2	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	442
PR6	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	442
PR8	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	442
PR26	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	442
PR27	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	442
PR9	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	442
PR17	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	442
PR30	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	442
PR5	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	442
PR25	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	445
PR18	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	442
PR11	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	442
PR3	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	442
PR4	GAAGTAAGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	442
PR19	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	442
P_parasitica_GU111682	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	817
P_nicotianae_FJ801260	G--GCAGCTTCGG-----TTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGGA	758
P_nicotianae_FJ801517	----TCGGTATGC-----ATCTCAA-----	743
P_nicotianae_FJ802104	GAAGTAGGGTGCC-----AGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCC	765
P_cactorum_FJ802000	GAAGTAGAGTGCC-----GGCTTCGGCTGTCGAGGGTCGATCC	754
P_cactorum_FJ801936	GAAGTAGAGTGCC-----GGCTTCGGCTGTCGAGGGTCGATCC	754
P_drechsleri_FJ801619	GAAGTAGGGTGTCTGTCTCGGCGCAAGCTGGGGTGGGCGAGGGTCGATCC	759
P_drechsleri_FJ801387	GAAGTAGGGTGTCTGTCTCGGCGCAAGCTGGGGTGGGCGAGGGTCGATCC	759
P_hibernalis_FJ802067	GAAGTAGAGTGCCGGT-TTGGCGCAAGCTGGGCTGT-CGAGGGTCGATCC	752
P_hibernalis_FJ801948	GAAGTAGAGTGCCGGT-TTGGCGCAAGCTGGGCTGT-CGAGGGTCGATCC	752

*

Continuação

P_citrophthora_FJ802055	-ATTTGGGAACGTTTGTGTGCGCTTTCGAGTGT--GCATCTCAA-----	783
P_citrophthora_FJ801837	-ATTTGGGAACGTTTGTGTGCGCTTTCGAGTGT--GCATCTCA-----	780
PR20	-ATTTGGGAACGTTTGTGTGCGCTTTCGAGTGT--GCATCTCAATTGGA	496
PR1	-ATTTGGGAACTT-AATGTGT-CTTCGGTATGC--ATCTCAATTGGACC	487
PR32	-ATTTGGGAACTT-AATGTGT-CTTCGGTATGC--ATCTCAAT--GGACC	486
PR7	-ATTTGGGAACTT-AATGTGT-CTTCGGTATGC--ATCTCAATTGGACC	487
PR2	-ATTTGGGAACTT-AATGTGT-CTTCGGTATGC--ATCTCAATTGGACC	487
PR6	-ATTTGGGAACTT-AATGTGTTACTTCGGTATGC--ATCTCAATTGGACC	488
PR8	-ATTTGGGAACTT-AATGTGT-CTTCGGTATGC--ATCTCAATTGGACC	487
PR26	-ATTTGGGAACTT-AATGTGT-CTTCGGTATGC--ATCTCAATTGGACC	487
PR27	-ATTTGGGAACTT-AATGTGT-CTTCGGTATGC--ATCTCAATTGGACC	487
PR9	-ATTTGGGAACTT-AATGTGT-CTTCGGTATGC--ATCTCAATTGGACC	487
PR17	-ATTTGGGAACTT-AATGGGT-CTTCGGTATGC--ATCTCAATTGGACC	487
PR30	-ATTTGGGAACTT-AATGTGT-CTTCGGTATGC--ATCTCAATTGGACC	487
PR5	-ATTTGGGAACTT-AATGTGT-CTTCGGTATGC--ATCTCAATTGGACC	487
PR25	-ATTTGGGAACTT-AATGTGT-CTTCGGTATGC--ATCTCAATTGGACC	490
PR18	-ATTTGGGAACTT-AATGTGT-CTTCGGTATGC--ATCTCAATTGGACC	487
PR11	-ATTTGGGAACTT-AATGTGT-CTTCGGTATGC--ATCTCAATTGGACC	487
PR3	-ATTTGGGAACTT-AATGTGT-CTTCGGTATGC--ATCTCAATTGGACC	487
PR4	-ATTTGGGAACTT-AATGTGT-CTTCGGTATGC--ATCTCAATTGGACC	487
PR19	-ATTTGGGAACTTAAATGTGT-CTTCGGTATGC--ATCTCAATTGGACC	488
P_parasitica_GU111682	-ATTTGGGAACTT-AATGTGT-CTTCGGTATGC--ATCTCAATTGGACC	862
P_nicotianae_FJ801260	-ACTTAATGTGTACTTCGGTATGCATCTCAA-----	788
P_nicotianae_FJ801517	-----	
P_nicotianae_FJ802104	-ATTTGGGAACTTAAATGTGTACTTCGGTATGCAT--CTCAA-----	803
P_cactorum_FJ802000	-ATTTGGGAAATG--TGTGTGTACTTCGGTATGC--ATCTCAA-----	792
P_cactorum_FJ801936	-ATTTGGGAAATG--TGTGTGTACTTCGGTATGC--ATCTCAA-----	792
P_drechsleri_FJ801619	-ATTTGGGAAACGT-TGTGTGCG-CTTCGGC-GT--GCATCTCAA-----	798
P_drechsleri_FJ801387	-ATTTGGGAAACGT-TGTGTGCG-CTTCGGC-GT--GCATCTCAA-----	798
P_hibernalis_FJ802067	TATTTGGGAAATTTGTGTTGGCGGCTTCGGCTGTTGGCATCTCAA-----	797
P_hibernalis_FJ801948	TATTTGGGAAATTTGTGTTGGCGGCTTCGGCTGTTGGCATCTCAA-----	797

¹As sequências PR1, PR2, PR3, PR4, PR5, PR6, PR7, PR8, PR9, PR11, PR14, PR17, PR18, PR19, PR20, PR22, PR25, PR26, PR27, PR30 e PR32, são originadas desse estudo, enquanto as demais foram buscadas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

B: Alinhamento de nucleotídeos de sequência do gene ITS2 (primers ITS4/ITS3) de isolados de *Phytophthora* spp. de citrus e de amostras disponíveis no GenBank¹

```

PR1          -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
PR3          -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
PR30         -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
PR2          -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
PR5          -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
PR32         -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
PR22         -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
PR6          -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
PR27         -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
PR17         -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
PR19         -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
PR14         -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
PR11         -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
PR8          -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
PR26         -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
PR18         -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
PR17         -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
PR9          -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
PR4          -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 36
P_nicotiana_FJ802104 -----CCACACATAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 44
P_parasitica_GU111682 TCATACCACACCTAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAG- 95
P_megasperma_AF541896 -----CCACACCTAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCCTTAAA 45
P_megasperma_FJ802097 -----CCACACCTAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCCTTAAA 45
P_megasperma_AF541899 -----CCACACCTAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCCTTAAA 45
P_palmivora_GU111658  CATTACCACACCTAAAAA-CTTTCCACGTGAACCGTATCAAAAC--TTAG- 97
P_citrophthora_GU133066 CATTACCACACCTAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCTTTTAG 98
P_palmivora_GU111662  CATTACCACACCTAAAAA-CTTTCCACGTGAACCGTATCAAAACT--TAG 97
P_citrophthora_FJ801247 -----CCACACCTAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCTTTTAG 45
PR20         -----AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCTTTTAG 37

```

***** ***** * * *

Continuação

PR1	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
PR3	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
PR30	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
PR2	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
PR5	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
PR32	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
PR22	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
PR6	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
PR27	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
PR17	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
PR19	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
PR14	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
PR10	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
PR8	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
PR26	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
PR18	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
PR17	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
PR9	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
PR4	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	80
P_nicotianae_FJ802104	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	88
P_parasitica_GU111682	TTGGGGGTCTTATTTGGCGCGGC--TGCTGGCTT--AATTG-TTGGCG-	139
P_megasperma_AF541896	TTTGGGGGCTTGCTCGGCGCGTGTGTGCTGGCCTGTAATGGGTCGGCGT	95
P_megasperma_FJ802097	TTTGGGGGCTTGCTCGGCGCGTGTGTGCTGGCCTGTAATGGGTCGGCGT	95
P_megasperma_AF541899	TTTGGGGGCTTGCTCGGCGCGTGTGTGCTGGCCTGTAATGGGTCGGCGT	95
P_palmivora_GU111658	TTGGGGGTCTCTTTCGGCGCGGC--TGCTGGCTT--CATTG-CTGGCG-	141
P_citrophthora_GU133066	TTGGGGGTGTTGCTTGGCATTT-----GGCTG	125
P_palmivora_GU111662	TTGGGGGTCTCTTTCGGC-----GGC--	118
P_citrophthora_FJ801247	TTGGGGGTGTTGCTTGGCATTT-----TGCTG	72
PR20	TTGGGGGTGTTGCTTGGCATTT-----TGCTG	64

** ***** * * *** **

Continuação

PR1	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
PR3	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
PR30	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
PR2	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
PR5	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
PR32	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
PR22	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
PR6	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
PR27	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
PR25	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
PR19	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
PR14	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
PR11	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
PR8	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
PR26	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
PR18	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
PR17	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
PR9	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
PR4	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	130
P_nicotianae_FJ802104	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	138
P_parasitica_GU111682	GCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCG	189
P_megasperma_AF541896	GCTGCTGCTGGGCGGGCTCTATCATG-----GGCGAGCGTTTGGGCTTCG	140
P_megasperma_FJ802097	GCTGCTGCTGGGCGGGCTCTATCATG-----GGCGAGCGTTTGGGCTTCG	140
P_megasperma_AF541899	GCTGCTGCTGGGCGGGCTCTATCATG-----GGCGAGCGTTTGGGCTTCG	140
P_palmivora_GU111658	GCTGCTGTTGGGAGAGCTCTATCATG-----GCGAGCGTTTGGGCTTCG	185
P_citrophthora_GU133066	AGCCGCGCCCTATCATGGCGAATGTT-----TGGACTTCG	160
P_palmivora_GU111662	-----GGCTTCG	125
P_citrophthora_FJ801247	AGCCGCGCCCTATCATGGCGAATGTT-----TGGACTTCG	107
PR20	AGCCGCGCCCTATCATGGCGAATGTT-----TGGACTTCG	99

* *****

Continuação

PR1	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
PR3	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
PR30	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
PR2	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
PR5	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
PR32	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
PR22	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
PR6	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
PR27	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
PR25	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
PR19	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
PR14	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
PR11	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
PR8	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
PR26	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
PR18	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
PR17	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
PR9	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
PR4	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	230
P_nicotianae_FJ802104	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	238
P_parasitica_GU111682	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	289
P_megasperma_AF541896	CATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	237
P_megasperma_FJ802097	CATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	237
P_megasperma_AF541899	CATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	237
P_palmivora_GU111658	TATACTGTAGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	278
P_citrophthora_GU133066	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	257
P_palmivora_GU111662	TATACTGTAGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	218
P_citrophthora_FJ801247	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	204
PR20	TATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAG	196

Continuação

PR1	CAGGGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
PR3	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
PR30	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
PR2	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
PR5	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
PR32	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
PR22	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
PR6	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
PR27	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
PR25	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
PR19	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
PR14	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
PR11	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
PR8	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
PR26	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
PR18	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
PR17	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
PR9	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
PR4	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	261
P_nicotianae_FJ802104	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGAT	288
P_parasitica_GU111682	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGAT	339
P_megasperma_AF541896	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGAT	287
P_megasperma_FJ802097	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGAT	287
P_megasperma_AF541899	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGAT	287
P_palmivora_GU111658	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGAT	328
P_citrophthora_GU133066	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGAT	307
P_palmivora_GU111662	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGAT	268
P_citrophthora_FJ801247	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGAT	254
PR20	CAGTGGATGTCTAGGCTCGCGCATCGATGAA-----	227
	*** ***** * *****	

¹As sequências PR1, PR2, PR3, PR4, PR5, PR6, PR7, PR8, PR9, PR11, PR14, PR17, PR18, PR19, PR20, PR22, PR25, PR26, PR27, PR30 e PR32, são originadas desse estudo, enquanto as demais foram buscadas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).