

Diversidade de *Phytophthora parasitica* isolados de Citrus usando seqüências de nucleotídeos da região ITS-5.8S rDNA

Daniel Dias Rosa ^{1*}, Marcos Antonio Machado ³, Maria Luisa Penteadó Natividade Targon ³, Edson Luiz Furtado ²

¹ ESALQ/USP - Depto. de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Fitopatologia, Av. Pádua Dias, 11, 13418-900, Piracicaba, SP; ² Departamento de Produção Vegetal, FCA, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, ³ Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira, CAPTACSM, Cordeirópolis, São Paulo.

* Autor para correspondência. <danieldr@hotmail.com>

Data de chegada: 27/04/2004. Aceito para publicação em: 26/08/2005.

1065

ABSTRACT

Rosa, D. D.; Machado, M. A.; Targon, M. L. P. N.; Furtado, E. L. Genotypic diversity among *P. parasitica* isolates revealed by ITS-5.8S rDNA nucleotide sequences. *Summa Phytopathologica*, v.32, n.2, p.190-193, 2006.

Phytophthora parasitica is been considered one of the most prevalent citrus soilborn pathogens in Brazil. Fourteen isolates were collected in different region of São Paulo state. Amplification of the ITS region using primers ITS1 and ITS2 produced DNA fragments of 812 to 860 bp, that were compared with other sequences obtained to Gene Bank (NCBI). Neighbor-joining analysis, with 1000

bootstrap revealed an average similarity of 99,3 to 100% between the isolates, and 98,1 to 99,9% between S. Paulo state isolates and *P. nicotianae* (= *Phytophthora parasitica*) obtained from the Gene Bank (gi|8927482). The ITS1 was more conserved than to the ITS2. This is a good tool for quick diagnosis of *Phytophthora* citrus diseases.

Additional keywords: citrus gummosis; ITS, Phylogenetic, Ribosomal DNA.

RESUMO

Rosa, D. D.; Machado, M. A.; Targon, M. L. P. N.; Furtado, E. L. Diversidade de *Phytophthora parasitica* isolados de Citrus usando seqüências de nucleotídeos da região ITS-5.8S rDNA. *Summa Phytopathologica*, v.32, n.2, p.190-193, 2006.

Realizou-se estudo para caracterização e verificação da diversidade genética de *Phytophthora parasitica*, agente causador da gomose dos citros. Quatorze isolados de *Phytophthora parasitica*, provenientes do Estado de São Paulo, foram seqüenciados a partir das regiões internas transcritas (ITS1 e ITS2) do gene 5.8S. Obtiveram-se seqüências de 812 pb a 860 pb que foram comparadas com seqüências de outras espécies de *Phytophthora* spp depositadas no

NCBI. Foram feitos estudos filogenéticos, utilizando-se o método "neighbor-joining" com 1000 "bootstrap" e construído o dendrograma mais representativo. Obtiveram-se os resultados de 98,88% a 100% de similaridade genética entre os 14 isolados paulistas, e 99,5% a 98,8% entre estes e a seqüência de *P. nicotianae* (gi|8927482) obtida do GenBank - NCBI.

Palavras-chave adicionais: DNA ribossomal, ITS, Filogenia.

O gênero *Phytophthora*, estudado desde o início da fitopatologia (1), abrange patógenos destrutivos a inúmeras espécies de plantas no mundo, tendo sido descritas mais de 60 espécies. *Phytophthora parasitica* Dastur (= *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* Breda de Haan) é uma das muitas estudadas e conhecidas devido aos danos que causa à cultura dos citros. É comum nas regiões subtropicais e, hoje, é uma das espécies mais significativas dentro do complexo de doenças Citrus/*Phytophthora*. Classificada, taxonomicamente, como pertencente ao reino Chromista, este patógeno é um dos agentes causais da gomose dos citros, que compreende, atualmente, 11 espécies de *Phytophthora* relacionadas como patógenos agentes causais em plantas cítricas no mundo todo (3).

A classificação taxonômica clássica de *Phytophthora parasitica* leva em consideração importantes critérios, tais como: forma e natureza do esporângio, forma de inserção do anterídio com o oogônio e seletividade de hospedeiros (9).

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), já foram utilizadas, anteriormente, na taxonomia de *Phytophthora* (7). A região ITS1-5.8S-ITS2 também tem sido muito utilizada para fins de filogenia por ser conservada dentre espécies e com baixas variações dentro do gênero (2). As seqüências desta região têm sido muito utilizadas na detecção e identificação de

novas espécies de *Phytophthora* (5) e outros Oomycotas, como *Pythium* (8).

Utilizando-se as informações de seqüências da região ITS-rDNA, a hipótese da evolução do gênero *Phytophthora* a partir de ancestrais do gênero *Pythium* pode ser estudada. O sequenciamento desta região permite, também, a realização de um estudo mais consistente da relação filogenética entre o gênero *Phytophthora* e os outros Oomycotas. Estudos realizados por Briard et al. (1) na família Pythiaceae, utilizando seqüências do 28S rDNA e ITS, demonstram uma divisão em grupos distintos, tais como dos gêneros *Phytophthora* e *Pythium*, que corroboram para a hipótese da evolução da família Pythiaceae.

O objetivo deste estudo foi caracterizar molecularmente e analisar as relações filogenéticas existentes entre os isolados de *P. parasitica* obtidos de plantas de citros de diversas regiões produtoras no Estado de São Paulo, juntamente com isolados obtidos de culturas monozoospóricas a partir dos isolados originais.

Foram caracterizados e analisados 14 isolados pertencentes a micoteca do CAPTACSM, Cordeirópolis, São Paulo, Brasil. Os isolados monozoospóricos (Mz) foram obtidos através da

diluição seriada de uma suspensão de zoósporos de cada isolado original. A identificação dos isolados monozoospóricos em relação ao isolado original está listada na Tabela 1.

Todos os isolados foram cultivados em meio de cultura Cenoura-Ágar (3), para onde foram transferidos fragmentos obtidos a partir da cultura permanente, conservados em tubos de ensaio contendo óleo mineral. Os isolados pertencentes à micoteca do Laboratório de fitopatologia do CAPTACSM. A cultura foi incubada a 24°C, no escuro, por 6 dias, a fim de se obter um crescimento vigoroso do micélio. Após este período, o micélio foi raspado, acondicionado em microtubos de 1,7 ml e, em seguida, foi feita a extração de DNA.

Inicialmente, o micélio foi triturado (700 mg) com auxílio de nitrogênio líquido e o DNA genômico extraído de acordo com protocolo padrão (6). O DNA obtido foi suspenso em 80 µl de TE+RNase e incubado por 4 horas a 37°C. Em seguida, procedeu-se a reação de pcr utilizando-se os oligonucleotídeos universais para região ribossômica ITS4 e ITS5 (11) para região ITS e gene 5.8S rDNA. O produto de PCR foi sequenciado em um aparelho Applied Biosystems Model 3700 DNA Sequencer, de acordo com instruções do fabricante, utilizando-se os oligonu-

Tabela 1. Isolados e seqüências de *Phytophthora* spp. e *Pythium citrinum* estudados.

Isolados/Seqüências	Acesso ^(a)	Hospedeiro	Origem	Ano
PP01 – <i>Phytophthora parasitica</i>	IAC 01/95	<i>Citrus</i> spp.	Cordeirópolis /SP/Brasil	1995
02 – <i>Phytophthora parasitica</i>	IAC 02/95	<i>Citrus</i> spp.	Limeira /SP/Brasil	1995
03 – <i>Phytophthora parasitica</i>	IAC 03/95	<i>Citrus</i> spp.	Cordeirópolis /SP/Brasil	1995
04 – <i>Phytophthora parasitica</i>	IAC 04/95	<i>Citrus</i> spp.	Limeira/SP/ Brasil	1995
06 – <i>Phytophthora parasitica</i>	IAC 06/95	<i>Citrus</i> spp.	Taubaté /SP/ Brasil /	1995
07 – <i>Phytophthora parasitica</i>	IAC 07/95	<i>Citrus</i> spp.	Limeira /SP/Brasil	1995
08 – <i>Phytophthora parasitica</i>	IAC 08/95	<i>Citrus</i> spp.	Limeira/SP/ Brasil	1995
09 – <i>Phytophthora parasitica</i>	IAC 09/95	<i>Citrus</i> spp.	Limeira /SP/Brasil/	1995
10 – <i>Phytophthora parasitica</i>	IAC 10/95	<i>Citrus</i> spp.	Taubaté /SP/Brasil/	1995
11 – <i>Phytophthora parasitica</i>	IAC 11/95	<i>Citrus</i> spp.	Jales /SP/Brasil	1995
12 – <i>Phytophthora parasitica</i>	IAC 12/95	<i>Citrus</i> spp.	Laranjal Paulista/SP/Brasil	1995
15 – <i>Phytophthora parasitica</i>	IAC 15/95	<i>Citrus</i> spp.	Conchal/SP/Brasil	1995
16 – <i>Phytophthora parasitica</i> – Mz-15 ^(b)	IAC 16/95	<i>Citrus</i> spp.	Conchal /SP/Brasil	1995
17 – <i>Phytophthora parasitica</i> – Mz-15 ^(b)	IAC 17/95	<i>Citrus</i> spp.	Conchal/SP/Brasil	1995
<i>Phytophthora citricola</i>	AF266788	<i>Rubus idaeus</i>	Irlanda	1986
<i>Phytophthora cithophora</i>	AF266785	<i>Actinidia chinensis</i>	Chile	1989
<i>Phytophthora capsici</i>	gi 8927493	<i>Piper nigrum</i>	Índia	1989
<i>Phytophthora cactorum</i>	AF266772	<i>Rubus idaeus</i>	País de Gales	1985
<i>Phytophthora nicotinae</i>	AF266776	—	Austrália	—
<i>Phytophthora brassicae</i>	AF266801	<i>Brassica chinensis</i>	Reino Unido	2000
<i>Phytophthora botryosa</i>	AF266784	—	—	—
<i>Phytophthora tropicalis</i>	AY208125	—	China	2002
<i>Phytophthora bisheria</i>	AY241924	<i>Fragaria x ananassa</i>	EUA	2001
<i>Phytophthora arecae</i>	AF266781	<i>Cocos nucifera</i>	Indonésia	1991
<i>Phytophthora cajani</i>	AF266765	<i>Cajanus cajan</i>	Índia	1985
<i>Phytophthora cambivora</i>	AF266763	<i>Rubus idaeus</i>	Escócia	1985
<i>Phytophthora cinnamoni</i> var. <i>parvispora</i>	AY302184	—	Alemanha	2002
<i>Phytophthora cinnamoni</i>	AF266764	<i>Syzygium aromaticum</i>	Malásia	1989
<i>Phytophthora boehmeriae</i>	AF228076	<i>Ailanthus altissima</i>	Coréia	2000
<i>Pythium citrinum</i>	AY197328	Solo	França	2002

(a) Número de acesso do GenBank, NCBI, ou dos isolados depositados juntos ao CAPTA Citros Sylvio Moreira

(b) Mz – isolado que originou os isolados monozoospóricos

cleotídeos universais ITS2, ITS3, ITS4 e ITS5 (11) para a reação de sequenciamento, sendo obtido no final do sequenciamento quatro seqüências que possuem sobreposição, proveniente de cada oligonucleotídeo que possibilitou a obtenção de uma seqüência consenso com qualidade do fragmento da região ITS1-5,8S rDNA-ITS2 de cada um dos 14 isolados de *P. parasitica*.

Utilizou-se o pacote de programas “Phred/Phrap/Consed” para análise da qualidade das seqüências de todos os isolados de *P. parasitica*. Também foram incluídas no estudo as seqüências da região ITS-5.8S rDNA de diversas espécies do gênero *Phytophthora* presentes no GenBank (Tabela 1). As seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa ClustalX1.83 e o resultado deste alinhamento foi utilizado para análise filogenética no programa PAUP* (version 4.0b5a) (10) com análise heurística para utilização no algoritmo de “Neighbor-Joining” com valores de 1000 “bootstrap”, para obtenção de um dendrograma que melhor representasse as relações filogenéticas.

As seqüências consensos obtidas, a partir das quatro seqüências amplificadas pelos oligonucleotídeos, variaram de 812 pb a 860 pb, com as regiões ITS1 e ITS2 variando entre 230-239 pb e 420-470 pb, respectivamente. A região do gene 5.8S rDNA amplificou fragmento de 162 pb.

Na análise da região ITS-5.8S rDNA constatou-se que os 14 isolados de *P. parasitica*, obtidos de diversas áreas do estado de São Paulo, apresentaram de 99,5% a 98,8% de similaridade genética em relação ao isolado de *P. nicotianae* (AF266776), e uma similaridade genética variando de 98,88% a 100,00% entre os 14 isolados.

As relações filogenéticas obtidas entre os isolados de *P. parasitica* e as seqüências depositadas no NCBI, foram analisadas pelo método “neighbor-joining” e de parsimonia heurística. A análise demonstrou uma grande proximidade dos isolados de *P. parasitica* obtidos no estado de São Paulo em relação ao isolado de *P. nicotiana* (AF266776), seguido por *P. cactorum* (Figura 1). Estes resultados corroboram a hipótese que historicamente o centro de disseminação da *P. parasitica* na citricultura também tenha seu centro de origem a partir da região de limeira, visto que todos os isolados de regiões mais distantes apresentaram grande similaridade com os isolados provenientes desta região, fortalecendo que a distribuição da *P. parasitica* pelo estado de São Paulo foi ocasionada por mudas contaminadas.

Na análise do dendrograma, obtido na análise filogenética (Figura 1), observa-se a formação de cinco grupos. No grupo 1 ficaram os isolados 03, 07, 08, 09, e 10, sendo que entre estes a similaridade genética variou de 99,25% a 100,00%, e uma similaridade genética média de 99,4% entre estes isolados e o isolado de *P. nicotiana* (*Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*) (AF266776).

No grupo 2, ficaram os isolados 15, 16 e 17, com uma similaridade genética média de 99,75% entre eles, sendo que os isolados 16 e 17 são isolados monozooprícos provenientes do isolado 15. No grupo três ficaram os isolados 12 e 02 com 99,60% de similaridade genética; no grupo quatro os isolados 04 e 06, com 99,75% de similaridade; e no grupo 5 ficaram os isolados PP01, 11 com 99,75% de similaridade genética.

Neste estudo mostrou-se a existência da variabilidade genética de *Phytophthora parasitica* e, juntamente, sua filogenia, sendo muitas vezes constatada uma diferença filogenética de 1,2% entre as seqüências dos isolados de *P. parasitica*. Esta diferen-

ça pode, muitas vezes, significar diferenças de subgrupos, como no caso de *Rhizoctonia solani*, onde diferenças de 1,5% na seqüência de nucleotídeos da região ITS-5.8S rDNA podem separar os subgrupos GA1 IA e GA1 IB (4).

Constatou-se no presente estudo que a região ITS-5.8S rDNA apresenta-se como uma boa ferramenta para estudos filogenéticos e de taxonomia, como já indicado na literatura. As pequenas variações entre indivíduos de regiões distintas geograficamente e a discriminação entre espécies colocaram a análise de similaridade da seqüência desta região como importante método auxiliar da taxonomia de *Phytophthora parasitica* e ajudar em análises epidemiológicas deste patógeno, analisando fluxo gênico, sendo necessário estudos mais aprofundados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Briand, M.; Dueterte, M.; Rouxel, F. and Brygoo, Y. Ribosomal RNA sequence divergence within the Pythiaceae. **Mycology Research**, London, v. 99, n.4, p. 1119-1127, 1995.
2. Cooke, D.E.L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G. and Brasier, C.M. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 30, n.1, p. 17-32, 2000.
3. Erwin, D.C.; Ribeiro, O.K. **Phytophthora diseases worldwide**. St.Paul: APS Press, 1996. 562p.
4. Gonzalez, D.; Carling, D.E.; Kuninaga, S.; Vilgalys, R. and Cubeta, M.A. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. **Mycologia**, New York, v. 93, n. 6, p. 1138-1150, 2001
5. Jung, T.; Nechwatal, J.; Cooke, D.E.L.; Hartmann, G.; Blaschke, M.; Oßwald, W.F.; Duncan, J.M. and 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
6. Kuramae-izioka, E.E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista UNIMAR de Ciência Agrícola**, Maringa, v.19, n. 2, p.683-689, 1997.
7. Lee, S.B.; Taylor, J.W. Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 636-653, 1992.
8. Paul, B.; Galland, D.; Bhatnagar, T. and Dulieu, H. A new species of *Pythium* isolated from the Burgundy region in France. **FEMS Microbiology Letters**, Delft, v. 158, n.2, p.207-213, 1998.
9. 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.
10. Swofford, D.L. **PAUP*** Phylogenetic analysis using parsimony: * and other methods: version 4.0. Sunderland: Sinauer Associates, 2001
11. White, T.J.; Bruns, T.D.; Lee, S. & Taylor, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In **PCR protocols: a guide to methods and applications** (eds. Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J. & White, T.J.). San Diego: Academic Press, 1990, pp. 315-322.

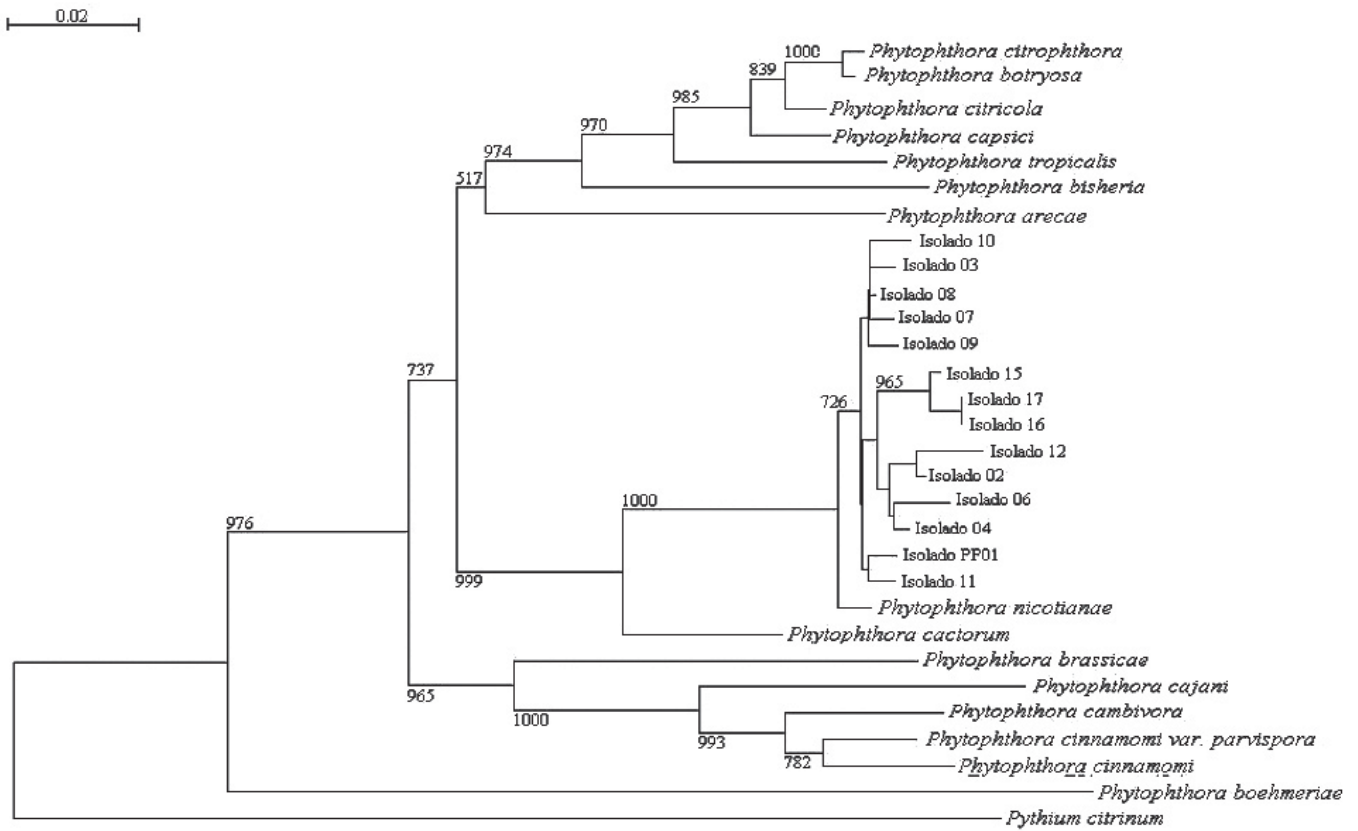


Figura 1. Dendrograma filogenético baseado na análise “Neighbour-joining” da região ITS1-5.8S rDNA-ITS2, construído usando o método de neighbor-joining com base em 1000 réplicas de “bootstrap”. O número nas ramificações representa o valor de “bootstrap”. O isolado *Pythium citrinum* foi utilizado como “outgroup”.