

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**FISIOLOGIA, PATOGENICIDADE, SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Phytophthora capsici* Leonian
OBTIDO DE PIMENTÃO (*Capsicum annuum* L.)**

JANAÍNA MARIANNO DE MARQUE

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia, Área de
Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU – SP
Março - 2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**FISIOLOGIA, PATOGENICIDADE, SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Phytophthora capsici* Leonian
DO PIMENTÃO (*Capsicum annuum* L.)**

JANAÍNA MARIANNO DE MARQUE

Orientador: Prof. Dr. Nilton Luiz de Souza

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia, Área de
Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU – SP

Março – 2002

Aos meus pais **Vanderlei de Marque** e
Célia Maria Marianno de Marque pela educação,
amor e incentivo que me são dedicados

OFEREÇO

À minha irmã **Maitê Marianno de Marque**,
à minha avó **Alice Camargo Mariano** e ao
meu namorado **Aniello Antonio Cutolo Filho**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Nilton Luiz de Souza** pela orientação na realização deste trabalho, pelos ensinamentos e amizade.

À **FAPESP** pela concessão de Auxílio para a realização da pesquisa.

Ao **CNPq** pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. **Antônio Celso Wagner Zanin** e toda a sua família pelo apoio, amizade e ajuda.

À empresa **Sakata Seed Sudamerica LTDA**, na pessoa do **Dr. Rômulo Fujito Kobori** pela imensa colaboração neste trabalho.

Aos **Professores e Funcionários** do Departamento de Produção Vegetal pelos ensinamentos, apoio e colaboração.

Aos **colegas** pós-graduandos do curso de Proteção de Plantas.

Aos amigos **Vandeir e Márcia** pelo apoio e disposição.

Aos amigos **Rosana, Michelle, Deine, Márcia, Renata, Adriana, Viviane, Denise, César, Mauricio e Laerte** pela companhia, diversão e incentivo.

À Prof.^a. Dr.^a. **Eiko Eurya Kuramae-Izioka** e à Dr.^a **Roseli Chela Fenille** pelo auxílio na caracterização molecular.

À minha grande amiga **Ana Paula Zimbardi Lombardi** pelo companheirismo, amizade e apoio.

Aos Professores **Edson Luiz Furtado, José Raimundo de Souza Passos e Lician Vaz de Arruda Silveira** pelo auxílio nas análises estatísticas..

À **Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP**, pela formação e oportunidade concedidas.

Aos **funcionários** da Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônomicas pelo auxílio na revisão bibliográfica.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
1 RESUMO.....	1
2 SUMMARY.....	2
3 INTRODUÇÃO.....	3
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
4.1 <i>Phytophthora capsici</i> : agente causal da murchadeira do pimentão.....	5
4.2 Reprodução sexual de <i>Phytophthora capsici</i>	7
4.3 Patogenicidade de <i>Phytophthora capsici</i> a pimentão.....	9
4.4 Mecanismos de resistência de pimentão a <i>Phytophthora capsici</i>	10
4.5 Controle químico de <i>Phytophthora capsici</i>	12
4.6 Aeração e produção de esporângios de <i>Phytophthora capsici</i>	13
4.7 Caracterização molecular de <i>Phytophthora capsici</i>	13
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
5.1 Estabelecimento da coleção de <i>Phytophthora capsici</i>	16
5.2 Determinação dos grupos de compatibilidade.....	18
5.3 Teste de agressividade de isolados.....	19
5.4. Influência do genótipo e da idade das plantas na manifestação da resistência de pimentão a <i>Phytophthora capsici</i>	21
5.5 Teste de fungicidas “in vitro”	22

5.6	Influência da aeração na produção de esporângios.....	23
5.7	Caracterização molecular.....	26
5.7.1	Extração do DNA total.....	26
5.7.2	Reações de RAPD.....	27
5.7.3	Seqüenciamento das regiões ITS.....	29
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
6.1	Determinação dos grupos de compatibilidade.....	30
6.2	Teste de agressividade de isolados.....	33
6.3	Influência do genótipo e da idade das plantas na manifestação da resistência de pimentão a <i>Phytophthora capsici</i>	35
6.4	Teste de fungicidas “in vitro”.....	37
6.5	Influência da aeração na produção de esporângios.....	41
6.6	Caracterização molecular.....	44
7	CONCLUSÕES.....	50
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
9	APÊNDICE.....	61

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
1. Meio seletivo (CMA + antibióticos) para <i>Phytophthora capsici</i>	17
2. Relação de isolados de <i>Phytophthora capsici</i> mantidos na micoteca do Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Produção Vegetal – FCA - UNESP/Botucatu/SP.....	18
3. Genótipos utilizados no experimento de resistência.....	21
4. Seqüência dos “primers” usados em reações de RAPD para determinar similaridade genética entre isolados de <i>Phytophthora capsici</i>	27
5. Grupos de compatibilidade de isolados de <i>Phytophthora capsici</i> obtidos de pimentão.....	31
6. Teste de agrupamento Scott-knott para as médias de área sob a curva de progresso da doença de isolados de <i>Phytophthora capsici</i>	33
7. Teste de agrupamento Scott-knott para as médias de área sob a curva de progresso da doença de grupos de compatibilidade de <i>Phytophthora capsici</i>	34
8. Taxas de crescimento micelial (cm/dia) de <i>Phytophthora capsici</i> em meios de cultura contendo diferentes doses de clorotalonil.....	38
9. Taxas de crescimento micelial (cm/dia) de <i>Phytophthora capsici</i> em meios de cultura contendo diferentes doses de mancozeb.....	38
10. Taxas de crescimento micelial (cm/dia) de <i>Phytophthora capsici</i> em meios de cultura contendo diferentes doses de oxiclreto de cobre.....	38

11. Taxas de crescimento micelial (cm/dia) de <i>Phytophthora capsici</i> em meios de cultura contendo diferentes doses de oxicleto de cobre + mancozeb.....	39
12. Taxas de crescimento micelial (cm/dia) de <i>Phytophthora capsici</i> em meios de cultura contendo diferentes doses de oxicleto de cobre + clorotalonil.....	39
13. Taxas de crescimento micelial (cm/dia) de <i>Phytophthora capsici</i> em meios de cultura contendo diferentes doses de fungicidas.....	40
14. Produção de esporângios/mL, pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) e Mann-Whitney, segundo o tipo de vedação.....	41
15. Homologia da seqüência do gene 5.8SrDNA de isolados de <i>Phytophthora capsici</i>	49
16. Taxas de morte/dia de genótipos comerciais de pimentão plantados no estado de São Paulo.....	62
17. Medidas das concentrações de O ₂ e CO ₂ e da quantidade de esporângios/mL das parcelas testemunha e vedadas com rolha.....	63
18. Matriz de similaridade genética entre isolados de <i>Phytophthora capsici</i> de pimentão.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Diagrama de uma placa inoculada com discos dos isolados padrão A1 e A2 e com dois discos do mesmo isolado a ser identificado (?).	19
2. Frascos utilizados para as medidas de O ₂ e CO ₂	24
3. Aparelho medidor de gases.	25
4. Pólos de produção de pimentão no estado de São Paulo ⁽¹⁾ (■) e número de isolados dos grupos de compatibilidade A1 (●) e A2 (●).	32
5. Curvas de sobrevivência (Kaplan-Meier, 1958) de genótipos de pimentão inoculados com <i>P. capsici</i> e teste log-rank ($x^2 = 93,78$ e $p < 0,0001$).	35
6. Curvas de sobrevivência (Kaplan-Meier, 1958) de plantas de pimentão com diferentes idades (40, 60 e 90 dias após a semeadura) inoculadas com <i>P. capsici</i> e teste log-rank ($x^2 = 64,84$ e $p < 0,0001$).	36
7. Quantidade de esporângios dos isolados PI-08/A2 (I), PI-12/A1 (II), PI-20/A2 (III) e PI-22/A1 (IV) nas parcelas testemunha (●) (20 frascos) e vedadas com rolha (✕) (20 frascos), de acordo com as concentrações de O ₂ (A) e CO ₂ (B).	43
8. Padrão de bandas gerado pelo polimorfismo de DNA amplificado ao acaso com o “primer” G-17, entre os 24 isolados (Quadro 2) de <i>Phytophthora capsici</i> . MV=marcador molecular Ladder 1kb.	46

9. Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, baseado no coeficiente Simple Matching, a partir das bandas obtidas por RAPD com os “primers” G-04, G-05, G-16, G-17, G-18 e OPP-6, em análise de isolados de *Phytophthora capsici* de pimentão..... 47
10. Árvore ilustrando as distâncias derivadas das seqüências das regiões ITS-5.8SrDNA dos isolados de *Phytophthora capsici* (*Isolados obtidos do NCBI, acessos números gi|7453612 e gi|7453609 de *P. infestans* e *P. capsici*, respectivamente). Os números nos pontos de ramificação indicam as porcentagens de valores de bootstrap (baseado em 1000 bootstraps)..... 49

1 RESUMO

O pimentão (*Capsicum annuum*) é uma hortaliça de grande consumo no Brasil, e a murcheira, causada por *Phytophthora capsici*, é uma das principais doenças da cultura, podendo causar perdas de até 100%. Este trabalho visou a avaliação de diversas características do patógeno: agressividade, nível de resistência dos genótipos de pimentão cultivados no estado de São Paulo, sensibilidade a fungicidas, oxigenação para produção de esporângios e caracterização molecular. A determinação destas variáveis tem importância prática para o produtor, na escolha correta de genótipo de pimentão e estratégia de controle; e, para instituições de pesquisa, na otimização da produção de inóculo para programas de melhoramento. Concluiu-se que a agressividade não depende do grupo de compatibilidade; assim como a sensibilidade a fungicidas e o comportamento em relação à oxigenação. Entre os genótipos escolhidos para o teste de resistência o híbrido Nathalie foi o que apresentou o melhor nível. A idade das plantas influenciou a manifestação da resistência. O balanço O₂/CO₂ influenciou diretamente na esporulação do patógeno. Em *P. capsici* marcadores de RAPD não foram consistentes na separação de grupos de compatibilidade.

PHYSIOLOGY, PATHOGENICITY, SENSIBILITY TO FUNGICIDES AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Phytophthora capsici* Leonian OBTAINED FROM PEPPER (*Capsicum annuum* L.). Botucatu, 2002. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: JANAÍNA MARIANNO DE MARQUE
Adviser: NILTON LUIZ DE SOUZA

2 SUMMARY

The sweet pepper (*Capsicum annuum*) is a vegetable well consumed in Brazil, and the blight, caused by *Phytophthora capsici*, is the main disease of the culture, and can cause losses up to 100%. This work sought the evaluation of several characteristics of the pathogen: aggressiveness, level of resistance of pepper genotypes cultivated in the state of São Paulo, sensibility to fungicides, aeration for sporangia production and molecular characterization. The determination of these characteristics have practical importance to the grower, for the correct choice of pepper genotype and control strategy; and, to research institutions, for the correct inoculum production in breeding programs. It was concluded that the aggressiveness doesn't depend of the mating type; as well as the sensibility to fungicides and the behaviour in relation to the aeration. Among the genotypes in the resistance test, the hybrid Nathalie was the one that presented the best level. The age of the plants influenced the manifestation of the resistance. The O₂/CO₂ balance had direct influence on the sporulation of the pathogen. In *P. capsici* RAPD markers are not consistent in the separation of mating types.

Keywords: *Phytophthora capsici*, blight, characterization, bell pepper

3 INTRODUÇÃO

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) é originário da América do Sul, e seu centro de origem é na parte baixa dos Andes Peruanos ocorrendo até o México. É uma planta de clima quente, que, entretanto, suporta bem temperaturas de 15 a 20 °C. O pimentão é uma hortaliça rica em vitamina C, com um teor de 80 a 180 mg/100 g da parte comestível (Sonnenberg, 1983). A colheita se dá de 85 a 150 dias após a semeadura e pode prolongar-se por até dois meses e meio. A produtividade atinge 15 a 40 ton/ha, dependendo da variedade.

A murcha de *Phytophthora* ou murchadeira é uma das doenças mais importantes do pimentão, atacando também outras espécies de plantas, como cenoura, abóbora, melancia, pepino, mandioca, berinjela e tomate (Azevedo & Silva, 1986). O patógeno ataca plantas em qualquer estágio de desenvolvimento, podendo provocar perdas de até 100%. Em condições de sementeira, a doença se manifesta como tombamento das plântulas. Em plantas adultas provoca podridão do colo e das raízes, acarretando murcha da parte aérea, secamento e morte. Em condições de alta umidade o patógeno pode causar, no hospedeiro, necrose no caule, folhas e frutos, sintomas estes comuns dentro de casa de vegetação. Em todos os tecidos

colonizados aparecem frutificações esbranquiçadas e cotonosas, constituídas por esporângios. O patógeno ocorre em locais quentes e úmidos, com temperatura variando de 25 a 30 °C (Marque, 1999).

Este trabalho visou a avaliação de diversas características do patógeno: agressividade, nível de resistência dos genótipos de pimentão cultivados no estado de São Paulo, sensibilidade a fungicidas, oxigenação para produção de esporângios e caracterização molecular. A determinação destas características tem utilidade prática para o produtor, na escolha correta de genótipo de pimentão e estratégia de controle; e, para instituições de pesquisa, na otimização da produção de inóculo para programas de melhoramento.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 *Phytophthora capsici*: agente causal da murchadeira do pimentão

Este patógeno foi descrito pela primeira vez por Leonian (1922) no Novo México, sendo classificado taxonomicamente como pertencente ao reino Chromista (Hawksworth et al., 1995) e referido como pseudofungo (Agrios, 1997). No Brasil foi descrito pela primeira vez por Amaral (1952), causando danos para a cultura do pimentão.

O patógeno apresenta as seguintes características morfológicas: esporangióforos ramificados, esporângios geralmente ovóides, que podem variar sua forma no meio de cultura. A papila é bastante proeminente, normalmente única e apical, mas o mesmo esporângio pode ter até três papilas dispostas aleatoriamente. O tamanho do esporângio é bastante variável, tendo, em média, 60x36 µm. A germinação ocorre geralmente através de zoosporos, que são esporos móveis, biflagelados (Leonian, 1922). Se as condições foram desfavoráveis para a produção de zoosporos, o esporângio absorve os flagelos soltos no citoplasma e, em condições de alta temperatura, germinam por meio de tubos germinativos (germinação direta)(Erwin e Ribeiro, 1996).

P. capsici é predominantemente heterotático, ou seja, necessita de dois isolados de grupos diferentes de compatibilidade (grupos A1 e A2) para a formação da fase sexual. Os oosporos são pleuróticos e os anterídios são anfígenos. O micélio é composto de filamentos hialinos, ramificados e sem septos (Erwin & Ribeiro, 1996).

A murcha de *Phytophthora* ou murchadeira é uma das doenças mais importantes do pimentão, atacando também outras espécies de plantas, como cenoura, abóbora, melancia, pepino, mandioca, berinjela e tomate (Azevedo & Silva, 1986). O patógeno ataca plantas em qualquer estágio de desenvolvimento. Em condições de sementeira, a doença se manifesta como “damping off” das plântulas. Em plantas adultas provoca podridão do colo e das raízes, acarretando murcha da parte aérea, secamento e morte. Em condições de alta umidade o patógeno pode causar, no hospedeiro, necrose no caule, folhas e frutos, sintomas estes comuns dentro de casa de vegetação. Em todos os tecidos colonizados aparecem frutificações esbranquiçadas e cotonosas, constituídas por esporângios. O patógeno ocorre em locais quentes e úmidos, com temperatura variando de 25 a 30 °C. As principais medidas de controle recomendadas por Kurozawa & Pavan (1997) são a rotação de culturas, plantio em áreas não contaminadas e uso de fungicidas sistêmicos ou protetores. A solarização também é considerada um efetivo método de controle, tanto em campo aberto como em casa de vegetação (Marque, 1999).

4.2 Reprodução sexual de *Phytophthora capsici*

Heterotalismo é a reprodução sexual na qual a conjugação é possível somente por meio da interação entre talos diferentes (Hawksworth et al., 1995). Aproximadamente 25 espécies de *Phytophthora* são homotáticas, ou seja, produzem gametângios em culturas únicas. Muitas outras, incluindo espécies importantes economicamente, são heterotáticas (Brasier, 1992). Estas espécies contêm dois grupos de compatibilidade designados como A1 e A2. Embora após o contato do micélio dos grupos A1 e A2 haja formação de oosporos, os isolados de cada tipo são bissexuais e autoincompatíveis (Erwin e Ribeiro, 1996).

Os primeiros trabalhos sobre reprodução sexuada no gênero *Phytophthora* foram realizados por Ashby (1922) e Gadd (1924), que demonstraram o heterotalismo em *P. palmivora*. Galindo e Gallegly (1960) demonstraram a natureza heterotática de *P. infestans*, e, arbitrariamente, designaram os grupos de compatibilidade A1 e A2. Shaw (1987) demonstrou que isolados de *P. infestans* do grupo A1 param de crescer quando encontram hifas do grupo A2, enquanto que hifas do segundo grupo crescem sobre o micélio do primeiro. Portanto, o que ocorre é a colonização do grupo A1 pelo grupo A2.

Os oosporos (estruturas sexuais formadas após o contato dos micélios dos grupos A1 e A2) são os propágulos mais resistentes produzidos pelo gênero *Phytophthora* (Erwin e Ribeiro, 1996), e o tempo de sobrevivência varia de acordo com a espécie.

A função dos grupos de compatibilidade A1 e A2 tem sido considerada como um fenômeno de hibridização verdadeira, no qual fatores que condicionam o parasitismo e muitas outras características se recombinariam na progênie (Erwin e Ribeiro, 1996).

Ocasionalmente, isolados do grupo A2 podem se tornar autocompatíveis espontaneamente, principalmente em culturas velhas (Timmer et al., 1970; Brasier, 1972; Tsao et al., 1980). Essa característica, geralmente, não é sustentada após repicagens sucessivas (Brasier, 1972).

A formação de oosporos também pode ser resultado do estímulo de substâncias formadas pelo grupo de compatibilidade oposto. Brasier (1972) sugeriu que uma substância química difusível do grupo oposto seria a responsável pela indução da formação de oosporos.

Os diferentes mecanismos envolvidos na produção de oosporos heterotáticos incluem: hibridização direta, estímulo pela idade da cultura e substâncias exógenas, e estímulo químico do grupo de compatibilidade oposto (Erwin e Ribeiro, 1996).

Phytophthora capsici é uma das espécies heterotáticas do gênero, que necessitam dos dois grupos de compatibilidade A1 e A2 para a formação da fase sexual (Savage et al., 1968). Matsuoka e Ansani (1984) verificaram que oosporos de *P. capsici* só se formam em tecidos inoculados com ambos grupos de compatibilidade, provando a natureza heterotática do patógeno. Um estudo realizado por Mchau e Coffey (1995) faz uma redescrição da espécie baseada em duas subpopulações, comprovando que a formação de oosporos só se dá na presença dos grupos A1 e A2, fenômeno verificado também em experimentos realizados por Marque et al. (1999a).

Outras características ainda precisam ser estudadas com relação aos grupos de compatibilidade de *P. capsici*. Segundo Rêgo e Reifschneider (1982) a distribuição dos grupos de compatibilidade parece estar mais relacionada com a região geográfica de origem do que com suas plantas hospedeiras.

4.3 Patogenicidade de *Phytophthora capsici* em pimentão

O inóculo inicial de *P. capsici* pode ser composto de micélio ou oosporos em restos culturais. Na presença do hospedeiro suscetível ocorre a germinação e a diferenciação de esporângios e zoosporos (partículas infectivas do patógeno). Os zoosporos entram em contato com o hospedeiro, encistam e germinam, penetrando diretamente ou indiretamente por ferimentos ou estômatos. No início, a colonização é intercelular, atingindo as raízes e o coleto. Com o avanço da infecção, a colonização torna-se intracelular e atinge os vasos, causando estrangulamento e murcha (Matsuoka e Vanetti, 2001). Segundo Palloix e colaboradores (1985, 1998) a formação de esporângios, a liberação de zoosporos e a infecção das raízes se dá de 24 a 48 horas após a inoculação.

Yang et al. (1989) e Kim e Hwang (1992) afirmam que existe diferença na agressividade de isolados de *P. capsici*, mas esta não está correlacionada com a região geográfica de origem nem com características “in vitro”; como crescimento, produção de zoosporos e morfologia da colônia. De acordo com Ortega et al. (1984b) a agressividade é maior na temperatura de $25 \pm 3,7^{\circ}\text{C}$.

A patogenicidade em *P. capsici* pode ser controlada por um gene separado ou por um sistema genético para cada hospedeiro. Em pimentão a patogenicidade é controlada por pelo menos dois genes (Polach e Webster, 1972).

A melhor forma de avaliar a agressividade de *Phytophthora* sp é a determinação da severidade de cada isolado. Esta determinação é feita por meio de medições periódicas da doença na planta, para posterior cálculo da área sob a curva de progresso da doença (ASCPD). A ASCPD é, talvez, o método mais útil para comparação de tratamentos, porque resume a epidemia na medida da doença. A precisão da ASCPD como medida de

epidemias é função dos intervalos entre as medições da doença e do tamanho destes intervalos. A forma mais precisa é o cálculo da ASCPD através da integralização das áreas trapeziodais formadas pelo gráfico de avanço da doença, conforme a fórmula abaixo (Berger, 1988).

$$ASCPD = \frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} * (T_{i+1} - T_i)$$

Onde: Y_i ... Quantidade de doença

T_i ... Tempo

Esta avaliação pode ser mais trabalhosa, mas fornece dados mais consistentes e pode detectar diferenças entre isolados prontamente. Além disso a avaliação da agressividade por meio da ASCPD indica a resistência horizontal de pimentão a *P. capsici* (Kim e Hwang, 1992; Miller et al., 1998; Polach e Webster, 1972 e Lee et al., 2001).

4.4 Mecanismos de resistência de pimentão a *Phytophthora capsici*

Os estudos sobre a herança da resistência de pimentão a *P. capsici* são conflitantes quanto ao número de genes envolvidos, alelos e suas interações (Matsuoka e Vanetti, 2001). A resistência a *P. capsici* foi identificada em certos genótipos de pimentão por Kimble e Grogan (1960). A resistência foi descrita mais tarde por Kim e Hwang (1992) como sendo governada por dois genes dominantes distintos, que agem independentemente e sem efeito aditivo, ou por um único gene dominante com modificadores. Entretanto, um período prolongado de incubação ou uma concentração muito alta de *P. capsici* poderia ocasionalmente “quebrar” a resistência e resultar em sintomas em plantas com essa característica.

Walker e Bosland (1999) verificaram que seriam necessários um gene dominante independente para resistência na raiz e outro, diferente, para resistência foliar. Concluíram ainda que, para que a resistência se manifeste simultaneamente na raiz e na folha, é

necessária a presença de pelo menos um alelo dominante de um outro gene diferente. Segundo Bartual et al. (1991) a manifestação desta característica seria uma combinação de resistência vertical e horizontal. Experimentos realizados por Barksdale e Papavizas (1983) demonstraram que a resistência em alguns genótipos é controlada por um gene dominante simples com modificadores.

A concentração de zoosporos e o genótipo influem no tempo de manifestação de sintomas. Ortega et al. (1984b) relata que concentrações de 2×10^3 zoosporos/mL matam um terço das plantas em 20 dias, enquanto que concentrações de 3 a 6×10^5 zoosporos/mL matam 100% das plantas no mesmo período. Em plantas com 60 dias de idade inoculadas com 3000 esporos/raiz os sintomas levam de 5 a 7 dias para aparecer (Lin e Zhang, 1994).

Recentemente tem-se sugerido que a resistência relacionada com a idade da planta pode ser efetiva na redução dos danos causados por essa doença (Hwang e Kim, 1995). Em estudos avançados também se sugere que a expressão da resistência relacionada com a idade da planta pode ser devida a mudanças metabólicas e nutricionais em hastes de pimentão durante o envelhecimento (Hwang et al., 1991; Jeun e Hwang, 1991).

A produção de capsidiol parece ter um papel importante no aumento da resistência de plantas de pimentão conforme elas vão envelhecendo. Egea et al. (1996) confirmaram o envolvimento do capsidiol (fitoalexina que se acumula na área necrosada pelo patógeno) na manifestação da resistência do pimentão a *P. capsici* e afirmam que o efeito fungistático ocorre quando a concentração de capsidiol na planta atinge 3,75mM, e, quando esta ultrapassa 5mM, o efeito é fungitóxico. Segundo Kim et al. (1989) o período de incubação de *P.*

capsici em plantas mais velhas é maior, e, com o aumento da idade, o nível de resistência cresce gradativamente.

4.5 Controle químico de *Phytophthora capsici*

O controle deste fitopatógeno depende principalmente da aplicação de fungicidas (Hwang e Kim, 1995). A eficácia da aplicação é muito influenciada pelo nível de resistência de genótipos de pimentão à murcha de *Phytophthora*. Existem evidências que o fungicida sistêmico metalaxil atua contra o patógeno por aumentar a capacidade de produção da fitoalexina capsidiol pela planta (Hwang e Sung, 1989). No entanto foram encontrados isolados resistentes a esse princípio ativo (Parra e Ristaino, 1998 e Ristaino e Jonhston, 1999).

No Brasil são recomendados os seguintes fungicidas: clorotalonil, mancozeb, oxicleto de cobre e suas misturas (Kimati et al., 1997). O oxicleto de cobre é um fungicida de contato, que age como desativador de enzimas, alterando o metabolismo e rompendo a integridade da membrana celular. O clorotalonil também é um fungicida de contato, porém seu modo de ação ainda não é completamente conhecido. Ele parece agir como inibidor de enzimas glicolíticas e respiratórias. O mancozeb é um fungicida de contato, agindo como inativador de enzimas (Gustafson, 2001 e Compêndio, 1999).

Entre os fungicidas recomendados o mancozeb tem sido relatado como um dos mais eficientes. Vários autores (Liang et al., 1992 e Tang et al, 1992) sugerem o uso de mancozeb para o controle de doenças causadas por *P. capsici*. Pereira et al. (1998) afirmam que este fungicida tem uma persistência maior no ambiente do que o oxicleto de cobre. Mesmo assim, tanto o mancozeb como o clorotalonil e o oxicleto de cobre não são capazes de inibir completamente o avanço da doença no campo (Sitaramaiah e Hanuma, 1997). O oxicleto de

cobre foi constatado como sendo o menos efetivo entre os recomendados, segundo experimentos realizados por Pereira et al. (1998) e Ali et al. (1996).

4.6 Aeração e produção de esporângios de *Phytophthora capsici*

O patógeno requer várias condições para produzir esporângios. Entre elas, o suprimento adequado de oxigênio parece ser fundamental (Mitchell e Kannwisher-Mitchell, 1992). Segundo Mitchell e Zentmyer (1971b) a formação de esporângios de *Phytophthora* spp geralmente requer uma boa aeração. Eles comprovaram que a maior produção de esporângios de *P. capsici* se deu em condições nas quais a atmosfera continha mais que 5% de O₂ e nada de CO₂. De acordo com os resultados, a presença de 5% ou mais de CO₂ reduziu drasticamente a produção de esporângios. Apesar disso, os poucos esporângios produzidos foram capazes de formar e liberar zoosporos.

O crescimento micelial não é afetado pela concentração de gases na atmosfera (Mitchell e Zentmyer, 1971a e Marque et al., 2000).

4.7 Caracterização molecular de *Phytophthora capsici*

Tradicionalmente, *P. capsici* tem sido detectado através de isolamento do patógeno a partir de tecido infectado e plaqueamento em meios semi-seletivos (Kannawischer e Mitchell, 1978; Massago et al., 1977). No entanto, a identificação precisa do patógeno requer observações da morfologia de esporangióforos, esporângios, liberação de zoosporos e oosporos (Stamps et al., 1990). Esse tipo de classificação, usando a taxonomia básica, demanda bastante tempo e requer experiência.

Métodos de caracterização molecular têm sido utilizados para identificar e avaliar a variação genética entre espécies do gênero *Phytophthora*.

Estudos realizados por Mchau e Coffey (1995) demonstram a existência de duas subpopulações distintas, CapA e CapB, dentro de *P. capsici*. Essa divisão foi feita através de marcadores isoenzimáticos e morfologia, sendo que existe uma evidência de que a distribuição de isolados do grupo CapB seja associada a climas tropicais. Segundo Lamour e Hausbeck (2001) isolados de *P. capsici* coletados da mesma região geográfica durante dois anos são discretamente agrupados quando caracterizados por marcadores AFLP.

O DNA ribossômico (rDNA) e as seqüências das regiões ITS têm sido usados para desenvolver ferramentas rápidas para identificação de espécies economicamente importantes do gênero *Phytophthora*. Um primer chamado PCAP foi desenvolvido baseado em dados publicados previamente de uma seqüência específica de DNA de *P. capsici* (Lee et al., 1993, Ristaino et al., 1998).

Ristaino e Johnston (1999) testaram o primer PCAP e verificaram que 92% das plantas infectadas com lesões visíveis que apresentaram resultados positivos em isolamentos em meio de cultura mostraram o mesmo comportamento em ensaios utilizando a técnica de PCR com os primers PCAP e ITS 1. Essa técnica também detectou a infecção em 32% das amostras nas quais o patógeno não foi detectado através de procedimentos tradicionais de isolamento.

Apesar dos resultados já promissores, são necessárias mais pesquisas para desenvolver métodos de PCR que possam ser utilizados em campo e que possam relacionar a quantidade de propágulos do patógeno com a quantidade de DNA recuperada do solo. Dessa

forma, a estratégia de controle pode ser definida com mais precisão, evitando gastos desnecessários e, muitas vezes, inúteis.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Estabelecimento da coleção de *Phytophthora capsici*

Os isolados foram coletados de diferentes regiões do estado de São Paulo, de plantas de pimentão que apresentavam sintomas de podridão do colo e murcha. As plantas foram retiradas do campo, embrulhadas em jornal e transportadas para o laboratório de Fitopatologia do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP de Botucatu. Outros isolados foram requisitados junto a instituições de pesquisa do mesmo estado. O patógeno foi cultivado em meio de cultura seletivo de “corn-meal-agar” (CMA+antibióticos) (Quadro 1) e conservado de duas formas: em tubos de cultura com BDA (batata-dextrose-agar) cobertos com óleo mineral esterilizado (Buell e Weston, 1947) e em frascos de penicilina com água esterilizada, fechados com tampa de borracha e lacrados com tampa metálica (Castellani, 1967). Os tubos e os frascos foram mantidos a temperatura ambiente, devidamente identificados. Antes de iniciar os experimentos todos os isolados foram inoculados em plantas de pimentão da cultivar Ikeda a fim de recuperar a patogenicidade dos

mesmo. A inoculação foi feita depositando-se um disco de micélio no colo de cada planta A identificação dos isolados bem como sua região de origem encontram-se no Quadro 2.

Quadro 1: Meio seletivo (CMA+antibióticos) para *Phytophthora capsici*

CMA	40 g
Água destilada	1000 mL
Autoclavar, resfriar a 45 oC e acrescentar:	
Pimaricina	5 µg/mL
Vancomicina	200 µg/mL
Penicilina	100 µg/mL
PCNB	10 µg/mL
Benomyl	2,5 µg/mL
Hymexazol	20 µg/mL
Ajustar o pH para 3,8 a 4,0	

Fonte: Papavizas et. al., 1981.

Quadro 2.: Relação de isolados de *Phytophthora capsici* mantidos na micoteca do Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Produção Vegetal - FCA – UNESP/Botucatu/SP.

Código original	Código	Origem	Local	Data*
PI-01	PI-01	Coleta em campo	Sorocaba	12/98
PI-02	PI-02	Coleta em campo	Botucatu	12/98
PI-03	PI-03	Coleta em campo	Avaré	06/99
PI-04	PI-04	Coleta em campo	Botucatu	06/99
PI-05	PI-05	Coleta em campo	Paulínia	06/99
PI-06	PI-06	Coleta em campo	Bernardino de Campos	09/99
PI-07	PI-07	Coleta em campo	Bernardino de Campos	09/99
PI-08	PI-08	Coleta em campo	Guareí	02/00
LRS 01/89	PI-09	Inst. Biológico – Sorocaba	Cotia	04/00
LRS 15/87	PI-10	Inst. Biológico – Sorocaba	Paranapanema	04/00
LRS 13/95	PI-11	Inst. Biológico – Sorocaba	Itapetininga	04/00
PI-231	PI-12	Sakata/Agroflora	Paulínia	12/98
PI-253	PI-13	Sakata/Agroflora	São Miguel Arcanjo	01/98
PI-297	PI-14	Sakata/Agroflora	Bragança Paulista	09/99
PI-299	PI-15	Sakata/Agroflora	Bragança Paulista	12/98
PI-333	PI-16	Sakata/Agroflora	Bragança Paulista	12/98
PI-353	PI-17	Sakata/Agroflora	Lins	04/98
PI-354	PI-18	Sakata/Agroflora	Bragança Paulista	09/99
PI-377	PI-19	Sakata/Agroflora	Bragança Paulista	04/98
PI-381	PI-20	Sakata/Agroflora	Bragança Paulista	09/99
PI-420	PI-21	Sakata/Agroflora	Mogi-Guaçu	10/98
PI-424	PI-22	Sakata/Agroflora	Ubatuba	12/98
PI-441	PI-23	Sakata/Agroflora	Jarinu	01/99
LRS 12/95	PI-24	Inst. Biológico – Sorocaba	Araçoiaba da Serra	04/00

* Data do primeiro isolamento

5.2 Determinação dos grupos de compatibilidade

Todos os isolados foram inicialmente cultivados em CMA+antibióticos.

Os isolados utilizados como padrão dos grupos A1 e A2 foram o PI-12 e PI-15, respectivamente (Marque et. al., 1999a).

Para os cruzamentos intraespecíficos foi utilizado o meio de suco de tomate temperado – ágar (100mL de suco de tomate, 1,5g de CaCO₃, 9g de ágar e 400mL de água destilada). Foram utilizadas 4 placas para cada cruzamento. Metade da placa foi ocupada

com dois discos de CMA+antibióticos contendo micélio do isolado a ser identificado e metade com discos dos isolados padrão (Figura 1). As placas foram mantidas a 27 °C por sete dias no escuro. Após esse período foram retirados discos de micélio das zonas de encontro das colônias e observados ao microscópio ótico, para a verificação da possível formação de oosporos. Os isolados foram considerados de grupos diferentes quando, após cruzamento, houve a formação de estruturas sexuais (oosporos). Quando os isolados cruzados não formaram oosporos foram considerados do mesmo grupo de compatibilidade.

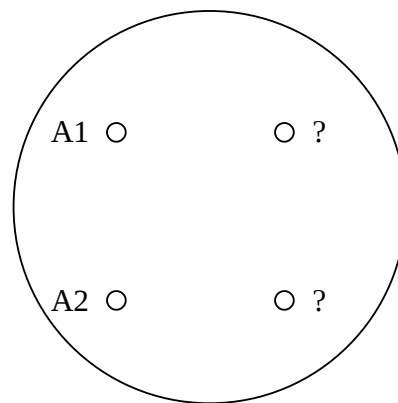


Figura 1: Diagrama de uma placa inoculada com discos dos isolados padrão A1 e A2 e com dois discos do mesmo isolado a ser identificado (?).

5.3 Teste de agressividade de isolados

Foi utilizada, para este teste, a cv. Ikeda que apresenta alta suscetibilidade à doença. As mudas foram obtidas a partir de semeadura em bandejas de isopor com 128 células contendo o substrato comercial Plantmax. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação a 23 °C $\pm$ 3 e irrigadas diariamente. O transplante foi feito 20 dias após a semeadura para vasos plásticos contendo substrato autoclavado e composto por uma parte de esterco, uma parte de areia e uma parte de terra, mantendo a mesma frequência de irrigação e a

mesma condição ambiente. A inoculação foi feita quando as mudas atingiram o estágio de quatro a cinco folhas verdadeiras, o que ocorreu, aproximadamente, 25 dias após o transplante.

O inóculo foi produzido em substrato orgânico. Para multiplicação foram retirados fragmentos de micélio do patógeno de tubos contendo BDA que foram transferidos para placas com CMA+antibióticos. A incubação se deu no escuro, em câmara de crescimento a 26 °C, por sete dias. Após esse período foram retirados discos do meio contendo micélio das bordas das colônias e transferidos para frascos com sementes de trigo da cultivar IAC24, sem tratamento químico. Foram utilizados frascos Schott Reagent de 250 mL contendo 50 g de sementes e 40 mL de água destilada, esterilizadas através de duas autoclavagens a 120 °C por 30 minutos com um intervalo de três dias. Para cada frasco foram transferidos três discos de CMA+antibióticos de 5,0 mm de diâmetro com crescimento ativo de *P. capsici*. Os frascos foram mantidos a 24 °C no escuro, sendo periodicamente agitados para homogeneizar a infestação, que ocorreu em todas as sementes após 15 dias aproximadamente.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, com quatro repetições, sendo cada uma representada por um vaso com uma planta. As plantas foram inoculadas depositando-se duas sementes infestadas no colo de cada uma. A avaliação foi feita diariamente a partir do quarto dia após a inoculação, medindo-se o tamanho da lesão no colo de cada planta, até a morte da mesma. As medidas obtidas foram transformadas em proporção e foi calculada, então, a área sob a curva de progresso da doença (ASCPD) para cada isolado, determinando-se, assim, a agressividade de cada um. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de agrupamento de Scott-knott. Este teste separa as médias em grupos distintos, sem intermediários; o que reflete melhor as diferenças entre os tratamentos (Scott e Knott, 1974).

5.4 Influência do genótipo e da idade das plantas na manifestação da resistência de pimentão a *Phytophthora capsici*

O objetivo deste experimento foi determinar o nível de resistência dos cinco genótipos de pimentão cultivados no estado de São Paulo (Quadro 3). Este levantamento foi feito junto às cooperativas dos pólos de produção desta hortaliça no estado.

Quadro 3: Genótipos utilizados no experimento de resistência

Genótipo	Empresa
Melody (Híbrido)	Asgrow
Elisa (Híbrido)	Rogers
Magali – R (Híbrido)	Sakata/Agroflora
Nathalie (Híbrido)	Rogers
Magda (Cultivar)	Sakata/Agroflora
Ikeda (Testemunha suscetível)	Sakata/Agroflora
Criollo (Testemunha resistente)	---

As mudas e o inóculo foram obtidos como descrito no item 5.3. As sementes dos genótipos listados no Quadro 3 foram semeadas de tal forma que, no momento da inoculação, houvesse plantas com 40, 60 e 90 dias, o que permitiu a avaliação do efeito da idade na manifestação da resistência. O isolado utilizado foi o PI-18, que apresentou maior agressividade. A inoculação foi feita depositando-se duas sementes infestadas próximas ao colo de cada planta. Os tratamentos foram compostos pela combinação dos genótipos do Quadro 3 com as idades propostas para avaliação. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, com 10 repetições. As parcelas foram constituídas por um vaso com uma planta. As avaliações foram feitas diariamente a partir do quarto dia após a inoculação contando-se o número de plantas mortas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de sobrevivência, que é o conjunto de técnicas e modelos estatísticos para análise de dados cuja resposta é o tempo até a ocorrência do evento (no caso, a morte de um indivíduo). Estes dados são freqüentemente censurados, isto é, são observações incompletas, em que, por algum motivo, não foi possível observar a causa do evento.

Em análise de sobrevivência tem-se interesse em estimar a probabilidade de um indivíduo sobreviver até o tempo t , a qual é chamada função de sobrevivência. Uma das técnicas utilizadas na estimação da função de sobrevivência é o estimador de Kaplan-Meier (1958), utilizado quando o tempo exato de falha é conhecido (Chalita, 1998).

5.5 Teste de fungicidas “in vitro”

O objetivo deste ensaio foi determinar a possível diferença de sensibilidade dos grupos de compatibilidade A1 e A2 aos fungicidas recomendados para o controle de *P. capsici*. Os testes foram feitos em placas de petri contendo meio seletivo (Papavizas et al., 1981) e o fungicida a ser estudado. A partir de uma placa contendo cultura pura do patógeno em meio CMA+antibióticos foram retirados discos das bordas da colônia e transferidos para o centro das placas com fungicida. Para os testes foram utilizados dois isolados de cada grupo de compatibilidade, sendo PI-12 e PI-22 do grupo A1 e PI-08 e PI-20 do grupo A2.

Foram inicialmente preparadas soluções estoque dos fungicidas que foram adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem, na temperatura de aproximadamente 45 °C.

Para que as diferenças fossem detectadas com mais facilidade utilizaram-se subdoses dos produtos. As quantidades dos fungicidas adicionados ao meio tiveram concentrações finais de 1, 10, 50 e 100 mg/l do produto comercial, obtidas por diluição em série. Placas sem fungicidas se constituíram nas testemunhas.

Os princípios ativos testados foram: clorotalonil + oxicleto de cobre; clorotalonil; mancozeb; mancozeb + oxicleto de cobre e oxicleto de cobre.

Após a repicagem, as placas, num total de cinco repetições por tratamento, foram mantidas no escuro, a 25 °C. A avaliação foi feita no quinto, sexto e sétimo dia após o plaqueamento, medindo-se o crescimento radial das colônias. Os dados foram submetidos à análise de regressão para cálculo da taxa de crescimento e os resultados foram avaliados em software estatístico SANEST.

5.6 Influência da aeração na produção de esporângios

Este ensaio foi realizado em frascos de Duram de 100mL com o objetivo de quantificar a produção de esporângios de *P. capsici* sob diferentes concentrações de O₂ e CO₂ presentes no meio. Foram utilizados dois isolados do grupo A1 (PI-12 e PI-22) e dois do grupo A2 (PI-08 e PI-20), para determinar se existe diferença de comportamento para esse fator. Para cada isolado foram utilizados 40 frascos com 20mL de meio de suco de tomate, sendo que metade dos frascos foi fechada com algodão (testemunha) e a outra metade foi vedada com rolha de borracha número 10 (Figura 2). A partir do terceiro dia foram avaliados quatro frascos por dia por tratamento até o sétimo dia, período necessário para que o patógeno se reproduza. A avaliação se baseou na medida porcentagem de O₂ e CO₂ dentro do frasco e na

quantidade de esporângios formados. A incubação se deu em BOD a 25 °C, com 24 horas de luz para estimular a formação de esporângios.



Figura 2: Frascos utilizados para as medidas de O₂ e CO₂

Foi utilizado, para medição das quantidades de O₂ e CO₂, o aparelho Testo, modelo 325-1 (Figura 3). O sensor foi colocado através da vedação e o aparelho funcionou por um minuto em cada amostra. Os esporângios foram quantificados em câmara de Neubauer, após raspagem da superfície do meio com, aproximadamente, 20 mL de água destilada..

O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada um dos tratamentos, já caracterizados anteriormente. Para avaliar a influência das concentrações de O₂ e CO₂ na esporulação foram utilizadas técnicas de estatística descritiva, resultando na construção de gráficos que relacionam a quantidade de esporângios/mL e concentrações de O₂ e CO₂. Para a variável esporângios por mililitro foi realizada a análise de

variância não paramétrica, utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com o objetivo de detectar possíveis diferenças entre tratamentos. Nos casos em que existiram diferenças significativas entre isolados, foi aplicado o teste de Student-Newman-Keuls ao nível de 5% de probabilidade. Já nos casos em que existiram diferenças significativas entre os tipos de vedação, foi aplicado o teste de Mann-Whitney, ao nível de 5% de probabilidade.



Figura 3: Aparelho medidor de gases

5.7 Caracterização molecular

5.7.1 Extração de DNA total

Os isolados foram cultivados em meio líquido de suco de tomate por sete dias no escuro a 26°C, e o DNA genômico dos mesmos foi extraído segundo protocolo desenvolvido por Kuramae-Izioka (1997).

Os micélios dos isolados foram lavados três vezes com água destilada esterilizada e secos em SpeedVac.

Para a extração do DNA total, os micélios foram triturados com auxílio de pistilo e almofariz em nitrogênio líquido e ressuspensos em 700µl de tampão de extração (100mM Tris, pH 8,0; 50mM EDTA, pH 8,0; 500mM NaCl, 20% sodium dodecyl sulfate). O homogeneizado foi incubado por 30 minutos a 65°C em banho Maria, sob agitação. Adicionou-se 500µl de acetato de potássio 5M às amostras, que foram submetidas a banho de gelo por 30 minutos, invertendo-se a cada cinco minutos. As amostras foram então centrifugadas a 12000rcf. O sobrenadante foi extraído com clorofórmio:álcool isoamílico (25:1). Foi adicionado um volume de isopropanol para precipitar o DNA de cada amostra centrifugando-se novamente por 10 minutos a 12000rcf. O 'pellet' foi lavado com 700µl de etanol 70%, centrifugado por cinco minutos e seco em SpeedVac por 10 minutos. O DNA foi dissolvido em 1/10 TE (10mM Tris, pH 8,0; 1mM EDTA) e tratado com 40µg/mL de Rnase Dnase-free a 37°C, durante três horas. A quantificação do DNA foi feita em GeneQuant (Pharmacia). Foi lida a razão A_{260nm}/A_{280nm} de todas as amostras de DNA para determinar sua qualidade, a qual estava entre 1,6 e 1,8. Todas as amostras foram mantidas a -20°C até o momento das reações de RAPD (polimorfismo de DNA amplificados ao acaso).

5.7.2 Reações de RAPD

Os procedimentos para as reações de RAPD foram os descritos por Williams et al. (1990). A reação de RAPD foi realizada em volume de 20µL, em placas de ELISA com 96 células. Cada reação continha 10X tampão PCR, 1,5mM de MgCl₂, 2,5mM de cada um dos quatro dNTPs, 5ng “primer”, 5ng de DNA genômico e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase. Cada reação foi coberta com 30µL de óleo mineral. Os “primers” escolhidos para as reações de RAPD foram G-4, G-5, G-16, G-17, G-18 e OPP-6 (Quadro 4). Estes “primers” foram os que apresentaram mais polimorfismo, o que permitiu uma avaliação mais precisa da variabilidade.

Quadro 4: Sequência dos “primers” usados em reações de RAPD para determinar similaridade genética entre isolados de *Phytophthora capsici*.

Código	Sequência (5' para 3')
G 04	AGCGTGTCTG
G 05	CTGAGAGCGA
G 16	AGCGTCCTCC
G 17	ACGACCGACA
G 18	GGCTCATGTG
OPP 06	GTGGGCTGAC

A amplificação foi realizada em termocicladores MJ Research thermocycler programados para uma desnaturação inicial de dois minutos a 96°C, 35 ciclos de um minuto a 96°C, um minuto a 35°C e um minuto e 30 segundos a 72°C e, mais uma extensão final de 72°C por cinco minutos.

Em cada célula da placa contendo 20µl de reação e em 200ng do marcador molecular Ladder 1kb foram adicionados 4µl de tampão de carregamento (40% de sacarose e 0,25% bromofenol azul) (Sambrook et al., 1989). Os produtos do RAPD e o marcador molecular foram visualizados em gel de agarose 1,5% em TBE (0,1M de Tris HCl; 0,1M de ácido bórico; 0,02mM de EDTA pH 8,3) corados com 10mg/mL de brometo de etídio (Sambrook et al., 1989), numa voltagem aproximada de 5V/cm de gel. Os géis foram fotografados e impressos em aparelho 'Eagle eye', em preto e branco, para análise. Para leitura foram consideradas as bandas mais nítidas.

As análises dos dados do polimorfismo de DNA amplificados ao acaso (RAPD) foram realizadas no programa computacional NTSYS – pc1.8, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Rohlf, 1992).

Os dados foram registrados na forma de ausência/presença de bandas de gel. Bandas de mesmo comprimento foram consideradas idênticas. Estes dados foram codificados na forma binária (1 para presença e 0 para ausência).

A distância genética entre os isolados de *P. capsici* foi determinada pelo coeficiente Sample Matching.

A matriz das distâncias foi em seguida transformada num dendrograma utilizando-se o método SAHN Clustering (Sequential Agglomerative, Hierarchical and nested) sob procedimento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averaging).

5.7.3 Seqüenciamento das regiões ITS

Para amplificar o espaço interno transcrito (ITS) do gene do ribossomo 5.8S nuclear (White et. al., 1990) foi utilizada a técnica de PCR (reação da polimerase em cadeia). A reação foi realizada em tubos Eppendorf de 200 µL contendo 1X de tampão *Taq* polimerase, 10 mM da mistura dos quatro nucleotídeos, 50 mM MgCl₂, 10 µM de cada par de “primer” (ITS1 e ITS2), 100 ng de DNA e 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase. No controle o DNA foi substituído pelo mesmo volume de água ultrapura estéril.

A programação do termociclador foi uma denaturação inicial de 95 °C por dois minutos, 35 ciclos de 95 °C por um minuto, 55 °C por um minuto e 72 °C por um minuto e trinta segundos e mais uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. Após confirmação da amplificação do fragmento desejado, através de eletroforese em gel de agarose 1%, os produtos de PCR foram purificados em coluna MicroSpin S-400 HR conforme instruções do fabricante (Amersham Pharmacia). As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando-se 75 ng do produto de PCR purificado e 1 µM de cada um dos primers ITS 1 e ITS2, de acordo com o protocolo para Amersham Premix Terminator (Amersham Pharmacia). O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador (PE Applied Biosystems Model 377 DNA Sequencer) de acordo com instruções do fabricante. As quatro seqüências obtidas pelos quatro primers, para cada isolado, foram analisadas utilizando-se ‘phred/phrap/consed’ (Gordon et al., 1998). As seqüências das regiões ITS-5.8s rDNA de todos os isolados foram alinhadas utilizando-se o programa ClustalX (Thompson et al., 1997). Utilizando-se o software ClustalX foi gerada uma árvore filogenética entre os isolados através do método ‘Neighbor-joining’ com valores de 1000 ‘bootstrap’.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Determinação dos grupos de compatibilidade

Foram coletados 24 isolados de *Phytophthora capsici* de plantas de pimentão, que estão sendo mantidos na micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP/Botucatu. O Quadro 5 mostra a determinação dos grupos de compatibilidade.

A Figura 4 mostra a distribuição desses isolados no estado de São Paulo, bem como os pólos de produção de pimentão do estado (Trani et al., 1997).

De 24 isolados, 10 pertencem ao grupo A1 e 14 ao grupo A2. Os resultados foram semelhantes aos obtidos por Kim et al. (1988), mostrando uma frequência próxima de 1:1 (Brasier, 1992). Essa frequência dos grupos de compatibilidade indica que o oosporo é um meio de presença contínua do inóculo no solo.

Trabalhos realizados por Rêgo e Reifschneider (1982) mostram que os grupos de compatibilidade estão relacionados com a região geográfica de origem. Os autores sugerem que isolados provenientes da mesma região deveriam ser do mesmo grupo. No entanto,

o presente estudo mostrou que os grupos A1 e A2 ocorrem simultaneamente na mesma região, concordando com a caracterização feita por Mchau e Coffey (1995). Essa ocorrência simultânea seria mais vantajosa para o patógeno, pois permite a recombinação genética, mantendo a variabilidade.

Quadro 5: Grupos de compatibilidade de isolados de *P. capsici* obtidos de pimentão

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
2		-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
3			-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
4				-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
5					-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
6						-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
7							-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
8								-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
9									-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
10										-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
11											-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
12*												-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
13													-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
14														-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
15 [#]															-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
16																-	-	-	-	-	-	+	-	+
17																	-	-	-	-	-	+	-	+
18																		-	-	-	-	+	-	+
19																			-	-	-	+	-	+
20																				-	-	+	-	+
21																					-	+	-	+
22																						-	+	-
23																							-	+
24																								-

*Padrão do grupo A1

[#]Padrão do grupo A2

- Ausência de oosporos

+ Presença de oosporos

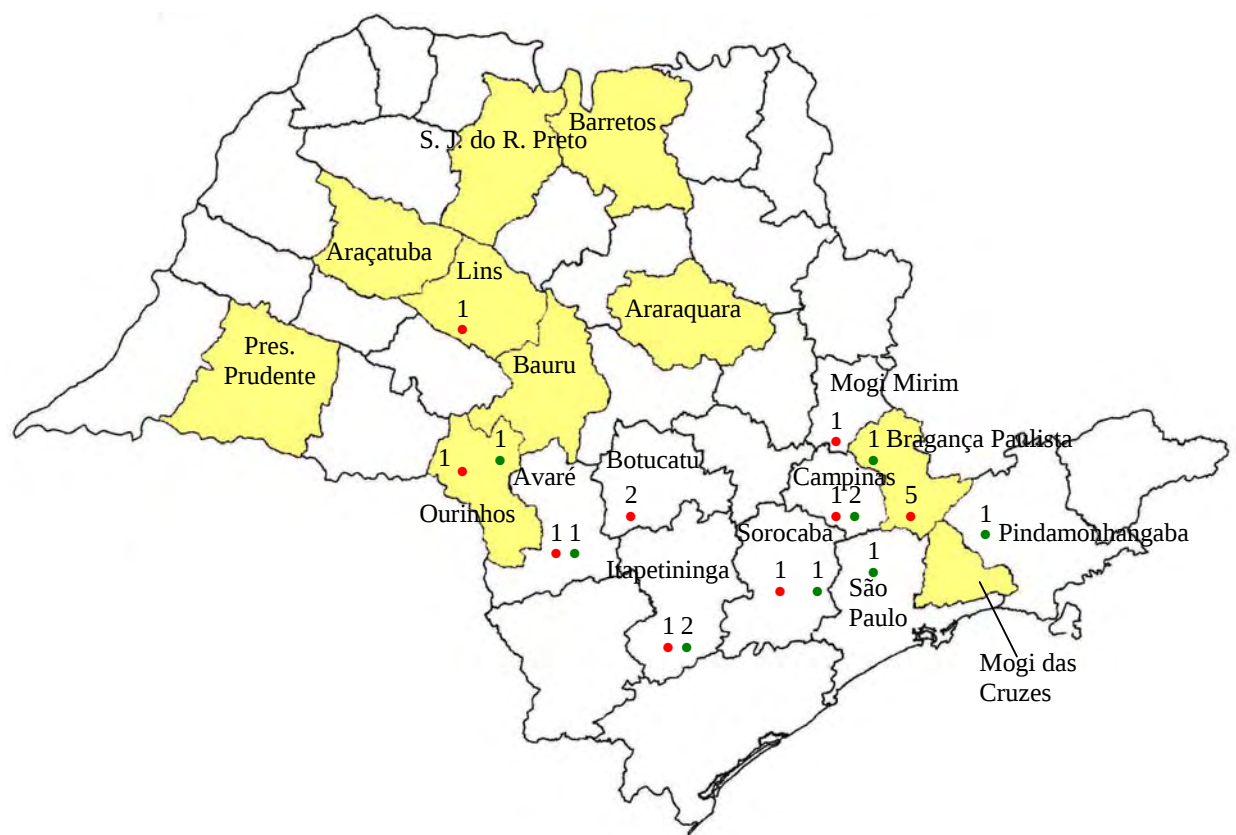


Figura 4: Pólos de produção de pimentão no estado de São Paulo ⁽¹⁾ (■) e número de isolados dos grupos de compatibilidade A1 (●) e A2 (●).

⁽¹⁾ Escritórios de desenvolvimento rural (Fonte: Francisco et al., 1997).

6.2 Teste de agressividade de isolados

Os resultados do teste de agrupamento de Scott-knott são apresentados no Quadro 6.

Quadro 6: Teste de agrupamento Scott-knott para as médias de área sob a curva de progresso da doença de isolados de *Phytophthora capsici*.

Isolado	ASCPD	Grupos de compatibilidade
PI-18	1,2410 A	A2
PI-13	1,2382 A	A1
PI-19	1,2093 A	A2
PI-03	1,2065 A	A2
PI-15	1,2006 A	A2
PI-17	1,1650 A	A2
PI-06	1,1360 A	A1
PI-12	1,1356 A	A1
PI-07	1,1332 A	A2
PI-04	1,1240 A	A2
PI-02	1,1089 A	A2
PI-21	1,0828 A	A2
PI-08	1,0774 A	A2
PI-05	1,0709 A	A1
PI-23	1,0656 A	A2
PI-10	1,0602 A	A1
PI-22	1,0586 A	A1
PI-09	1,0523 A	A1
PI-01	1,0360 A	A2
PI-24	1,0012 B	A1
PI-11	0,9348 B	A1
PI-20	0,9184 B	A2
PI-14	0,8569 B	A1
PI-16	0,8177 B	A2

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si no nível de 5% de significância CV = 11,207%

O agrupamento Scott-knott refletiu o comportamento dos isolados verificado visualmente no experimento em casa de vegetação. Estes resultados corroboram os testes preliminares de agressividade, confirmando que alguns isolados são, de fato, menos agressivos.

Como constatado em trabalhos feitos por Yang et al. (1989) e Kim e Hwang (1992) a diferença de agressividade existe, porém, não há relação com a região de origem e o grupo de compatibilidade. Não existem estudos que expliquem as diferenças encontradas no experimento. Possivelmente, a capacidade do patógeno em causar a doença esteja relacionada com seu arsenal enzimático, porém, mais pesquisas são necessárias para precisar qual é o mecanismo de infecção e o que determina a agressividade dos isolados.

A temperatura na casa de vegetação estava propícia para a manifestação da agressividade dos isolados, de acordo com Ortega et al. (1984b).

O cálculo da ASCPD foi eficiente para detectar as diferenças entre os isolados mesmo antes das análises. Apesar de ser uma técnica mais trabalhosa, que exige avaliações constantes, os resultados são mais consistentes e as diferenças mais nítidas (Kim e Hwang, 1992, Miller et al., 1998, Polach e Webster, 1972 e Lee et al., 2001).

O Quadro 7 confirma que não existe diferença de agressividade entre os grupos, ou seja, esta característica é inerente ao isolado.

Quadro 7: Teste de agrupamento Scott-knott para as médias de área sob a curva de progresso da doença de grupos de compatibilidade de *Phytophthora capsici*.

Grupo	ASCPD
A1*	1,0545 A
A2#	1,0990 A

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si no nível de 5% de significância
CV = 14,100%

*Média de 10 isolados

#Média de 14 isolados

6.3 Influência do genótipo e da idade das plantas na manifestação da resistência de pimentão a *Phytophthora capsici*

Os resultados da análise de sobrevivência são mostrados nas Figuras 5 e 6. Os gráficos mostram a probabilidade de sobrevivência dos diferentes genótipos, bem como das idades. As curvas foram construídas com base no número de indivíduos mortos no período de avaliação e o tempo, em dias, até a morte.

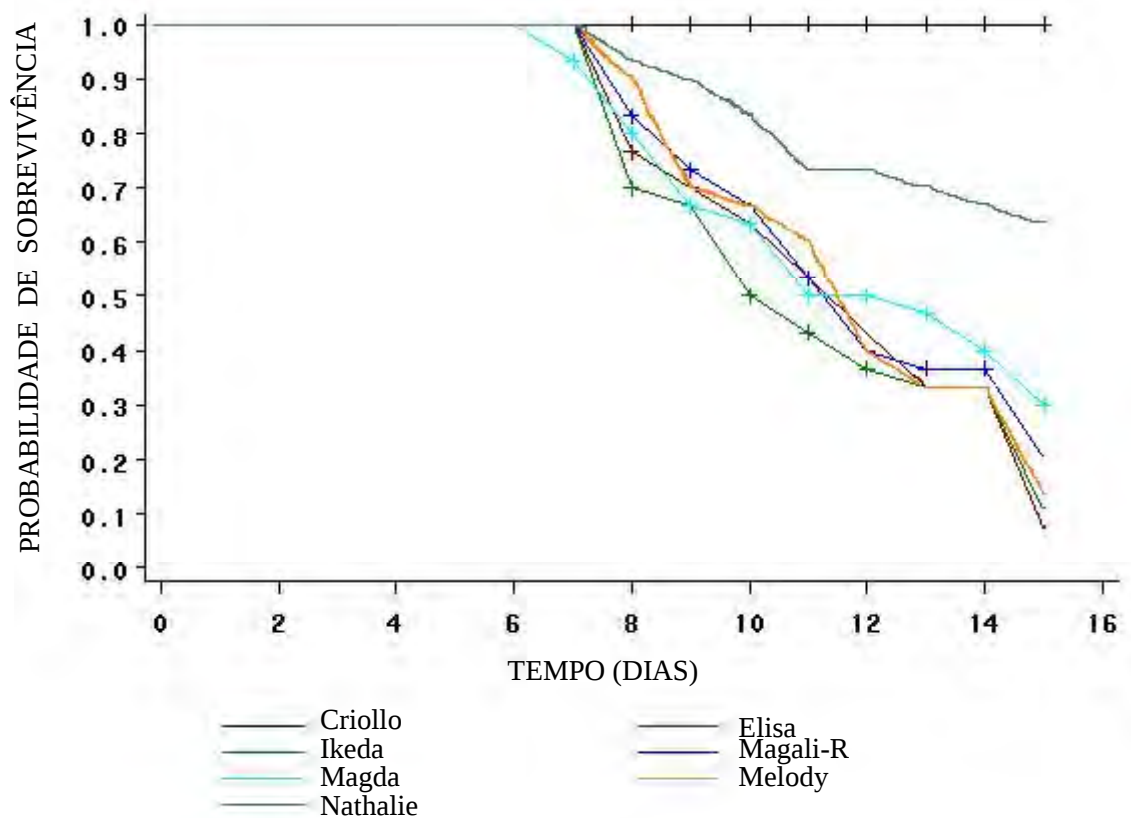


Figura 5: Curvas de sobrevivência (Kaplan-Meier, 1958) de genótipos de pimentão inoculados com *P. capsici* e teste log-rank ($\chi^2 = 93,78$ e $p < 0,0001$).

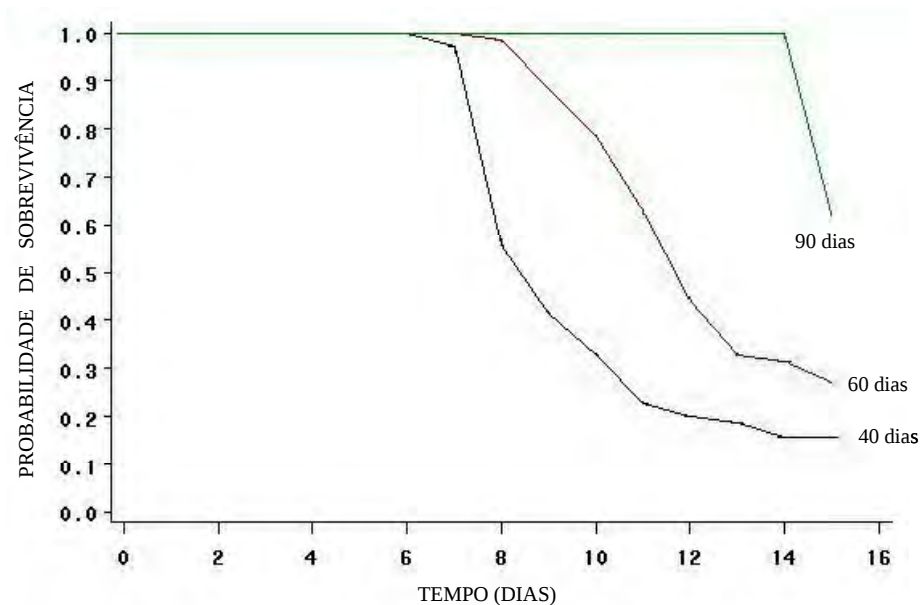


Figura 6: Curvas de sobrevivência (Kaplan-Meier, 1958) de plantas de pimentão com diferentes idades (40, 60 e 90 dias após a semeadura) inoculadas com *P. capsici* e teste log-rank ($\chi^2 = 64,84$ e $p < 0,0001$).

Segundo a Figura 5 os genótipos de pimentão estudados neste trabalho são altamente suscetíveis a *P. capsici*, com exceção do híbrido Nathalie, que apresentou um bom nível de resistência. A testemunha resistente Criollo confirmou a sua característica, tendo sobrevivência de 100% no fim do experimento.

De acordo com a Figura 6 pode-se comprovar que a idade é importante na manifestação da resistência. Os resultados vão ao encontro dos obtidos por Ortega et al. (1984a), confirmando que plantas de 60 dias levam aproximadamente sete dias para manifestar

os sintomas. Dessa forma, fica evidente que o aparecimento de sintomas é mais rápido em plantas mais novas e vai aumentando conforme as plantas vão envelhecendo. Este fato pode ser confirmado observando-se que o tempo para que os sintomas apareçam em plantas de 40, 60 e 90 dias é de seis, sete e 14 dias respectivamente.

O teste de log-rank mostra valores que indicam que as diferenças são significativas, tanto para os genótipos quanto para as idades. Os resultados obtidos com a análise de sobrevivência foram semelhantes àqueles obtidos com o cálculo da taxa de morte/dia (Kobori et al., 2000), comparadas pelo teste de Tukey a 5% (Quadro 16 do apêndice).

De acordo com a Figura 6 foi possível comprovar o efeito da idade da planta. As plantas de 90 dias apresentaram maior nível de resistência do que as plantas de 40 e 60 dias. Estes resultados foram semelhantes aos de Hwang e Kim (1995), que reportaram a importância da idade da planta na redução dos danos causados por *P. capsici*, confirmando, também, que o período de incubação e manifestação de sintomas é maior em plantas mais velhas (Kim et al., 1989).

Provavelmente a expressão de níveis maiores de resistência está relacionada, segundo Hwang et al. (1991) e Jeun e Hwang (1991), com alterações no metabolismo e na condição nutricional da planta. Além disso, a produção de capsidiol também aumenta conforme as plantas vão envelhecendo (Egea et al., 1996).

6.4 Teste de fungicidas “in vitro”

Os resultados da avaliação do efeito de fungicidas em grupos de compatibilidade de *P. capsici* encontram-se nos Quadros 8, 9, 10, 11 e 12.

Quadro 8: Taxas de crescimento micelial (cm/dia) de *Phytophthora capsici* em meios de cultura contendo diferentes doses de clorotalonil.

Grupos de compatibilidade ^(*)	Doses ^(**) (mg/l)				
	0	1	10	50	100
A1 (PI-12 e PI-22)	0,896Aa	1,056Aa	0,796Ab	0,462Ac	0,309Ac
A2 (PI-08 e PI-20)	0,833Aa	1,000Aa	0,651Ab	0,163Bc	0,177Bc

CV (%) = 7,817

(*) Média de dois isolados por grupo de compatibilidade

(**) Doses do produto comercial

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

Quadro 9: Taxas de crescimento micelial (cm/dia) de *Phytophthora capsici* em meios de cultura contendo diferentes doses de mancozeb.

Grupos de compatibilidade ^(*)	Doses ^(**) (mg/l)				
	0	1	10	50	100
A1 (PI-12 e PI-22)	0,896Aa	0,917Aa	0,938Aa	0,000Ab	0,000Ab
A2 (PI-08 e PI-20)	0,833Aa	0,585Bb	0,632Bb	0,000Ac	0,000Ac

CV (%) = 7,223

(*) Média de dois isolados por grupo de compatibilidade

(**) Doses do produto comercial

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

Quadro 10: Taxas de crescimento micelial (cm/dia) de *Phytophthora capsici* em meios de cultura contendo diferentes doses de oxicleto de cobre.

Grupos de compatibilidade ^(*)	Doses ^(**) (mg/l)				
	0	1	10	50	100
A1 (PI-12 e PI-22)	0,896Aa	0,628Ba	0,627Ba	0,667Aa	0,144Ab
A2 (PI-08 e PI-20)	0,833Aa	0,880Aa	0,854Aa	0,154Bb	0,000Bb

CV (%) = 9,522

(*) Média de dois isolados por grupo de compatibilidade

(**) Doses do produto comercial

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

Quadro 11: Taxas de crescimento micelial (cm/dia) de *Phytophthora capsici* em meios de cultura contendo diferentes doses de oxicleto de cobre + mancozeb.

Grupos de compatibilidade ^(*)	Doses ^(**) (mg/l)				
	0	1	10	50	100
A1 (PI-12 e PI-22)	0,896Aa	0,938Aa	0,888Aa	0,419Ab	0,000Ac
A2 (PI-08 e PI-20)	0,833Aa	0,833Aa	0,816Aa	0,253Ab	0,000Ac

CV (%) = 9,607

(*) Média de dois isolados por grupo de compatibilidade

(**) Doses do produto comercial

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

Quadro 12: Taxas de crescimento micelial (cm/dia) de *Phytophthora capsici* em meios de cultura contendo diferentes doses de oxicleto de cobre + clorotalonil.

Grupos de compatibilidade ^(*)	Doses ^(**) (mg/l)				
	0	1	10	50	100
A1 (PI-12 e PI-22)	0,896Aa	1,139Aa	1,108Aa	0,238Ab	0,000Ac
A2 (PI-08 e PI-20)	0,833Aa	0,809Ba	0,880Ba	0,000Bb	0,000Ab

CV (%) = 7,181

(*) Média de dois isolados por grupo de compatibilidade

(**) Doses do produto comercial

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

Pelos resultados verifica-se que todos os fungicidas afetaram a taxa de crescimento micelial do patógeno. A eficiência variou de acordo com o princípio ativo e com as doses. Pode-se observar no Quadro 13 que o fungicida mancozeb foi o mais eficiente na redução do crescimento micelial “in vitro”, o que reflete sua eficiência no campo (Pereira et al., 1998; Liang et al., 1992 e Tang et al., 1992). Mesmo assim, o mancozeb não inibe completamente o crescimento do micélio nas doses menores. Sitaramaiah e Hanuman (1997) relataram que este fungicida não inibiu completamente o avanço de lesões da murcha de *Piper betle*, causadas por *P. capsici*.

O uso de subdoses permitiu detectar diferenças no comportamento dos grupos de compatibilidade em relação aos fungicidas estudados “in vitro”.

De forma geral, o grupo A2 de compatibilidade sofreu maior inibição de crescimento do que o grupo A1, principalmente nas doses de 1, 10 e 50mg/l. Porém, quando submetidos às doses de 1 e 10mg/l de oxicleto de cobre (Quadro 10) este comportamento se inverte. Esta inversão é devida, provavelmente, ao modo de ação do princípio ativo.

Quadro 13: Taxas de crescimento micelial (cm/dia) de *Phytophthora capsici* em meios de cultura contendo diferentes doses de fungicidas.

Fungicidas	Doses (mg/l) ^(*)				
	0	1	10	50	100
Clorotalonil	0,864Aa ^(**)	1,028Aa	0,722Bb	0,304Ac	0,241Ac
Mancozeb	0,864Aa	0,746Ca	0,781Ba	0,000Bb	0,000Bb
Oxicleto de cobre	0,864Aa	0,750BCa	0,738Ba	0,392Ab	0,069Bc
Oxicleto de cobre + mancozeb	0,864Aa	0,875ABCa	0,852ABa	0,334Ab	0,000Bc
Oxicleto de cobre + clorotalonil	0,864Aa	0,940ABCa	0,992Aa	0,113Ab	0,000Bb

CV (%) = 9,864

^(*) Doses do produto comercial

^(**) Média de quatro isolados sendo dois do grupo A1 (PI-12 e PI-22) e dois do grupo A2 (PI-08 e PI-20).

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

Não existem trabalhos que expliquem o comportamento diferenciado de grupos de compatibilidade com relação a fungicidas tanto em laboratório como em campo. No entanto, este resultado não pode ser levado para o campo, onde as doses utilizadas são muito maiores que as testadas no experimento (Compêndio, 1999). Em alguns fungicidas (Quadros 9, 11 e 12) houve inibição total do crescimento em doses maiores, não sendo possível diferenciar

um grupo do outro. Portanto, para fins de manejo em campo, pode-se considerar que não existe diferença na sensibilidade dos grupos de compatibilidade A1 e A2 a fungicidas.

6.5 Influência da aeração na produção de esporângios

O tipo de vedação influenciou significativamente nas concentrações de O₂ e CO₂ no interior dos frascos de cultura (Quadro 17), apresentando resultados evidentes na produção de esporângios por *P. capsici*. A vedação com algodão (testemunha) permitiu a troca de gases e forneceu o balanço adequado de O₂/CO₂ para que a esporulação ocorresse normalmente. Já nos frascos vedados com rolha a baixa concentração de O₂ ou a alta concentração de CO₂ presente no seu interior não permitiu a produção de esporângios.

Quadro 14. Produção de esporângios/mL pelo teste de Student - Newman-Keuls (SNK) e Mann-Whitney, segundo tipo de vedação.

Tipos de Vedação	Isolados			
	PI-08 (grupo A2)	PI-12 (grupo A1)	PI-20 (grupo A2)	PI-22 (grupo A1)
Algodão (testemunha)	2,00Aa ^(*)	6,25Aa	0,93Ba	4,50Aa
Rolha	0,00Ab	0,00Ab	0,00Ab	0,00Ab

^(*)Letras maiúsculas (linhas): para cada tipo de vedação, isolados representados pela mediana, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de SNK. Letras minúsculas (coluna): para cada isolado, Tipos de vedação representados pela mediana, seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Mann-Whitney.

A esporulação variou de acordo com o isolado e não com o grupo de compatibilidade (Quadro 14). O efeito das concentrações de O₂ e CO₂ na esporulação foi

comprovado. De acordo com a Figura 7 verificou-se que quanto maior a concentração de CO₂ menor é a esporulação, e que os isolados necessitam de O₂ para produzir esporângios.

O comportamento de todos os isolados com relação à concentração de O₂ e CO₂ foi também verificado em experimentos realizados por Mitchell e Zentmyer (1971a,b) e Marque et al. (2000). Estes autores comprovaram que, com baixas concentrações de O₂ e altas concentrações de CO₂, *P. capsici* produz poucos ou nenhum esporângio.

O balanço O₂/CO₂ influenciou diretamente na esporulação de *P. capsici*. É provável que os gases tenham importância vital em algum passo do metabolismo que envolve a produção desta estrutura. Além disso não foi possível precisar qual é o gás que impede a esporulação. O mais provável é que a interação entre os dois, ou seja, o balanço, determine a produção ou não de estruturas assexuais de reprodução. De acordo com os dados do Quadro 17 (Apêndice) os isolados que produziram alguns esporângios no tratamento com rolha desencadearam o processo quando o balanço O₂/CO₂ variou de 10,5/1 a 2,8/1. Entretanto esse comportamento aconteceu em isolados de grupos diferentes de compatibilidade (PI-12/A1 e PI-20/A2), confirmando que a produção de esporângios em condições adversas de aeração depende das características do isolado. Como não existem informações sobre esse processo, existe a necessidade de pesquisas mais profundas na fisiologia da reprodução assexual de *P. capsici*.

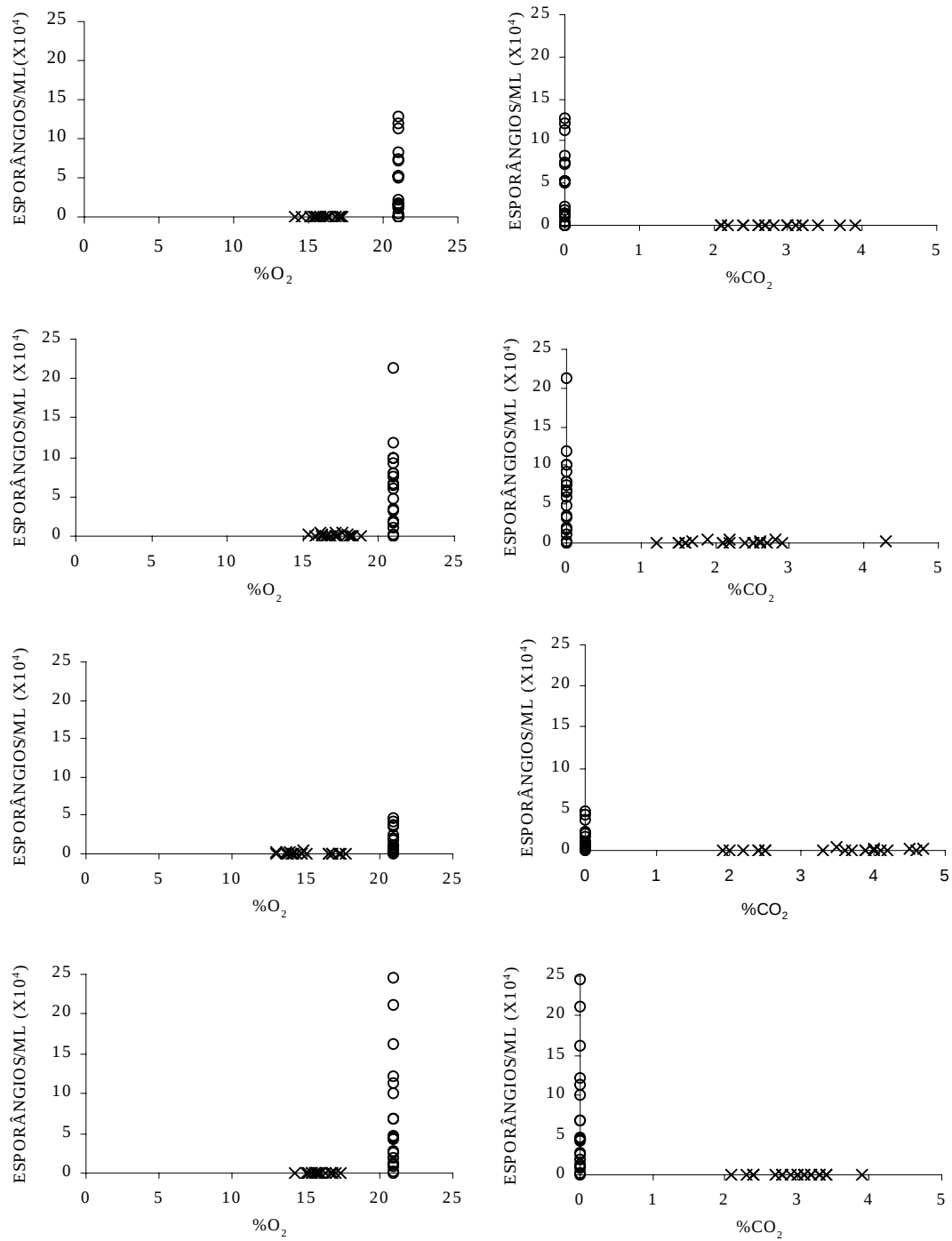


Figura 7: Quantidade de esporângios dos isolados PI-08/A2 (I), PI-12/A1 (II), PI-20/A2 (III) e PI-22/A1 (IV) nas parcelas testemunha (●) (20 frascos) e vedadas com rolha (×) (20 frascos), de acordo com as concentrações de O_2 (A) e CO_2 (B).

Estes resultados são de extrema importância na otimização da produção de inóculo. O fato de se conhecer detalhadamente a fisiologia do patógeno a ser trabalhado evita perda de tempo e trabalho. Portanto, o mesmo estudo deve ser feito para outros fungos e pseudofungos, a fim de padronizar os protocolos de obtenção do inóculo e produzir quantidades suficientes de esporos para inoculação.

6.6 Caracterização molecular

Todos os isolados causadores de podridão no colo foram geneticamente comparados por meio de RAPD. Os seis “primers” utilizados (G-04, G-05, G-16, G-17, G-18 e OPP-6) revelaram polimorfismo entre os isolados. Foram analisadas 39 bandas polimórficas, o que permitiu obter sete grupos distintos (Figuras 11 e 12). Os grupos obtidos não têm relação com os grupos de compatibilidade (Quadro 5) e com a agressividade de isolados (Quadro 6).

De acordo com a matriz de similaridade (Quadro 18 do apêndice) os grupos gerados pelo RAPD dividem os isolados em populações distintas, mas não há correlação com as características estudadas neste trabalho. Segundo Mchau e Coffey (1995) existem evidências de que isolados de *P. capsici* se dividem em populações segundo a região geográfica de origem. Outros marcadores moleculares, como o AFLP, também separam isolados de acordo com o local de isolamento (Lamour e Hausbeck, 2001), contrariando os resultados deste trabalho. De acordo com esses autores e os resultados da presente pesquisa a distribuição geográfica de *P. capsici* não segue os grupos de compatibilidade. Isso permite que a variabilidade genética entre populações seja maior, já que ocorre a recombinação de progênie na reprodução sexual.

Observando a Figura 8 verifica-se que existe uma banda comum a todos os isolados, com tamanho aproximado de 506bp. Esta banda pode ser útil em pesquisas futuras para desenvolvimento de um “primer” específico para *P. capsici*, facilitando a identificação da espécie através de PCR.

Com base no dendrograma gerado pelo RAPD, os isolados escolhidos para a amplificação das regiões ITS-1 e ITS-2 e do gene 5.8SrDNA foram os seguintes: PI-01, PI-05, PI-06, PI-07, PI-08, PI-12, PI-13, PI-15, PI-22 e PI-23. As seqüências da mesma região dos isolados gi | 7453609 de *P.capsici* e gi | 7453612 de *P. infestans* foram obtidos do National Center for Biotechnology Information (NCBI). A relação entre todos os isolados é mostrada na Figura 10. A seqüência do gene 5.8SrDNA (158bp) foi altamente conservada entre os isolados.

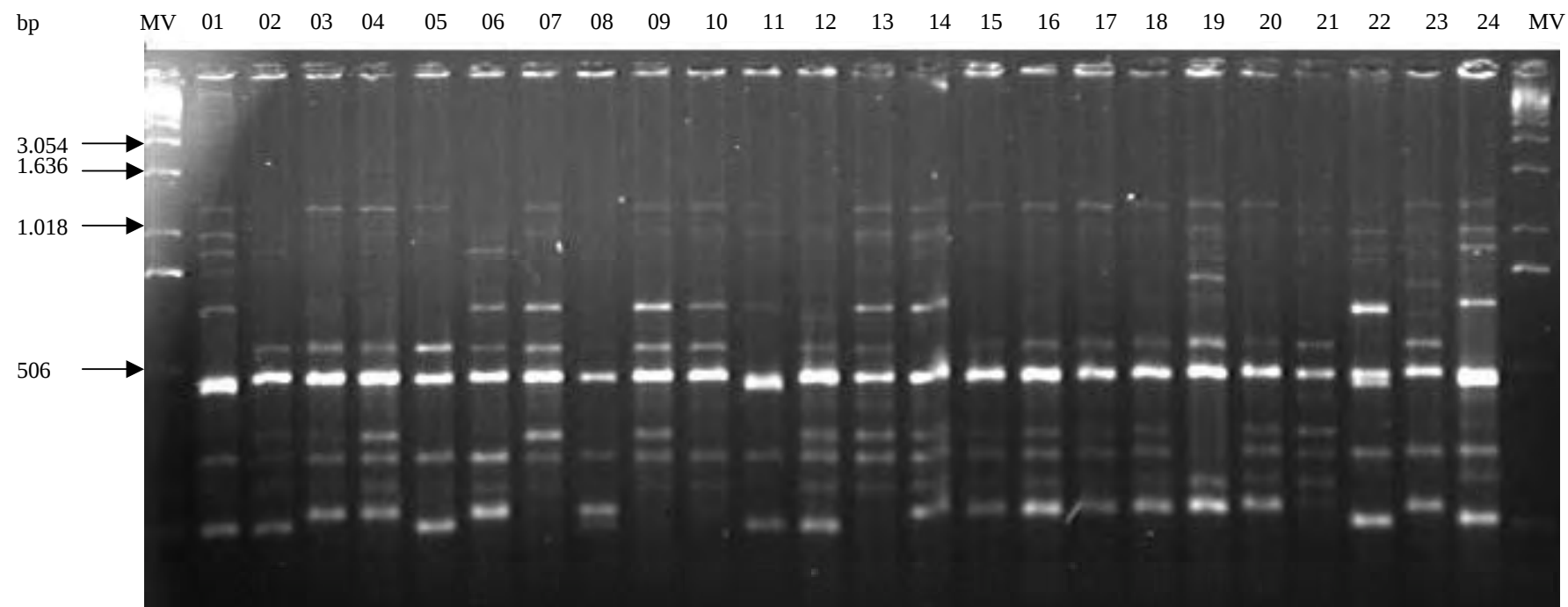


Figura 8: Padrão de bandas gerado pelo polimorfismo de DNA amplificado ao acaso com o “primer” G-17, entre os 24 isolados (Quadro 3) de *P. capsici*. MV=marcador molecular Ladder 1kb.

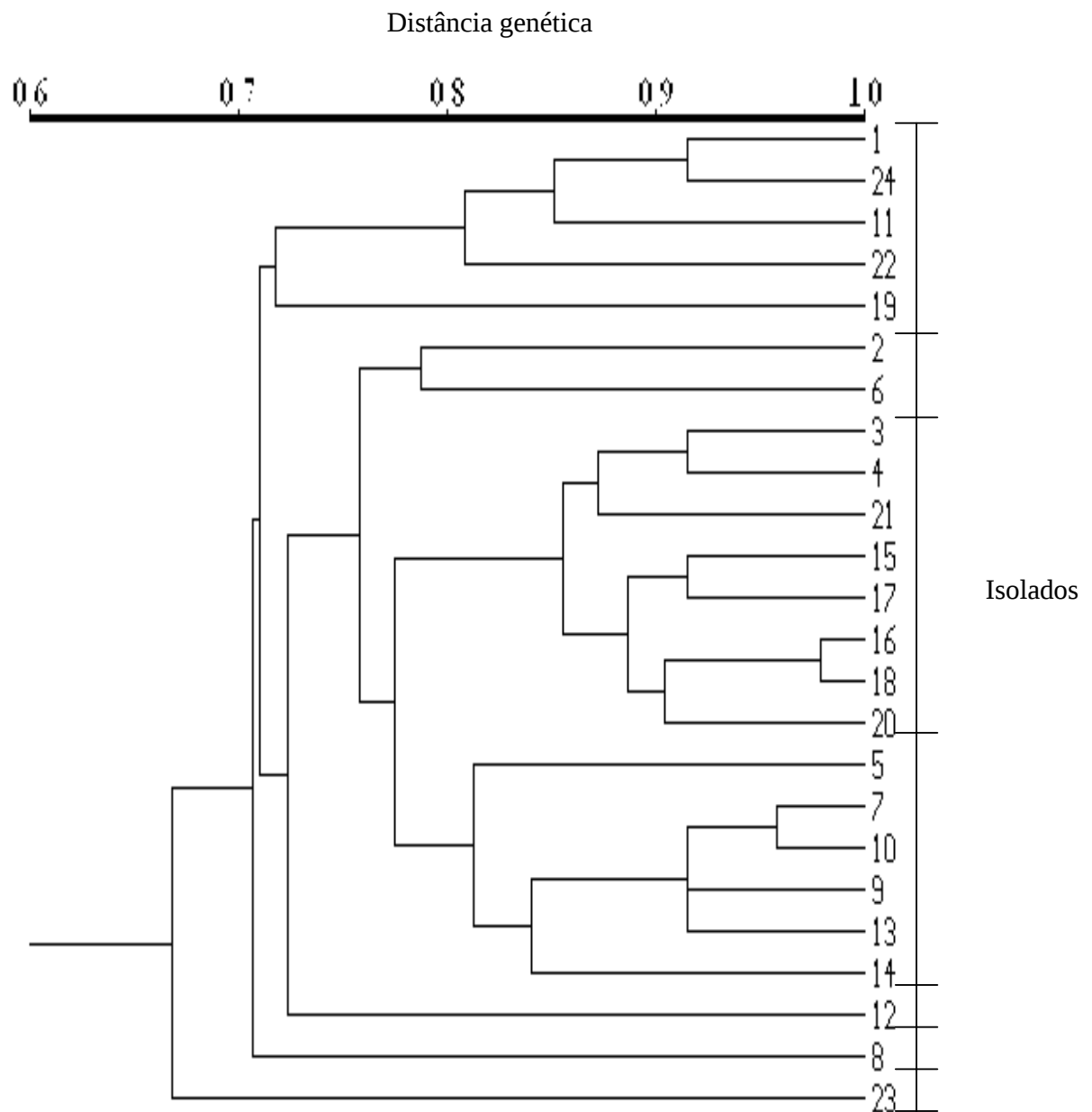


Figura 9: Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, baseado no coeficiente Simple Matching, a partir das bandas obtidas por RAPD com os “primers” G-04, G-05, G-16, G-17, G-18 e OPP-6, em análise de isolados de *Phytophthora capsici* de pimentão

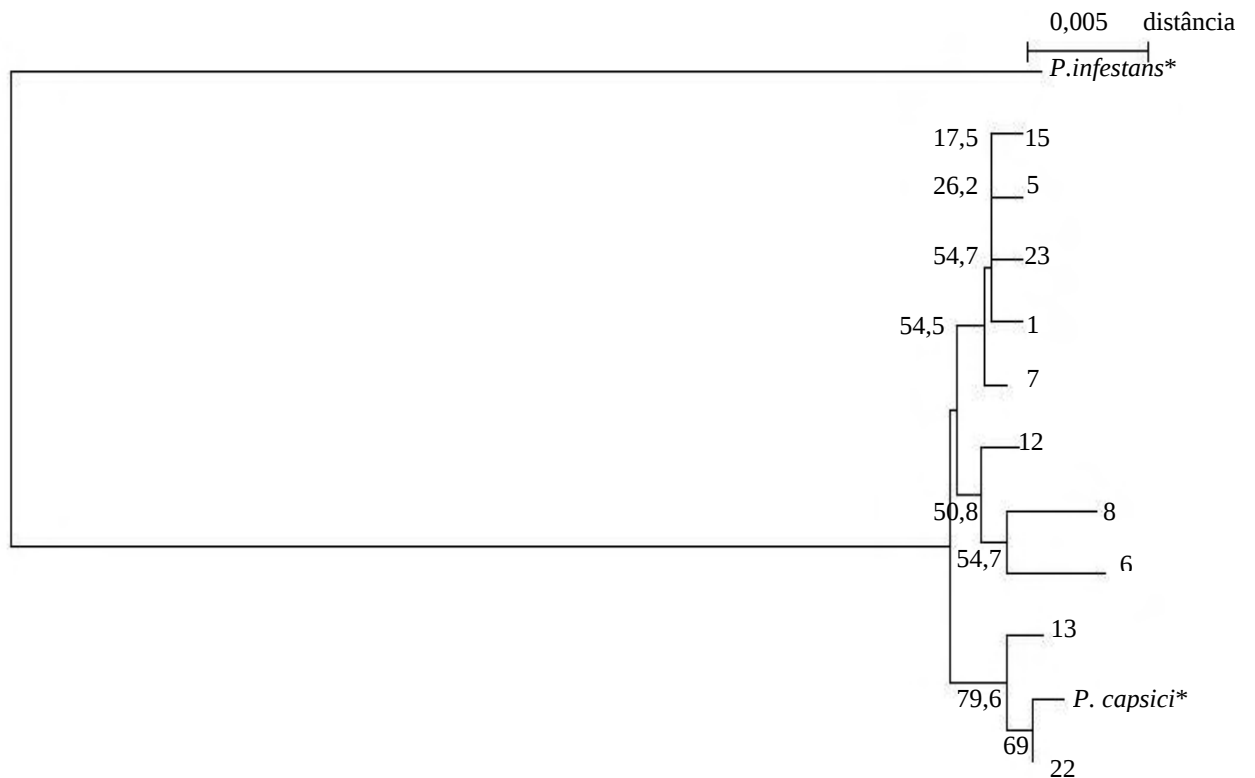


Figura 10. Árvore ilustrando as distâncias derivadas das seqüências das regiões ITS-5.8SrDNA dos isolados de *Phytophthora capsici* (*Isolados obtidos do NCBI, acessos números gi | 7453612 e gi | 7453609 de *P. infestans* e *P. capsici*, respectivamente). Os números nos pontos de ramificação indicam as porcentagens de valores de bootstrap (baseado em 1000 bootstraps).

A homologia na seqüência de nucleotídeos do gene 5.8SrDNA foi de 98.8-99.9 entre os isolados de *P. capsici* e de 91.1-91.5 entre *P. capsici* e *P. infestans* (Quadro 15).

Quadro 15: Homologia da sequência do gene 5.8SrDNA de isolados de *Phytophthora capsici*.

Isolado	1	5	6	7	8	12	13	15	22	23	P. capsici (*)	P. infestans (#)
1	100	99,7	99,1	99,7	99,1	99,5	99,3	99,7	99,3	99,7	99,2	91,5
5		100	99,1	99,7	99,1	99,5	99,3	99,7	99,3	99,7	99,2	91,5
6			100	99,3	99,2	99,3	98,9	99,1	98,9	99,1	98,8	91,1
7				100	99,3	99,5	99,3	99,7	99,3	99,7	99,2	91,5
8					100	99,3	98,9	99,1	99,2	99,1	99,1	91,3
12						100	99,3	99,5	99,3	99,5	99,2	91,5
13							100	99,3	99,7	99,3	99,6	91,4
15								100	99,3	99,7	99,2	91,5
22									100	99,3	99,9	91,5
23										100	99,2	91,5
P. capsici (*)											100	91,4
P. infestans (#)												100

(*) Isolado obtido do NCBI, acesso número gi | 7453609
 (#) Isolado obtido do NCBI, acesso número gi | 7453612

Não existem estudos relacionando o seqüenciamento destas regiões de *P. capsici* com outras características do oomiceto. Segundo a presente pesquisa o seqüenciamento das regiões ITS não separa grupos de compatibilidade e agressividades dos demais isolados, a exemplo do RAPD. No entanto, é uma técnica eficiente para a correta identificação da espécie.

7. CONCLUSÕES

- Os grupos de compatibilidade A1 e A2 ocorrem simultaneamente em uma mesma região geográfica.
- A agressividade é característica de cada isolado e independe do grupo de compatibilidade.
- Os genótipos de pimentão cultivados no estado de São Paulo apresentam baixo nível de resistência a *P. capsici*, sendo esta característica influenciada pela idade da planta.
- Existe comportamento diferencial dos grupos de compatibilidade a fungicidas “in vitro”. Entretanto, esta diferença só é detectada em subdoses dos produtos.
- O balanço O_2/CO_2 influe diretamente na produção de esporângios de *Phytophthora capsici*, não existindo diferença deste comportamento entre os grupos A1 e A2 de compatibilidade.
- Marcadores de RAPD não são consistentes na separação de *P. capsici* por grupos de compatibilidade nem por região geográfica de origem.
- O seqüenciamento das regiões ITS é eficiente na identificação da espécie, entretanto, não separa em grupos de isolados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.B. *Plant pathology*, 4ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635p
- ALI, M. I. M., BALASUNDARAN, M., YESODHARAN, K. Fungicidal amangement of quick wilt disease on pepper in Forest plantation. *KFRI Research Report*, n.111, iii+12pp., 1996.
- AMARAL, J. F. do Requeima do pimentão. *O Biológico*, v.18, p.160-91, 1952.
- ASHBY, S. F. Oospores in cultures of *Phytophthora faberi*. *Kew Bull. Misc. Inf.*, n.9, p.257-62, 1922.
- AZEVEDO, L.A.S.; SILVA, L. Patogenicidade de *Phytophthora capsici* Leonian isolado de frutos de moranga híbrida (Tetsukabuto) a frutos de sete espécies olerícolas. *Fitopatol. Bras.* v.11, p.1005-8, 1986.
- BARKSDALE, T. H., PAPAVIDAS, G. C. Resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. *Phytopathology*, v.73, p.964, 1983.
- BARTUAL, R., MARSAL, J. I., CARBONEL, E. A., TELLO, J. C., CAMPOS, T. Genética de la resistência a *Phytophthora capsici* Leon em pimiento. *Bol. Sanidad Veg*, v.17, p.3-124, 1991.

- BERGER, P. D. The analysis of effects of control measures on the development of epidemics.
In: KRANZ, J., ROTEM, J. *Experimental techniques in plant disease epidemiology*.
Heidelberg: Springer-Verlag, 1988, p.137-51.
- BRASIER, C. M. Observations on the sexual mechanism in *Phytophthora palmivora* and related species. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, v.58, p.237-51, 1972.
- BRASIER, C. M. Evolutionary biology of *Phytophthora*. Part I: Genetic system, sexuality and the generation of variation. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v.40, p.153-71, 1992.
- BUELL, C. B., WESTON, W. H. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungus cultures. *Am. J. Bot.*, n.34, p.555-61, 1947.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *J. Trop. Med. Hyg.*, v.70, p.181-4, 1967.
- CHALITA, L. V. A. S. *Modelos para dados agrupados e censurados*. Piracicaba, 1998. 135p.
Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- COMPÊNDIO de defensivos agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola: 6ed. São Paulo: Andrei, 1999. 672p.
- EGEA, C., ALCAZAR, M. D., CANDELA, M. E. Capsidiol: its role in the resistance on *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Plant.*, v.98, p.737-42, 1996.
- ERWIN, D. C., RIBEIRO, A. K. *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul: APS, 1996. 562p.
- FRANCISCO, V. L. F. S., SUEYOSHI, M. L. S., PINO, F. A. de CAMARGO, A. M. M. P. Censo agropecuário no estado de São Paulo: resultados regionais. *Inf. Econ.*, v.27, p.7-140, 1997.

- GADD, C. H. *Phytophthora faberi*. *Maubl. Ann. Bot. Gard.*, n.9, p.47-89, 1924.
- GALINDO, A. J., GALLEGLY, M. E. The nature of sexuality in *Phytophthora infestans*.
Phytopathology, v.50, p.123-8, 1960.
- GORDON D, ABAJIAN C, GREEN P. Consed: a graphical tool for sequence finishing.
Genome Research, v.8, p.195-202, 1998.
- GUSTAFSON, G. Mechanism of action of agricultural fungicides. *Dow Agro Sciences*, 2001.
s/p.
- HAWKSWORTH, D. L., SUTTON, B. C., AINSWORTH, G. C. *Dictionary of fungi*: 8.ed.
Cambridge: CAB International, 1995. 616p.
- HWANG, B. K., KIM, E. S. *Phytophthora* blight of pepper and its control in Korea. *Plant Dis.*, v.79, p.221-7, 1995.
- HWANG, B. K., SUNG, N. K. Effect of metalaxyl on capsidiol production in stems of pepper plants infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Dis.*, v.73, p.748-51, 1989.
- HWANG, B. K., YOON, J. Y., IBENTHAL, W.D., HEITEFUSS, R. Soluble proteins, esterases and superoxide dismutase in pepper plants in relation to age-related resistance to *Phytophthora capsici*. *Journal of Phytopathol. (Berl.)*, v.132, p.1129-38, 1991.
- JEUN, Y. C., HWANG, B. K. Carbohydrate, aminoacid, phenolic and mineral nutrient contents of pepper plants in relation to age-related resistance to *Phytophthora capsici*. *J. Phytopathol. (Berl.)*, v.131, p.40-52, 1991.
- KANNAWISCHER, M. E., MITCHELL, D. J. The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. *Phytopathology*, v.68, p.1760-5, 1978.
- KAPLAN, E. L., MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Statist. Assoc.*, v. 53, p.475-81, 1958.

- KIM, E. S., HWANG, B. K. Virulence to Korean pepper cultivars of isolates to *Phytophthora capsici* from different geographic areas. *Plant Dis.*, v.76, p. 486-9, 1992.
- KIM, J. S., DO, T. H., CHO, E. K., LEE, M. W. Mating types of *Phytophthora capsici* Leonian from red pepper (*Capsicum annuum* L.) in Korea. *Kor. J. Mycol.*, v.16, n.2, p.60-83, 1988.
- KIM, V. J., HWANG, B. K., PARK, K. W. Expression of age-related resistance in pepper plants infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Disease*, v. 78, n. 9, p.745-7, 1989.
- KIMATI, H., GIMENES-FERNANDES, N., SOAVE, J., KUROSAWA, C., NETO, F. B., BETTIOL, W. Recomendações de fungicidas por cultura. In: _____. *Guia de fungicidas agrícolas*. 2.ed. Jaboticabal: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1997. p.119-20.
- KIMBLE, K. A., GROGAN, R. G. Resistance to *Phytophthora* root rot in pepper. *Plant Dis. Rep.*, v. 44, p.872-3, 1960.
- KOBORI, R. F., DELLA VECCHIA, P. T., KUROZAWA, C., SOLER, J. M. P. Avaliação da resistência de linhagens de *Capsicum annuum* quando inoculadas com três concentrações de inóculo de *Phytophthora capsici*. *Summa Phytopatol.*, v. 26, p. 77-81, 2000.
- KURAMAE-IZIOKA, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. *UNIMAR*, v.19, p.683-9, 1997.
- KUROZAWA, C., PAVAN, M. A. Doenças das solanáceas (berinjela, jiló, pimentão e pimenta). In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L. E. A., REZENDE, J. A. M. (Ed.). *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2. p.665-75.
- LAMOUR, K. H., HAUSBECK, M. K. Investigating the spatiotemporal genetic structure of *Phytophthora capsici* in Michigan. *Phytopathology*, v.91, n.10, p. 973-80, 2001.

- LEE, S. B., WHITE, T. J., TAYLOR, J. W. Detection of *Phytophthora* species by oligonucleotide hybridization to amplified ribosomal DNA spacers. *Phytopathology*, v.83, p.177-81, 1993.
- LEE, B. K., KIM, B. S., CHANG, S. W., HWANG, B. K. Aggressiveness to pumpkin cultivars of isolates of *Phytophthora capsici* from pumpkin and pepper. *Plant disease*, v.85, p.497-500, 2001.
- LEONIAN, L. H. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. *Phytopathology*, v.12, p. 401-8, 1922.
- LIANG, Y., LU, J. D., JI, R. Z. Study on the occurrence and yield loss of pepper *Phytophthora* blight in Shaanxi. *Plant Protection*, n.1, p.14-5, 1992.
- LIN, B. Q., ZHANG, S. L. Preliminary study on methods for identification of pepper varieties resistant to *Phytophthora capsici*. *China Vegetables*, n.4, p.21-4, 1994.
- MARQUE, J. M. *Efeito da solarização do solo na sobrevivência de Phytophthora capsici em condições de cultivo protegido*. Botucatu, 1999. 59p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.
- MARQUE, J. M., SOUZA, N. L., KOBORI, R. F. Identificação de grupos de compatibilidade de *Phytophthora capsici* Leonian obtidos de pimentão (*Capsicum annuum* L.) e abóbora (*Curcubita moschata* Duch.). *Summa Phytopathol.*, v.25, p.269-71, 1999a.
- MARQUE, J. M., SOUZA, N. L., KOBORI, R. F. Necessidade de aeração na produção de esporângios de *Phytophthora capsici*. *Summa Phytopathol.*, v.26, p.102, supl.. 2000.

- MASSAGO, H., YOSHIKAWA, M., NAKANISHI, N. Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. *Phytopathology*, v.67, p.424-8, 1977.
- MATSUOKA, K., ANSANI, C. V. Formação de oosporos de *Phytophthora capsici* nos tecidos de pimentão (*Capsicum annuum*). **Fitopatol. Bras.**, v.9 p. 27-36, 1984.
- MATSUOKA, K., VANETTI, C. A. Murcha ou requeima do pimentão e podridão do fruto de abóbora causados por *Phytophthora capsici* Leonian. In.: LUZ, E. D. N., SANTOS, A. F., MATSUOKA, K., BEZERRA, J. L. (Ed.). *Doenças causadas por Phytophthora no Brasil*. Campinas: Rural, 2001. p.509-59.
- MCHAU, G. R. A., COFFEY, M. D. Evidence for the existence of two subpopulations in *Phytophthora capsici* and a redescription of the species. *Mycol. Res.*, v.99, p.89-102, 1995.
- MILLER, J. S., JOHNSON, D. A., HAMM, F. B. Aggressiveness of isolates of *Phytophthora infestans* from the Columbia Basin of Washington and Oregon. *Phytopathology*, v.88, p.190-7, 1998.
- MITCHELL, D. J., KANNWISCHER-MITCHELL. *Phytophthora*. In: SINGLETON, L. L., MIHAIL, J. D., RUSH, C. M. *Methods for research on soil borne phytopathogenic fungi*. St Paul: APS, 1992. p.31-8.
- MITCHELL, D. J., ZENTMYER, G. A. Effects of oxygen and carbon dioxide tensions on growth of several species of *Phytophthora*. *Phytopathology*, v.61, p.787-91, 1971a
- MITCHELL, D. J., ZENTMYER, G. A. Effects of oxygen and carbon dioxide tensions on sporangium and oospore formation by *Phytophthora* spp. *Phytopathology*, v.61, p.807-11, 1971b.

- ORTEGA, R. G., ESPANAOL, C. P., ZUERCO, J. C. Pepper response to *Phytophthora capsici* Leon zoospore inoculation. II. Influence of plant age and inoculation dose. *Capsicum Newsletter*, n.3, p.35-6, 1984a.
- ORTEGA, R. G., ESPANAOL, C. P., ZUERCO, J. C. Pepper response to *Phytophthora capsici* Leon micelial inoculation. I. Influence of temperature and fungus isolate. *Capsicum Newsletter*, n.3, p.37-8, 1984b.
- 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*. *J. Phytopathol.*, v.123, p.12-24, 1998.
- PALLOIX, A., DAUBEZE, A. M., POCHARD, E., MOLOT, P. M., MAS, P. Effect of *Capsicum annuum* roots on zoosporangial formation in *Phytophthora capsici*. *Capsicum Newsletter*, n.4, p.59-60, 1985.
- PAPAVIZAS, G. C., BOWERS, J. H., JOHNSTON, S. A. Selective isolation of *Phytophthora capsici* from soils. *Phytopathology*, v.71, p.129-33, 1981.
- PARRA, G. P., RISTAINO, J.B. Intensity to ridomil gold (metenoxan) found among field isolates of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight on Bell pepper in North Caroline and New Jersey. *Plant dis.*, v.82, p.711, 1998.
- PEREIRA, J. C. R., ALMEIDA, L. C. C., SANTOS, A. F., ALBUQUERQUE, P. E. P. Aspectos correlatos à efetividade de alguns fungicidas no controle da requeima da seringueira. *Fitopatol. Bras.*, v.13, p.189-92, 1998.
- POLACH, F. J., WEBSTER, R. K. Identification of strains and inheritance of pathogenicity in *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*, v.62, p.10-26, 1972.

- RÊGO, A. M. & REIFSCHNEIDER, F.J.B. Levantamento de grupos de compatibilidade de isolados de *Phytophthora capsici* Leonian obtidos de abóbora (*Curcubita maxima* Duch. X *Curcubita moschata* Duch.), pimenta (*Capsicum annuum* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Fitopatol. Bras.**, v.7, p.55-61, 1982.
- RISTAINO, J. B., JOHNSTON, S. A. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on Bell pepper. *Plant Dis.*, v.83, p.1080-9, 1999.
- RISTAINO, J. B., MADRITCH, M., TROUT, C. L., PARRA, G. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.68, p.948-54, 1998.
- ROHLF, F. J. *NTSYS – PC version 1.7 numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Setauket: Exeter Software Publ., 1992.
- SAMBROOK, J., MANIATS, T., FRITSCH, E. F. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- SAVAGE, E. J., CLAYTON, C. W., HUNTER, J. H., BRENNEMAN, J. A., LAVIOLA, C., GALLEGLY, M. E. Homothalism, heterothalism and interspecific hybridization in the genus *Phytophthora*. *Phytopathology*, v. 58, p.1004-21, 1968.
- SCOTT, A. J., KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, v.30, p.507-12, 1974.
- SHAW, D. S. The breeding system of *Phytophthora infestans*: the role of the A2 mating type. In: DAY, P. R., JELLIS, G. J. *Genetics and plant pathogenesis*. Oxford:BSP. 1987. p.161-74.
- SITARAMAIAH, K., HANUMA, L. N. Effect of fungicides on *Phytophthora capsici* wilt disease in betel vine. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, v.27, p.331-3, 1997.

- SONNEMBERG, E.P. *Olericultura especial*: 3.ed. Goiás: Universidade Federal de Goiás. 1983. 149p.
- STAMPS, D. J., WATERHOUSE, G. M., NEWHOOK, F. J., HALL, G. S. *Revised tabular key to the species of **Phytophthora***. CAB International Mycological Institute, Mycol. Pap., 1990. 162p.
- TANG, D. Z., SUN, Y. B., HE, S. Q., LI, Y. Q. Study on infection cycle, epidemic factors and the control of *Phytophthora* blight of honeydew. *Acta Phytophylacica Sinica*, v.19, p.271-5, 1992.
- THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuclei Acids Research*, v.25, p.4876-82, 1997.
- TIMMER, L. W., CASTRO, J., ERWIN, D.C., BELSER, W. L., ZENTMYER, G. A. Genetic evidence for zygotic meiosis in *Phytophthora capsici*. *Ann. J. Bot.*, v.57, p.1211-8, 1970.
- TRANI, P. E., GROPPPO, G. A., e SILVA, M. C. P., MINAMI, K., BURKE, T. J. Diagnóstico sobre a produção de hortaliças no estado de São Paulo. *Hort. Bras.*, v.15, p.19-24, 1997
- TSAO, P. H., UGALE, R., HOBBS, S., FARIH, A. Control of homothallic oospore formation in *Phytophthora parasitica* by culture manipulations. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, v.75, p.153-6, 1980.
- WALKER, S. J., BOSLAND, P. W. Inheritance of *Phytophthora* root rot and foliar blight resistance in pepper. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, n.124, p.14-18, 1999.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribossomical RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A., GELFAND, D. H.,

SNINSKY, J. J., WHITE, T. J. *PCR protocols, a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990, p. 315-322.

WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., RAFASKY, J. A., TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, v.18, p.6531-5, 1990.

YANG, S. S., SUNG, N. K., CHOI, D. I., KIM, C. H. Pathogenic variation of *Phytophthora capsici* Leonian on red pepper in Korea. *Kor. J. Plant Pathol.*, v.5, p.370-6, 1989.

APÊNDICE

Quadro 16: Taxas de morte/dia de genótipos comerciais de pimentão cultivados no estado de São Paulo.

Genótipo	Idade		
	40 dias	60dias	90dias
Criollo ⁽¹⁾	0,0000 Ca	0,0000 Ca	0,0000 Ea
Ikeda ⁽²⁾	1,0000 Aa	1,0000 Aa	1,0000 Aa
Magda	1,0000 Aa	1,0000 Aa	0,0625 Db
Magali – R	1,0000 Aa	1,0000 Aa	0,6142 Bb
Elisa	1,0000 Aa	1,0000 Aa	0,6142 Bb
Nathalie	0,6142 Ba	0,0633 Bb	0,0000 E
Melody	1,0000 Aa	1,0000 Aa	0,2857 Cb

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si no nível de 5% de significância

⁽¹⁾ Testemunha resistente

⁽²⁾ Testemunha suscetível

CV = 8,784%

Quadro 17: Medidas das concentrações de O₂ e CO₂ e da quantidade de esporângios/mL das parcelas testemunha e vedadas com rolha.

Isolado	Repetição	Tempo (dias)	Testemunha			Rolha	
			% O ₂	%CO ₂	Esporângios/mL	O ₂ /CO ₂	Esporângios/mL
8 Grupo A2	1	3	21	0	1,00	8,2/1	0,000
		4	21	0	0,50	8,2/1	0,000
		5	21	0	5,25	7,8/1	0,000
		6	21	0	5,25	6,0/1	0,000
		7	21	0	12,75	5,0/1	0,000
	2	3	21	0	0,00	8,2/1	0,000
		4	21	0	1,25	6,3/1	0,000
		5	21	0	2,25	6,3/1	0,000
		6	21	0	5,00	5,7/1	0,000
		7	21	0	11,25	4,8/1	0,000
	3	3	21	0	0,00	7,0/1	0,000
		4	21	0	1,50	6,0/1	0,000
		5	21	0	1,75	5,3/1	0,000
		6	21	0	7,50	5,2/1	0,000
		7	21	0	8,25	4,8/1	0,000
	4	3	21	0	0,00	7,0/1	0,000
		4	21	0	0,00	5,3/1	0,000
		5	21	0	1,50	4,4/1	0,000
		6	21	0	7,25	3,9/1	0,000
		7	21	0	12,00	3,6/1	0,000

Quadro 17 (cont.)

Isolado	Repetição	Tempo (dias)	Testemunha			Rolha	
			% O2	%CO2	Esporângios/mL	O2/CO2	Esporângios/mL
12 Grupo A1	1	3	21	0	0,00	15,7/1	0,000
		4	21	0	2,00	11,3/1	0,000
		5	21	0	4,75	10,5/1	0,250
		6	21	0	10,00	9,3/1	0,500
		7	21	0	21,25	7,8/1	0,500
	2	3	21	0	1,00	12,2/1	0,000
		4	21	0	3,25	7,8/1	0,000
		5	21	0	6,50	6,6/1	0,000
		6	21	0	6,75	6,3/1	0,110
		7	21	0	8,00	5,7/1	0,500
	3	3	21	0	1,75	11,4/1	0,000
		4	21	0	3,45	8,2/1	0,000
		5	21	0	6,00	6,6/1	0,000
		6	21	0	9,25	6,0/1	0,000
		7	21	0	10,00	5,4/1	0,080
	4	3	21	0	0,25	12,2/1	0,000
		4	21	0	1,78	8,2/1	0,000
		5	21	0	7,51	7,0/1	0,000
		6	21	0	8,00	6,3/1	0,000
		7	21	0	11,75	3,6/1	0,168

Quadro 17 (cont.)

Isolado	Repetição	Tempo (dias)	Testemunha			Rolha	
			% O2	%CO2	Esporângios/mL	O2/CO2	Esporângios/mL
20 Grupo A2	1	3	21	0	0,13	7,8/1	0,000
		4	21	0	0,25	7,0/1	0,000
		5	21	0	0,87	6,6/1	0,000
		6	21	0	1,75	6,6/1	0,100
		7	21	0	3,75	4,2/1	0,500
	2	3	21	0	0,00	8,7/1	0,000
		4	21	0	0,13	3,9/1	0,000
		5	21	0	0,25	3,6/1	0,000
		6	21	0	1,00	3,2/1	0,005
		7	21	0	2,00	2,8/1	0,070
	3	3	21	0	0,25	7,0/1	0,000
		4	21	0	0,38	3,6/1	0,005
		5	21	0	1,00	3,5/1	0,010
		6	21	0	4,25	3,5/1	0,125
		7	21	0	4,75	2,9/1	0,250
	4	3	21	0	0,63	9,3/1	0,000
		4	21	0	0,75	4,6/1	0,000
		5	21	0	2,00	4,1/1	0,000
		6	21	0	2,37	3,4/1	0,005
		7	21	0	3,50	2,9/1	0,150

Quadro 17 (cont.)

Isolado	Repetição	Tempo (dias)	Testemunha			Rolha	
			% O2	%CO2	Esporângios/mL	O2/CO2	Esporângios/mL
22 Grupo A1	1	3	21	0	0,25	8,3/1	0,000
		4	21	0	2,50	7,0/1	0,000
		5	21	0	6,75	7,0/1	0,000
		6	21	0	10,00	6,0/1	0,000
		7	21	0	16,25	5,7/1	0,000
	2	3	21	0	1,00	7,4/1	0,000
		4	21	0	2,00	5,2/1	0,000
		5	21	0	4,25	5,0/1	0,000
		6	21	0	6,75	5,0/1	0,000
		7	21	0	21,25	4,8/1	0,000
	3	3	21	0	0,75	5,2/1	0,000
		4	21	0	1,25	4,8/1	0,000
		5	21	0	2,75	4,6/1	0,000
		6	21	0	4,50	4,4/1	0,000
		7	21	0	12,25	4,4/1	0,000
	4	3	21	0	0,00	6,9/1	0,000
		4	21	0	4,50	5,7/1	0,000
		5	21	0	4,75	5,4/1	0,000
		6	21	0	11,25	5,6/1	0,000
		7	21	0	24,50	3,6/1	0,000

Quadro 18: Matriz de similaridade genética entre isolados de *Phytophthora capsici* de pimentão

Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	1,00																							
2	0,81	1,00																						
3	0,74	0,81	1,00																					
4	0,74	0,77	0,91	1,00																				
5	0,79	0,77	0,74	0,79	1,00																			
6	0,81	0,79	0,81	0,85	0,77	1,00																		
7	0,77	0,74	0,77	0,85	0,85	0,74	1,00																	
8	0,70	0,72	0,74	0,70	0,74	0,68	0,64	1,00																
9	0,77	0,74	0,77	0,81	0,81	0,74	0,91	0,60	1,00															
10	0,77	0,70	0,72	0,81	0,85	0,74	0,96	0,64	0,91	1,00														
11	0,87	0,72	0,70	0,54	0,83	0,77	0,85	0,70	0,81	0,85	1,00													
12	0,74	0,68	0,66	0,74	0,79	0,72	0,81	0,66	0,77	0,77	0,79	1,00												
13	0,77	0,74	0,81	0,89	0,81	0,79	0,91	0,64	0,91	0,91	0,77	0,77	1,00											
14	0,74	0,64	0,70	0,79	0,74	0,77	0,85	0,57	0,81	0,85	0,79	0,70	0,85	1,00										
15	0,68	0,74	0,89	0,85	0,72	0,74	0,79	0,81	0,70	0,74	0,72	0,72	0,79	0,72	1,00									
16	0,74	0,77	0,87	0,87	0,79	0,81	0,81	0,74	0,77	0,81	0,74	0,74	0,85	0,83	0,89	1,00								
17	0,68	0,74	0,85	0,81	0,72	0,70	0,74	0,58	0,74	0,74	0,68	0,68	0,79	0,68	0,91	0,85	1,00							
18	0,72	0,74	0,89	0,85	0,77	0,79	0,79	0,77	0,74	0,79	0,72	0,72	0,83	0,81	0,91	0,98	0,87	1,00						
19	0,74	0,64	0,74	0,74	0,66	0,72	0,68	0,70	0,64	0,68	0,66	0,62	0,68	0,66	0,68	0,70	0,72	0,72	1,00					
20	0,68	0,79	0,89	0,85	0,72	0,74	0,74	0,81	0,74	0,74	0,64	0,64	0,83	0,62	0,87	0,89	0,91	0,91	0,72	1,00				
21	0,74	0,77	0,91	0,83	0,74	0,77	0,81	0,70	0,81	0,77	0,70	0,66	0,85	0,79	0,85	0,83	0,81	0,85	0,70	0,85	1,00			
22	0,81	0,70	0,68	0,60	0,72	0,66	0,66	0,72	0,66	0,66	0,81	0,60	0,62	0,74	0,66	0,64	0,70	0,66	0,72	0,66	0,68	1,00		
23	0,62	0,55	0,70	0,66	0,62	0,68	0,64	0,70	0,55	0,64	0,66	0,70	0,64	0,66	0,81	0,74	0,72	0,77	0,66	0,68	0,74	0,60	1,00	
24	0,91	0,72	0,70	0,66	0,70	0,72	0,72	0,70	0,68	0,72	0,83	0,70	0,68	0,70	0,68	0,70	0,68	0,72	0,74	0,68	0,70	0,81	0,62	1,00