

Caracterização e Diversidade Genética de Isolados de *Phytophthora* spp. do Cacaueiro com Base em Marcadores RAPD*

Fábio G. Faleiro**^{1,3}, Edna D. M. N. Luz****², Admildes O. Cerqueira², Cenilda S. S. Rocha², Alfredo Dantas Neto¹, Acassi B. Flores¹, Rita C. S. Bahia¹ & Alessandra S. G. Faleiro¹

¹Laboratório de Biotecnologia, Seção de Genética, ²Seção de Fitopatologia, CEPEC/CEPLAC, Cx. Postal 07, CEP 45600-000, Itabuna, BA; ³Embrapa Cerrados, Cx. Postal 08223, CEP 73301-970, Planaltina, DF, e-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br

(Aceito para publicação em 18/08/2003)

Autor para correspondência: Fábio G. Faleiro

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

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho estudar a diversidade genética entre isolados das três principais espécies do gênero *Phytophthora* causadoras da podridão-parda do cacaueiro (*Theobroma cacao*) no Brasil, utilizando marcadores moleculares RAPD. Foram utilizados 22 isolados de *Phytophthora* spp., sendo oito de *P. capsici*, cinco de *P. palmivora* e nove de *P. citrophthora*. DNA genômico de cada isolado foi extraído e amplificado utilizando-se sete "primers" decâmeros, os quais geraram 191 marcadores RAPD. Distâncias genéticas e análises de agrupamento

realizadas com base nestes marcadores permitiram uma diferenciação clara dos isolados de cada espécie e mostraram diferentes níveis de diversidade intra-específica. Ficou evidente o potencial dos marcadores RAPD como uma ferramenta auxiliar na classificação dos isolados e, também, em estudos de diversidade genética intra-específica.

Palavras-chave adicionais: *Phytophthora capsici*, *P. palmivora*, *P. citrophthora*, *Theobroma cacao*, marcadores moleculares, podridão-parda.

ABSTRACT

Characterization and genetic diversity of *Phytophthora* spp. isolates from cacao based on RAPD markers

This paper deals with the study of the genetic diversity of the three most important species of *Phytophthora* causing cacao (*Theobroma cacao*) black pod disease in Brazil. RAPD molecular markers were used to study the genetic diversity among eight isolates of *P. capsici*, five of *P. palmivora* and nine of *P. citrophthora*. Genomic

DNA of each isolate was extracted and amplified using seven decamer primers which generated 191 RAPD markers. The genetic distances and cluster analysis based on these molecular markers made it possible to differentiate the isolates of each species and showed different levels of intraspecific variation. These results confirm the potential of RAPD markers as an auxiliary tool for the classification of *Phytophthora* spp. isolates and also to study intraspecific genetic variability.

A podridão-parda dos frutos do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) ou podridão-de-*Phytophthora* é a principal doença do cacaueiro, considerando a sua ocorrência em todos os países produtores. No Brasil, a podridão-parda ocorre em todos os estados produtores ocasionando perdas em torno de 20 a 30% da produção de frutos. Em algumas regiões da Bahia, principal estado produtor do Brasil, em condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, as perdas podem atingir 70 a 80% da produção (Luz *et al.*, 1997).

Por mais de 50 anos *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butler foi considerada a única espécie do gênero causando doenças no cacaueiro em todos os países onde existe o cultivo. Após diferentes estudos de variabilidade entre isolados considerados de *P. palmivora*, um Workshop internacional realizado na Inglaterra, em 1976, reconheceu a existência de quatro formas morfológicas que levaram à classificação de três espécies: *P. palmivora*, *P. megakarya* Brasier & Griffin e *P.*

capsici Leonian. Posteriormente foram classificadas como espécies patogênicas em cacau *P. citrophthora* (Smith and Smith) Leonian, *P. hevea* Thompson e *P. megasperma* Drechsler. Uma nova espécie chamada *P. katusrae* Ko & Chang está sob investigação. Uma revisão sobre todas as espécies patogênicas em cacau foi feita por Luz & Silva (2001).

No Brasil, quatro das sete espécies mencionadas já foram relatadas. *Phytophthora capsici*, segundo levantamentos realizados entre 1977 e 1981, é a espécie predominante na Bahia e no Espírito Santo, porém levantamentos posteriores mostraram a tendência de crescimento das populações de *P. palmivora* e *P. citrophthora*, especialmente nas áreas foco da doença no Estado da Bahia. A espécie *P. hevea* também foi relatada na Bahia, mas é considerada de patogenicidade moderada ao cacaueiro (Luz & Silva., 2001).

Um dos maiores problemas envolvendo o estudo das espécies fitopatogênicas de *Phytophthora* spp. reside na sua taxonomia, devido à sua extrema variabilidade inter e intra-específica (Cerqueira *et al.*, 1999). Na sistemática do gênero, diversos critérios têm sido adotados, predominando as

* Auxílio financeiro: CFC/ICCO/CEPLAC-BIOMOL e FUNDECAU

** Bolsista do IBECAU

***Bolsista do CNPq

características morfológicas e biométricas preconizadas pelas chaves de Waterhouse (1963), Newhook *et al.* (1978) e Stamps *et al.* (1990). Muitas vezes tais características tornam-se insuficientes para a classificação e também para estudos de diversidade genética, sendo necessário o uso de marcadores genéticos adicionais como aqueles obtidos por eletroforese de proteínas totais, isoenzimas, polimorfismos de DNA e RNA, análise de cariótipo, serologia e antígenos (Luz & Matsuoka, 1996).

Dentre os marcadores genéticos, aqueles baseados em polimorfismos do DNA têm sido utilizados com sucesso em diferentes estudos genéticos das espécies de *Phytophthora* spp. Carter *et al.* (1990) utilizaram marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) para estudar os relacionamentos genéticos entre diferentes isolados de *P. infestans* (Mont.) De Bary. Panabieres *et al.* (1989) utilizaram a mesma técnica na identificação de espécies de *Phytophthora* spp. Sondas de DNA espécie-específicas também têm sido utilizadas para auxiliar na classificação de espécies (Goodwin *et al.*, 1989). Análises de sequências derivadas da amplificação, via reação em cadeia da polimerase, de regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossomal têm possibilitado estudos de relacionamentos evolucionários entre diferentes espécies de *Phytophthora* spp. (Crawford *et al.*, 1996; Cooke & Duncan, 1997). Análises de marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) também já foram utilizados e mostraram ótimo potencial para a diferenciação entre espécies de *Phytophthora* spp. bem como para estudos de diversidade genética de isolados da mesma espécie (Sackey *et al.*, 1999).

Neste trabalho, objetivou-se caracterizar e estudar a diversidade genética de isolados das três principais espécies de *Phytophthora* spp. causadoras da podridão-parda do cacau no Brasil, utilizando marcadores moleculares RAPD, bem como avaliar o potencial da tecnologia como ferramenta auxiliar na classificação dos diferentes isolados.

Foram utilizados 22 isolados de *Phytophthora* spp., sendo oito de *P. capsici*, cinco de *P. palmivora* e nove de *P. citrophthora*. O isolamento foi feito a partir de frutos, plântulas, broto e solo (raízes) de cacau da região cacaueira baiana e outras regiões produtoras de cacau (Tabela 1), utilizando metodologia descrita por Luz & Silva (2001). Todos os isolados obtidos foram previamente caracterizados e classificados com base em características morfológicas (Waterhouse, 1963). A massa micelial de cada isolado foi produzida em placas de Petri contendo meio BD líquido.

A extração foi realizada a partir de, aproximadamente, 250 mg de massa micelial de cada isolado, utilizando-se o método do SDS com algumas modificações: resumidamente, o micélio foi macerado em cadinho de porcelana em contato com N2 líquido. Em seguida, o macerado foi colocado em um tubo de 1,5 ml, ao qual foi adicionado 700 µl de tampão de lise constituído por Tris-HCl 200 mM, pH 8,0, EDTA 25 mM, dodecil sulfato de sódio 1%, NaCl 250 mM e 2-mercaptoetanol 1%. O macerado foi misturado ao tampão de lise e os tubos foram mantidos em banho-maria (70 °C) por 1 h, sendo agitados, a cada 10 min. Após a incubação, foi realizada a

TABELA 1 - Isolados de *Phytophthora* spp. obtidos a partir de plantas de cacau (*Theobroma cacao*) em diferentes regiões produtoras de cacau

Nº	Espécie	Isolamento a partir de	Local de origem
1	<i>Phytophthora capsici</i>	fruto	Faz. Itamarati, Linhares, ES
2	<i>P. capsici</i>	fruto	Faz. Santa Isabel, Linhares, ES
3	<i>P. capsici</i>	fruto	Faz. Santa Isabel, Linhares, ES
4	<i>P. capsici</i>	fruto	EMARC, Uruçuca, BA
5	<i>P. capsici</i>	fruto	Faz. Boa Esperança, Una, BA
6	<i>P. capsici</i>	fruto	Faz. Guanabara, Guaratinga, BA
7	<i>P. capsici</i>	fruto	Faz. Boa Sorte, Una, BA
8	<i>P. capsici</i>	fruto	Una, BA
9	<i>P. palmivora</i>	fruto	Benevides, PA
10	<i>P. palmivora</i>	fruto	Ipiaú, BA
11	<i>P. palmivora</i>	broto	Faz. Esperança, Itabuna, BA
12	<i>P. palmivora</i>	fruto	Tingo Maria, Peru
13	<i>P. palmivora</i>	fruto	Tingo Maria, Peru
14	<i>P. citrophthora</i>	raízes	Quadra G', CEPEC, Ilhéus, BA
15	<i>P. citrophthora</i>	plântula	Faz. Santa Helena, Ilhéus, BA
16	<i>P. citrophthora</i>	fruto	Faz. Putunuijú, Jussari, BA
17	<i>P. citrophthora</i>	fruto	Lomanto Júnior, BA
18	<i>P. citrophthora</i>	fruto	DEPEA, Benevides, PA
19	<i>P. citrophthora</i>	fruto	Belmonte, BA
20	<i>P. citrophthora</i>	fruto	Faz. Oriente, Uruçuca, BA
21	<i>P. citrophthora</i>	fruto	Belmonte, BA
22	<i>P. citrophthora</i>	fruto	Lagoa Pequena, Uruçuca, BA

desproteíntização, adicionando-se 600 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Em seguida, as amostras foram agitadas, por suaves inversões, por 10 min e centrifugadas a 4 °C, a 18.845 g, por 10 min. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para novos tubos de 1,5 ml e o processo de desproteíntização foi repetido.

Para a precipitação do DNA, foi adicionado ao sobrenadante final 1/10 do seu volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2/3 de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a 20 °C por 2 h e, em seguida, centrifugados como anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% (v/v) e seco à temperatura ambiente. Posteriormente, os ácidos nucleicos totais foram ressuspensos em 150 µl de água contendo RNase na concentração de 40 g/ml e colocados em banho-maria a 37 °C para a completa ressuspensão.

A quantidade do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm. A relação A260/A280 foi utilizada para avaliar a pureza do DNA. Bandas de DNA genômico total separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% foram usadas como indicadoras da integridade do DNA extraído.

Amostras de DNA de cada isolado foram amplificadas

pela técnica de RAPD (Williams *et al.*, 1990). As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 µl, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 100 µM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM de um “primer” (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 30 ng de DNA. Foram utilizados os “primers” decâmeros OPH-18, OPA-13, OPI-12, OPA-19, OPE-19, OPE-14 e OPH-20 para obtenção dos marcadores RAPD. As amplificações foram efetuadas em termociclador M.J.Research PTC-100, programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência: 94 °C por 15 s, 35 °C por 30 s e 72 °C por 90 s. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 7 min a 72 °C e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C. Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 µl de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%), glicerol (60%) em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, 4 h, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram calculadas distâncias genéticas baseadas no complemento do coeficiente de similaridade (D) de Nei & Li, utilizando-se o Programa Genes (Cruz, 1997). A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar uma análise de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando o programa estatístico SPSS (Norusis, 1993). O método do centróide foi utilizado como critério de agrupamento.

Os sete “primers” decâmeros utilizados geraram um total de 191 marcadores RAPD, sendo uma média de 27,3 por “primer”. Não foi observada nenhuma banda monomórfica para as três espécies. A Figura 1 mostra o padrão de amplificação de amostras de DNA dos 22 isolados de *Phytophthora* spp. obtidos com o uso do primer OPA-13. Verificou-se uma diferenciação visual clara dos isolados das três espécies analisadas neste

trabalho. Esta mesma observação foi feita por Sackey *et al.* (1999) que estudaram a diferenciação de nove isolados de *P. megakarya* e dez de *P. palmivora* com base em marcadores RAPD. Diferenciações entre espécies de *Phytophthora* spp. com base em polimorfismos do DNA também foram verificadas por outros autores (Crawford *et al.*, 1996; Cooke & Duncan, 1997).

As distâncias genéticas entre isolados da mesma espécie foram muito inferiores àquelas obtidas entre isolados de espécies diferentes. Dentro da espécie *P. capsici* as distâncias genéticas variaram entre 0,029 a 0,192. Esta variação foi de 0,028 a 0,113 dentro da espécie *P. palmivora* e de 0,008 a 0,152 dentro da espécie *P. citrophthora*. As distâncias genéticas entre isolados de espécies diferentes variaram de 0,881 a 0,982. Estes resultados mostram que os marcadores RAPD permitiram não apenas uma diferenciação clara dos isolados pertencentes a diferentes espécies, como também estudar a diversidade de isolados dentro da mesma espécie. Esta potencialidade dos marcadores RAPD também foi relatada por Sackey *et al.* (1999).

A espécie *P. capsici* foi a que apresentou maior diversidade entre os isolados, observada pela maior variação das distâncias genéticas. Segundo levantamentos realizados entre 1977 e 1981, *P. capsici* é a espécie predominante na Bahia e no Espírito Santo (Luz *et al.*, 1997), o que pode explicar a maior diversidade genética observada. *Phytophthora palmivora* e *P. citrophthora* também apresentaram diversidade intra-específica. Luz *et al.* (1997) mostraram uma tendência de crescimento das populações de *P. palmivora* e *P. citrophthora*, especialmente em áreas consideradas foco da doença no Estado da Bahia. Luz & Silva (2001) alertam que este aumento dessas populações, aliado à maior habilidade demonstrada por estas duas espécies em sobreviver no solo, especialmente associadas à infecção de radículas do cacaueteiro, do que a apresentada por *P. capsici*, podem alterar o equilíbrio populacional (Lawrence *et al.*, 1990), sendo preocupante para a economia da cultura do cacaueteiro.

A análise de agrupamento (Figura 2) evidencia a formação clara de três grupos, correspondendo às três espécies em estudo. A maior diversidade entre os isolados de *P. capsici*

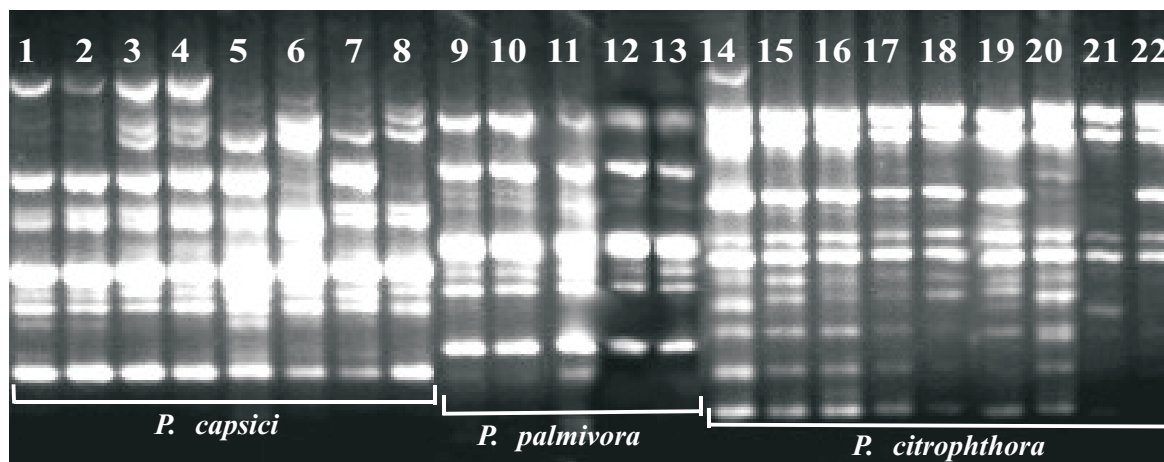


FIG. 1 - Produtos de amplificação de DNA genômico de 22 isolados de *Phytophthora* spp. (1 a 8 *Phytophthora capsici*, 9 a 13 *P. palmivora*, 14 a 22 *P. citrophthora*) utilizando o primer decâmero OPA-13.

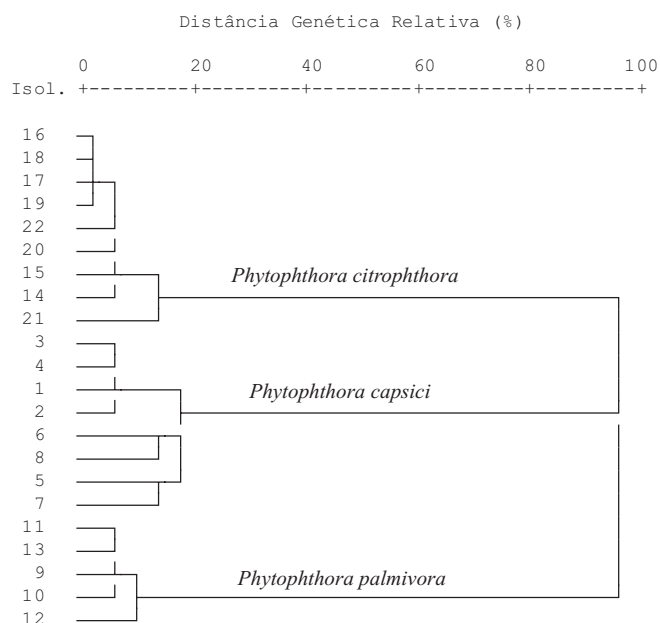


FIG. 2 - Análise de agrupamento de 22 isolados de *Phytophthora* spp. baseada na matriz de distâncias genéticas, pelo método do centróide. Foram utilizados para o cálculo das distâncias genéticas 191 marcadores RAPD.

também pode ser verificada (Figura 2). Os dados do dendrograma também sugerem uma independência entre as três espécies estudadas, ou seja, não existe uma espécie mais próxima geneticamente de outra. Isto, contudo, deve ser melhor avaliado com o uso de marcadores com nível de resolução taxonômico específico e não sub-específico, como RAPD. Outro resultado visualizado no dendrograma é que isolados obtidos a partir de diferentes partes da planta de cacau e de diferentes locais de coleta não se distinguiram dos demais isolados da mesma espécie.

A diferenciação clara dos isolados pertencentes às três espécies de *Phytophthora* spp. por meio de várias bandas “diagnósticas” (Figura 1) indica o potencial dos marcadores RAPD como uma ferramenta auxiliar na classificação dos isolados e também em estudos de diversidade genética intra-específica. Tais estudos têm grande importância na compreensão da patogenicidade e virulência do fungo causador da podridão parda, o que deve ser considerado no melhoramento genético do cacau visando resistência a esta importante doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARTER, D.A., ARCHER, S.A. & BUCK, K.W. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans*. *Mycological Research* 94:1123-1128. 1990.

CERQUEIRA, A.O., LUZ, E.D.M.N. & ROCHA, C.S.S. Caracterização morfológica e biométrica de alguns isolados de *Phytophthora* spp. da micoteca do Centro de Pesquisas do Cacau. *Fitopatologia Brasileira* 24:114-119. 1999.

COOKE, D.E.L. & DUNCAN, M.J. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of ribosomal RNA gene repeat. *Mycological Research* 101:667-677. 1997.

CRAWFORD, A.R., BASSAM, B.J., DRENTH, A., MACLEAN, D.J. & IRWIN, J.A. Evolutionary relationships among *Phytophthora* species deduced from rDNA sequence analysis. *Mycological Research* 100:437-443. 1996.

CRUZ, C.D. Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG, UFV. 1997.

GOODWIN P.H., KIRKPATRICK, B.C. & DUNIWAY, J.M. Cloned DNA probes for the identification of *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology* 79:716-721. 1989.

LAWRENCE, J.S., CAMPÊLO, A.M.F.L. & FIGUEIREDO, J.M. Enfermidades do cacau. I- Doenças fúngicas que ocorrem nos frutos. *Agrotropica* 2:121-136. 1990.

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

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

LUZ, E.D.M.N., BEZERRA, J.L., RESENDE, M.L.V. & OLIVEIRA, M.L. Cacau (*Theobroma cacao* L.) Controle de doenças. In: Ribeiro do Vale, F.X. & Zambolim, L. (Eds.). *Controle de doenças de plantas grandes culturas*. Viçosa, UFV, 2v. 1997. pp.617-622.

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

NORUSIS, M. J. SPSS, SPSS for Windows, Advanced Statistics, Release 6.0. Chicago, SPSS Inc. 1993.

PANABIÈRES, F., MARAIS, A., TRENTIN, F., BONNET, P. & RICCI, P. Repetitive DNA polymorphism analysis as a tool for identifying *Phytophthora* species. *Phytopathology* 79:1105-1109. 1989.

SAKEY, S.T., AKROFI, A.Y., ASANTE APPIAH, A. & OPOKU, I.Y. *Phytophthora* species differentiation by analysis of randomly amplified polymorphic DNAs. In: *Proceeding of the 12th International Cocoa Research Conference*. Salvador, 1996. 1999. pp.107-112.

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

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

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535. 1990.