

Uso de Marcadores RAPD na Classificação de Isolados de *Phytophthora* spp. Causadores da Podridão Parda do Cacaueiro no Brasil

Fábio G. Faleiro**^{1,3}, Edna Dora M.N. Luz***², Ademildes O. Cerqueira² & Cenilda S.S. Rocha²

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 04/12/2002)

Autor para correspondência: Fabio G. Faleiro

FALEIRO, F.G., LUZ, E.D.M.N., CERQUEIRA, A.O. & ROCHA, C.S.S. Uso de marcadores RAPD na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. causadores da podridão parda do cacaueiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 28:312-315. 2003.

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho propor uma metodologia para a utilização de marcadores RAPD como uma ferramenta auxiliar na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. causadores da podridão-parda do cacaueiro (*Theobroma cacao*) no Brasil. Existe uma necessidade constante de monitorar populações de *Phytophthora* spp. nas regiões cacaueiras do Brasil e a tarefa de classificação dos isolados é difícil e demorada. Com base em estudos de diversidade genética de isolados de *Phytophthora capsici*, *P. palmivora* e *P. citrophthora* por meio de marcadores RAPD, foram escolhidos três isolados de cada espécie como padrões e dois "primers" decâmeros mais informativos na

diferenciação das espécies (OPA 13 e OPH 18). O DNA genômico dos isolados padrões e de três isolados não classificados foi extraído e amplificado, utilizando-se os dois "primers" decâmeros mais informativos. Os padrões de marcadores RAPD obtidos permitiram uma diferenciação visual clara dos isolados de cada espécie e mostraram-se úteis na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. A metodologia proposta já está sendo utilizada no Centro de Pesquisas do Cacau, solucionando eventuais dúvidas resultantes da caracterização morfológica dos isolados.

Palavras-chave adicionais: *Phytophthora capsici*, *P. palmivora*, *P. citrophthora* e *Theobroma cacao*.

ABSTRACT

Use of RAPD markers for the classification of *Phytophthora* spp. isolates causing cacao black pod disease in Brazil

This work proposes the use of RAPD markers as an auxiliary tool for the classification of *Phytophthora* spp. isolates, causal agents of black pod, an important disease of cacao (*Theobroma cacao*) in Brazil. The monitoring of *Phytophthora* spp. populations in the cacao growing areas of Brazil requires constant identification of isolates, which is a time consuming task. Based on genetic diversity studies of isolates of *P. capsici*, *P. Citrophthora*, and *P. palmivora* using RAPD markers, three standard isolates of each species were selected.

The two most informative decamer-primers for differentiation of species (OPA 13 and OPH 18) were also selected. The genomic DNA of the three standard isolates of each species and of three unknown isolates were extracted and amplified using the selected decamer-primers. The RAPD markers obtained allowed the differentiation of isolates of each species and were a useful auxiliary tool for the classification of *Phytophthora* spp. isolates. The methodology proposed has been used at the Cocoa Research Center, solving eventual doubts resulting from the morphological characterization of isolates.

A podridão-parda ou podridão-de-*Phytophthora* é a principal doença do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.), considerando a sua ocorrência em todos os países produtores. No Brasil, em condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, esta pode causar perdas na produção de até 80% (Luz *et al.*, 1997). *Phytophthora capsici* Leonian, segundo levantamentos realizados entre 1977 e 1981, é a espécie predominante na Bahia e no Espírito Santo (Campêlo & Luz, 1981). Entretanto, levantamentos posteriores mostraram tendência de crescimento das populações de *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butler e *P. citrophthora* (Smith and Smith) Leonian, especialmente nas áreas foco da doença no Estado

da Bahia (Luz *et al.*, 1997). A espécie *Phytophthora hevea* Thompson também foi relatada na Bahia, mas é considerada como de patogenicidade moderada ao cacaueiro. Considerando-se diferentes aspectos relacionados ao controle da doença, o monitoramento das populações de *Phytophthora* spp. nas regiões cacaueiras do Brasil é de extrema importância e precisa ser feita constantemente.

Para o monitoramento de populações de fitopatógenos, a existência de caracteres ou marcadores precisos e de fácil detecção são essenciais. A taxonomia e identificação de espécies de fungos fitopatogênicos é usualmente baseada em caracteres morfológicos. Em muitos gêneros, incluindo *Phytophthora*, tais caracteres são de difícil observação em populações naturais, além de, muitas vezes, serem afetados pelo ambiente. Muitos caracteres morfológicos são também

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

** Bolsista do IBECAU

***Bolsista do CNPq

comuns entre diferentes espécies e sofrem modificações de acordo com o meio de cultura, idade das colônias, condições de incubação, entre outros fatores, o que pode trazer problemas para a correta identificação e classificação de isolados (Erwin, 1983; Waterhouse *et al.*, 1983; Cerqueira *et al.*, 1999).

Espécies fitopatogênicas do gênero *Phytophthora* apresentam alta variabilidade inter e intra-específica, tornando a classificação das mesmas uma tarefa difícil (Cerqueira *et al.*, 1999). Diversos critérios têm sido adotados na sistemática do gênero, predominando as características morfológicas e biométricas preconizadas pelas chaves de Waterhouse (1963), Newhook *et al.* (1978) e Stamps *et al.* (1990). Muitas vezes, tais características são insuficientes para a classificação, 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).

Marcadores genéticos baseados em polimorfismos do DNA têm sido utilizados com sucesso na diferenciação de espécies do gênero *Phytophthora* (Panabieres *et al.*, 1989; Goodwin *et al.*, 1989; Crawford *et al.*, 1996; Cooke & Duncan, 1997; Sackey *et al.*, 1999). Entre as vantagens destes marcadores estão a menor ambigüidade, a detecção rápida e precisa, a confiabilidade e o fato de não serem influenciados pelas condições ambientais (Goodwin *et al.*, 1989).

Nesse trabalho, propõe-se uma metodologia para a utilização de marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) na classificação de isolados de *Phytophthora* spp. causadores da podridão-parda do cacauero no Brasil. A metodologia proposta está fundamentada no trabalho realizado por Cerqueira *et al.* (2002) que utilizaram marcadores RAPD para analisar a diversidade genética de 22 isolados de *P. capsici*, *P. palmivora* e *P. citrophthora*. Neste trabalho, foram utilizados sete "primers" decâmeros que geraram 191 marcadores RAPD, os quais permitiram diferenciar os isolados de cada espécie. A partir da análise dos dados deste trabalho foram escolhidos os dois "primers" mais informativos e com padrão de bandas mais nítido e reprodutível. Também foram selecionados três isolados de cada espécie do gênero *Phytophthora* para serem utilizados como padrões.

Massa micelial de cada um dos isolados padrões e de mais três isolados de cada espécie foi produzida em placas de Petri contendo o meio batata-dextrose líquido. O DNA genômico de cada isolado foi extraído a partir de, aproximadamente, 250 mg de massa micelial, utilizando-se o método do SDS com algumas modificações: o micélio foi macerado em cadinho de porcelana em contato com N₂ líquido. Em seguida, o macerado foi colocado em um tubo plástico de 1,5 ml, ao qual foram adicionados 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 mantidos em banho-maria (70 °C) por 1 h, sendo agitados, a cada 10 min. Após a incubação, foi realizada a 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 18845 g, por 10 min. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos de 1,5 ml limpos 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 3M, pH 5,2 e 2/3 de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a -20 °C por 2 h e, a seguir, centrifugados como anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 70% (v/v) e seco à temperatura ambiente. Posteriormente, os ácidos nucléicos totais foram ressuspendidos em 150 µl de água contendo RNase na concentração de 40 µg/ml e colocados em banho-maria a 37 °C para a completa ressusensão. Após esse período, o DNA foi novamente precipitado, centrifugado e ressuspendido em 100 µl de água, como já descrito.

A quantidade do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm e 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. Após esse processo, as amostras de DNA foram diluídas para 10 ng/µl.

Amostras de DNA de cada isolado foram amplificadas pela técnica de RAPD. 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. Os "primers" decâmeros OPH-18, OPA-13, OPI-12, OPA-19, OPE-19, OPE-14 e OPH-20, selecionados e utilizados por Cerqueira *et al.* (2002), foram reutilizados neste trabalho para obtenção dos marcadores RAPD. As amplificações foram efetuadas em termociclador, programado para 40 ciclos, constituídos pela seguinte seqüência: 15 s a 94 °C, 30 s a 35 °C e 90 s a 72 °C. 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% e 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. Por fim, o padrão de amplificação gerado com a utilização de cada "primer" decâmero foi analisado.

Verificou-se que os padrões de amplificação gerados pelos "primers" decâmeros OPA13 e OPH18 foram os mais informativos, apresentando bandas nítidas e reprodutíveis. A utilização de apenas um desses "primers" já seria suficiente para a diferenciação dos isolados de cada espécie de *Phytophthora* (Figura 1). Os dois "primers" permitiram uma diferenciação visual clara dos isolados de *P. capsici*, *P.*

palmivora e *P. citrophthora*. Isolados de *P. megakarya* e *P. palmivora* também puderam ser diferenciados com marcadores RAPD (Sackey *et al.*, 1999). Diferenciações entre outras espécies do gênero *Phytophthora* com base em polimorfismos do DNA também são relatadas por outros autores (Crawford *et al.*, 1996; Cooke & Duncan, 1997).

O padrão de bandas permitiu a associação de isolados de classificação desconhecida aos isolados padrões (Figura 1). Esta associação foi possível devido a grandes diferenças inter-específicas dos isolados. Diferenças intra-específicas também podem ser verificadas pelas bandas polimórficas de

DNA entre isolados da mesma espécie (Figura 1). Cerqueira *et al.* (2002) mostraram que as diferenças inter-específicas são muito maiores que as diferenças intra-específicas o que permite a diferenciação clara dos isolados de cada espécie do gênero *Phytophthora* com base nos marcadores RAPD.

Estudos morfológicos complementares realizados com os três isolados de classificação desconhecida em meios de cenoura-agar e caldo de cenoura comprovaram a classificação obtida com os marcadores RAPD. Tais estudos foram baseados na forma, caducidade dos esporângios, tamanho do pedicelo e presença/ausência de clamidósporos.

A metodologia proposta neste trabalho de utilização de marcadores RAPD para a diferenciação de isolados de *Phytophthora* spp. vêm sendo utilizada no Centro de Pesquisas do Cacau como uma ferramenta auxiliar na classificação dos isolados, solucionando eventuais dúvidas na interpretação de diferenças e similaridades morfológicas dos isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMPÊLO, A.M.F.L. & LUZ, E.D.M.N. Etiologia da podridão parda do cacau no Estado da Bahia e Espírito Santo, Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 6:313-321. 1981.

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.

ERWIN, D.C. Variability within and among species of *Phytophthora*. In: Erwin, D.C., Bartnic-Garcia, S. & Tsao P.H. (Eds.) *Phytophthora*, its biology, taxonomy, ecology and pathology. St. Paul, Minnesota, American Phytopathological Society. 1983. pp.149-165.

CERQUEIRA, A.O., FALEIRO, F.G., LUZ, E.D.M.N., ROCHA, C.S.S., DANTAS NETO, A., FLORES, A.B., BAHIA, R.C.S., FALEIRO, A.S.G. Diversidade genética de *Phytophthora capsici*, *P. palmivora* e *P. citrophthora* isoladas do cacau com base em marcadores RAPD. *Fitopatologia Brasileira* 27:S94. 2002. (Resumo).

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

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

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.

PANABIÈRES, F., MARAIS, A., TRENTIN, F., BONNET, P. &

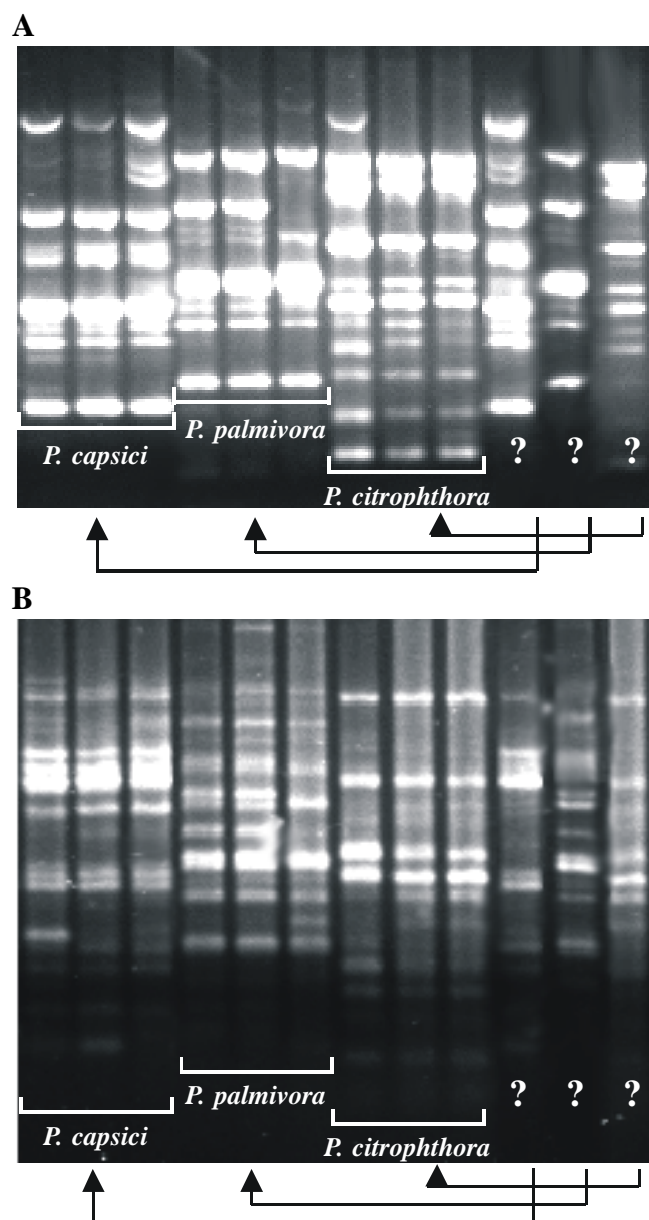


FIG.1 - Produtos de amplificação de DNA genômico de três isolados de *Phytophthora capsici* (1-3), três isolados de *P. palmivora* (4-6), três isolados de *P. citrophthora* (7-9) e três isolados de espécie desconhecida (10-12). A amplificação foi realizada utilizando-se o “primer” decâmico OPA-13 (A) e OPH-18 (B) para obtenção de marcadores RAPD.

RICCI, P. Repetitive DNA polymorphism analysis as a tool for identifying *Phytophthora* species. *Phytopathology* 79:1105-1109. 1989.

SACKEY, S.T., AKROFI, A.Y., ASANTE APPIAH, A. & OPOKU, I.Y. *Phytophthora* species differentiation by analysis of randomly amplified polymorphic DNAs. 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. 80 p. Mycological Papers 92. 1963.

WATERHOUSE, G.M., NEWHOOK, F.J. & STAMPS, D.J. Present criteria for classification of *Phytophthora* In: Erwin, D.C., Bartnic-Garcia, S. & Tsao P.H. (Eds.) *Phytophthora*, its biology, taxonomy, ecology and pathology. St. Paul, Minnesota, American Phytopathological Society. pp.139-147. 1983.