

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



ANÁLISE DE DIVERSIDADE E TAXONOMIA DE ISOLADOS DE
***Phytophthora capsici* OBTIDOS DE HOSPEDEIROS TROPICAIS E**
TEMPERADOS

ADEMILDE DE OLIVEIRA CERQUEIRA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Julho de 2005

ADEMILDE DE OLIVEIRA CERQUEIRA

ANÁLISE DE DIVERSIDADE E TAXONOMIA DE ISOLADOS DE *Phytophthora capsici* OBTIDOS DE HOSPEDEIROS TROPICAIS E TEMPERADOS

**Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.**

ADEMILDE DE OLIVEIRA CERQUEIRA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Julho de 2005

ADEMILDE DE OLIVEIRA CERQUEIRA

ANÁLISE DA DIVERSIDADE E TAXONOMIA DE ISOLADOS DE *Phytophthora capsici* OBTIDOS DE HOSPEDEIROS TROPICAIS E TEMPERADOS

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 25 de julho de 2005

Dr. Eduardo S. G. Mizubuti
UFV

Dr. Jorge Teodoro de Souza
CEPLAC/Master *Foods* USA

Dra. Edna Dora Martins Newman Luz
UESC – Orientador

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Soares Cerqueira e Lindinalva de Oliveira Cerqueira, pelo amor, ensinamentos e lições de vida, dedico.

A meu noivo Carlos Eduardo Nascimento e a minha orientadora Edna Dora M. N. Luz grandes incentivadores desta vitória em mais uma etapa de minha vida, a minha eterna admiração e o meu profundo agradecimento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que com suas bênçãos de amor nos manteve forte, perseverante e otimista nessa caminhada, iluminando nossos passos para que pudéssemos cumprir esta jornada.

A Dra. Edna Dora M.N. Luz, a minha “mãe” na ciência, minha orientadora, que acreditou e confiou no meu trabalho, ensinando-me o caminho por onde deveria andar, cuidando de mim como uma verdadeira filha.

Ao Dr. Jorge Teodoro de Souza, pelo grande apoio e brilhante ajuda nos trabalhos e análises moleculares, otimismo, companheirismo, disposição, disponibilidade e amizade.

Ao Prof^o Dr. Leandro Lopes Loguercio pela co-orientação, pelas excelentes sugestões nas análises moleculares e nos artigos, amizade, companheirismo, mensagens de otimismo, constante disponibilidade e boa vontade.

Ao Dr. José Luiz Bezerra membro do comitê de orientação pelo otimismo, incentivo, disponibilidade, apoio e pelas revisões nesta dissertação.

Aos professores do programa de Genética e Biologia Molecular pela dedicação, ensinamentos e competência no exercício da docência.

As minhas colegas e amigas Márcia Cristina e Valéria Paim, pelo companheirismo, cumplicidade e otimismo para vencermos juntas essa jornada.

Aos pesquisadores Karina Gramacho, Stela Dalva e Dr. Milton Macoto pelas preciosas sugestões, amizade e credibilidade em mim depositada.

Ao Dr. Humberto Zaidan e ao doutorando Ricardo Franco, pela alegria, auxílio nas dúvidas, dicas e constante colaboração.

A Magnaldo Nascimento, Joel Feitoza, e aos operários de campo da Seção de Fitopatologia do CEPEC pelo fornecimento de matérias para os testes de patogenicidade utilizados neste trabalho.

A Cenilda S.S. Rocha, laboratorista responsável pela micoteca de *Phytophthora* do CEPEC, pelos primeiros e constantes ensinamentos no laboratório de Fitopatologia, disposição, disponibilidade e auxílio nos trabalhos morfobiométricos.

Aos parceiros e amigos do Laboratório de Fitopatologia: Denise, Tita, Lourdinha, Marcos Vinícius e Virginia que com seu dinamismo, presteza, disponibilidade e otimismo para ajudar nos trabalhos, contribuíram para que esse sonho se concretizasse.

Ao CFC/ICCO pelo projeto Biomol através do qual foi montado o Laboratório de Biologia Molecular, no qual trabalhamos.

A equipe do laboratório de Biologia Molecular: Acassí Flores, Brena Farias, Cássia Bahia e Reinaldo Figueiredo pela concessão do espaço e apoio.

Ao World Cacao Foundation (WCF) por financiar projeto sob a coordenação de Dra. Edna Dora Martins Newman Luz que proveu as despesas de grande parte dos recursos utilizados nesta pesquisa.

A Fundação Pau Brasil (CEPLAC) e a Nádima Ottoni pela presteza na compra e entrega dos suprimentos utilizados nesta pesquisa.

A Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) onde comecei e sempre desenvolvi meus trabalhos de pesquisa, concedendo-me espaço para o meu desenvolvimento profissional e pessoal e a todos que contribuíram direta ou indiretamente de alguma forma para realização deste projeto.

INDICE

EXTRATO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. O gênero <i>Phytophthora</i> e as dificuldades taxonômicas	4
2.2. As espécies <i>Phytophthora capsici</i> e <i>Phytophthora tropicalis</i>	5
2.3. Estudos moleculares	11
2.4. Identificação de novos hospedeiros.....	14
3. CAPÍTULO 1	
OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Phytophthora capsici</i> como patógeno de <i>Artocarpus altilis</i> (Parks) Fosberg NA BAHIA, BRASIL.....	15
RESUMO	15
ABSTRACT	16
3.1. INTRODUÇÃO.....	16
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.2.1. Coleta e isolamento.....	18
3.2.2. Caracterização morfológica.....	18
3.2.3. Determinação do tipo de compatibilidade.....	19
3.2.4. Extração do DNA.....	19
3.2.5. Sequenciamento da região ITS, dos genes β -tubulina e fator de transcrição e alongação 1- α	20
3.2.6. Testes de patogenicidade	21
3.3. RESULTADOS.....	22

3.3.1. Caracterização morfológica.....	22
3.3.2. Testes de compatibilidade.....	22
3.3.3. Sequenciamento da região ITS, dos genes β -tubulina e fator de transcrição e elongação 1- α	22
3.3.4. Testes de patogenicidade	23
3.4. DISCUSSÃO	25
3.5. AGRADECIMENTOS	27
3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
4. CAPÍTULO 2	
EVIDÊNCIAS DA INVALIDADE DA ESPÉCIE <i>Phytophthora tropicalis</i>.....	32
RESUMO.	32
ABSTRACT.....	33
4.1. INTRODUÇÃO.....	34
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.2.1. Isolados	36
4.2.2. Extração de DNA.....	36
4.2.3. Análise de RAPD.....	39
4.2.4. Caracterização morfobiométrica.....	40
4.2.5. Determinação do tipo de compatibilidade.....	40
4.2.6. Crescimento micelial a 35 °C.....	41
4.2.7. Testes de patogenicidade.....	41
4.2.8. Sequenciamento e análise filogenética.....	42
4.3. RESULTADOS.....	43
4.3.1. RAPD.....	43
4.3.2. Testes de patogenicidade.....	44
4.3.3. Crescimento micelial a 35 °C.....	50
4.3.4. Caracterização morfobiométrica.....	51
4.3.5. Determinação do tipo de compatibilidade.....	51
4.3.6. Combinação dos dados morfológicos, fisiológicos e de patogenicidade.....	53
4.3.7. Análise da diversidade e filogenia com base no sequenciamento de três genes nucleares.....	54

4.3.8. Análise de sequências ITS do rDNA.....	54
4.3.9. Análise de sequências do fator de transcrição e elongação 1- α	54
4.3.10. Análise de sequências de β -tubulina.....	58
4.3.11. Análise combinada de sequências da região ITS, fator de transcrição e elongação 1- α e β -tubulina.....	61
4.3.12. Análise de sequências da região ITS entre alguns isolados em estudo e isolados dos bancos de dados.....	64
4.4. DISCUSSÃO.....	66
4.5. AGRADECIMENTOS.....	71
4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
5. CONCLUSÕES GERAIS	78
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES.....	79