



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Métodos Moleculares na Identificação,
Caracterização e Detecção de
Phytophthora cambivora (Petri) Buisman
e *Phytophthora cinnamomi* Rands
Associadas com a Doença
da Tinta do Castanheiro**

Maria Eugénia Madureira Gouveia

Vila Real, 2004

Este trabalho foi expressamente elaborado com vista à obtenção do grau de Doutor em Ciências Agrónómicas/Protecção de Plantas, de acordo com o Decreto-Lei nº 216/92 de 13 de Outubro

Este trabalho foi financiado pelo Programa PRODEP (Acção 5.3/2000) e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através da Bolsa de Investigação SFRH/BD/1474/2000

Agradecimentos

Ao Professor Catedrático Carlos Gomes Abreu por ter aceite a orientação deste trabalho pela amizade estímulo e interesse sempre demonstrado.

Ao Professor Catedrático Enrique Monte da Universidade de Salamanca pelo empenhamento, disponibilidade e apoio sempre dispensados.

Ao Doutor Altino Choupina quero expressar a minha gratidão por ter sido o supervisor de todo o trabalho laboratorial, por todo o interesse e apoio.

À Doutora Rosa Hermosa da Universidade de Salamanca pela ajuda desinteressada, gentileza e inestimável ajuda em todas as tarefas que foi necessário realizar no Departamento de Microbiologia e Genética da Universidade de Salamanca.

Ao Engenheiro Valentim Coelho pelo imenso trabalho e apoio em todas as fases da realização deste trabalho, pela amizade e compreensão para com as minhas idiossincrasias.

Ao Engenheiro Miguel Pinto pela sua participação activa na concretização da PCR-Diagnóstico, amizade e apoio sempre manifestado.

À D. Isabel Fernandes e Susete Coutinho pelo apoio na manutenção dos isolados de *Phytophthora* e no demais trabalho laboratorial, pela amizade, compreensão e ajuda.

A todos os meus amigos que sempre estiveram nos momentos e decisões difíceis.

Ao Instituto Politécnico de Bragança e Escola Superior Agrária pela minha inclusão no Programa PRODEP que possibilitou a dispensa do serviço docente.

Aos Laboratórios do departamento de Biologia da Escola Superior Agrária pela disponibilização do equipamento e apoio prestado.

Ao Departamento de Microbiologia e Genética da Universidade de Salamanca pelas facilidades concedidas na formação técnica e científica, na utilização de equipamentos e sequenciação do DNA.

Um agradecimento muito especial para a Maria Eduarda, minha filha que, ainda sem compreender muito bem, assumiu este trabalho como importante.

A toda a minha família e em especial para a minha mãe que deve ter compreendido as minhas ausências, ou talvez não se lembre de nada, mas sei que ficará muito feliz.

Abreviaturas

AFLP Amplified Fragment Length Polymorphisms

CAC *Conformitas Agraria Communitatis*

CTAB Cetyltrimethylammonium Bromide

DNA Ácido desoxirribonucleico

dNTPs Desoxirribonucleótidos trifosfato

EMBL Base de dados do European Molecular Biology Laboratory

IGS Intergenic Spacer

IPTG 1-isopropil- β -D-tiogalactopiranósido

ITS Internal Transcribed Spacer

Kb kilobases

LSU Large Subunit

OD Densidade óptica

OEPP Organização Europeia e Mediterrânica de Protecção das Plantas

pb ou **bp** Pares de bases

PCR Polimerase Chain Reaction

RAMS Random Amplified Microsatellites

RAPD Random Amplified Polymorphic DNA

REA Restriction Enzyme Analysis

RFLP Restriction Fragment Length Polymorphisms

rpm Rotações por minuto

SCAR Sequence Characterised Amplified Regions

SDS Dodecil sulfato de sódio

SSC Cloreto de sódio, citrato de sódio

SSR Simple Sequence Repeats

SSU Small Subunit

UV Ultra violeta

v/v volume/volume

X-Gal 5-bromo-4-cloro-3-indol D galactósido

RESUMO

Um total de 49 isolados de *Phytophthora* spp. associados com a doença da tinta do castanheiro foram obtidos, pelos métodos clássicos de isolamento, em diferentes situações de crescimento do castanheiro na região Norte de Portugal: viveiros, plantações jovens, soutos adultos e do solo. Os isolados de *Phytophthora* foram identificados por PCR-RFLP da região ITS-rDNA amplificada pelos “primers” universais ITS6 (Cooke & Duncan, 1997) e ITS4 (White *et al.*, 1990). A restrição enzimática do fragmento amplificado foi realizada com as enzimas *Alu* I, *Msp* I e *Taq* I cujo perfil de restrição permite a identificação ao nível da espécie no género *Phytophthora*. A população de *Phytophthora* associada com a doença da tinta foi caracterizada quanto ao tipo de compatibilidade sexual, polimorfismo RAPD e sensibilidade ao metalaxil.

P. cinnamomi é a espécie predominante em viveiro, plantações jovens, soutos adultos e no solo junto das plantas mortas. Apenas quatro isolados foram identificados como *P. cambivora* e dois deles foram obtidos em plantas de castanheiro com sintomas característicos da doença no colo da planta. Todos os isolados (*P. cambivora* e *P. cinnamomi*) são A2 e 9 % dos isolados de *P. cinnamomi* evidenciaram sensibilidade reduzida ao metalaxil. A caracterização RAPD permitiu a separação das espécies de *Phytophthora* associadas à doença da tinta embora os primers “10-mer” utilizados não tivessem possibilitado a caracterização dos isolados de *P. cinnamomi*. O estudo RAPD permitiu, no entanto, identificar um fragmento de amplificação característico de *P. cinnamomi*. O fragmento foi purificado clonado e sequenciado (SCAR) e desenharam-se primers específicos (Cin1, Cin2 e Cin3) para a detecção e identificação de *P. cinnamomi* por PCR. Os primers utilizados na combinação Cin2/Cin1 e Cin3/Cin1 proporcionam um produto de amplificação PCR com aproximadamente 650 pb. Com esta metodologia de diagnóstico não se detectaram reacções cruzadas com as espécies de *P. cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi* var. *parvispora*, *P. citricola*, *P. cryptogea*, *P. nicotianae*, *P. quercina*, *P. syringae* e ainda com *Cryphonectria parasitica*, *Pythium* sp. e *Castanea sativa*. O método PCR-Diagnóstico foi aplicado com sucesso, em raízes de castanheiro, que cresceram em substrato inoculado com *P. cinnamomi*, em tecidos vegetais (folhas de castanheiro) e na água da técnica armadilha de detecção de *Phytophthora* no solo.

PALAVRAS-CHAVE: Doença da tinta do castanheiro, *Phytophthora cinnamomi*, *P. cambivora*, PCR-Diagnóstico.

ABSTRACT

A total of 49 isolates of *Phytophthora* spp. associated with ink disease of chestnut were obtained by classical methods from diverse chestnut growing regions of the north of Portugal: nurseries, young and old chestnut groves, and also in the soil near dead plants of sweet chestnuts. *Phytophthora* isolates were identified by PCR-RFLP of ITS-rDNA amplified by the universal primer pair ITS6 (Cooke & Duncan, 1997) and ITS4 (White *et al.*, 1990). Restriction digestions of the amplified DNA product were performed with restriction enzymes *Alu* I, *Msp* I, and *Taq* I, which allowed individual species identification. The population of *Phytophthora* was characterised in terms of mating type, metalaxil resistance and RAPD polymorphisms.

P. cinnamomi is the most prevalent species in nurseries, orchards and in soil of chestnut groves. Only four isolates were identified as *P. cambivora* and two of them were obtained from typical rot crown of chestnut. All the isolates (*P. cambivora* and *P. cinnamomi*) were mating type A2 and 9 % of *P. cinnamomi* were metalaxil tolerant. Although RAPD polymorphisms allowed species differentiation the “10-mer” primers used were not suitable for *P. cinnamomi* characterization. The RAPD analyses allowed, however, the identification of a fragment characteristic of *P. cinnamomi*. The fragment was purified, cloned and sequenced (SCAR) and then species-specific primers were designed (Cin1, Cin2, and Cin3) for detection and identification of *P. cinnamomi* by PCR. Each primer pairs Cin2/Cin1 and Cin3/Cin1 produced an amplicon of approximately 650 bp from all tested *P. cinnamomi* isolates. Both primer pairs revealed no undesirable cross-reaction with a diverse range of *Phytophthora* species (*P. cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi* var *parvispora*, *P. citricola*, *P. cryptogea*, *P. nicotianae*, *P. quercina*, *P. syringae*), *Cryphonectria parasitica*, *Pythium* sp., and *Castanea sativa*. The PCR-Diagnostic assay based on the species-specific primers was successfully used to detect *P. cinnamomi* in roots of chestnut plants, which were grown in artificially infected substrate with this pathogen, in bait tissue (chestnut leaves) and in the water of the same bait test.

KEY WORDS – Ink disease of chestnut, *Phytophthora cambivora*, *P. cinnamomi*, PCR-Diagnostic

ÍNDICE

RESUMO.....	IX
ABSTRACT	XI
Índice	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. O GÉNERO <i>PHYTOPHTHORA</i>	5
2.1. Particularidades do Género <i>Phytophthora</i>	5
2.2. Posição Taxonómica do Género <i>Phytophthora</i>	7
2.3. Classificação Taxonómica em <i>Phytophthora</i>	11
2.4. Reprodução Sexuada em <i>Phytophthora</i>	13
2.5. <i>Phytophthora cinnamomi</i> e <i>Phytophthora cambivora</i>	16
2.6. Métodos Moleculares na Classificação e Filogenia do Género <i>Phytophthora</i>	17
2.7. Métodos Moleculares na Identificação das Espécies de <i>Phytophthora</i>	25
2.7.1. Região Genómica que Codifica para os Ribossomas (rDNA).....	26
2.7.2. Região Intergénica (IGS).....	28
2.7.3. Região Genómica que Codifica as Elicitinas.....	29
2.7.4. Regiões Genómicas Características (Sequence Characterised Amplified Regions - SCAR)	30
2.8. Caracterização Molecular das Espécies de <i>Phytophthora</i>	30
2.8.1. Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP).....	31
2.8.2. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPDs)	32
2.8.3. Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP).....	33
2.8.4. Microsatélites ou Simple Sequence Repeats (SSR)	34
2.9. Caracterização Molecular de Populações – Epidemiologia e Dispersão em <i>Phytophthora</i>	35
2.10. Métodos Moleculares Baseados na Técnica PCR – Detecção e Diagnóstico em <i>Phytophthora</i>	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1. Isolamento de <i>Phytophthora</i> spp. Associada com a Doença da Tinta do Castanheiro	45
3.2. Outros Organismos Utilizados neste Estudo	48
3.2.1. Espécies de <i>Phytophthora</i>	48
3.2.2. Outros Organismos	49
3.2.3. <i>Escherichia coli</i>	49
3.3. Vector de Clonagem	49
3.4. Formação de Oósporos “ <i>in vitro</i> ” e suas Características Morfológicas	50
3.5. DNA Genómico e Soluções de DNA	51
3.5.1. Obtenção de DNA Genómico de <i>Phytophthora</i>	51
3.5.2. Purificação de Soluções de DNA	53
3.5.3. Concentração de DNA	53
3.5.4. Quantificação de DNA	53
3.6. Identificação das Espécies de <i>Phytophthora</i> por Métodos Moleculares	54
3.6.1. Identificação por PCR-RFLP da Região ITS – rDNA.....	55
3.6.2. Identificação das Espécies de <i>Phytophthora</i> por Comparação da Sequência dos Nucleótidos da Região ITS1, 5.8S e ITS2	57
3.7. Caracterização Molecular dos Isolados de <i>Phytophthora</i> por RAPD-PCR.....	58
3.7.1. Primers “10-mer” e Condições Físicas e Químicas da Amplificação	59

3.7.2. Análise dos Perfis RAPD-PCR	59
3.8. Sensibilidade dos Isolados de <i>Phytophthora</i> spp. ao metalaxil “ <i>in vitro</i> ”	60
3.9. Marcador Molecular Específico (SCAR) para a Detecção e Identificação de <i>P. cinnamomi</i>	60
3.9.1. Clonagem do Fragmento RAPD no Plasmídeo pGEM®-T e Multiplicação em <i>E. coli</i>	60
3.9.2. Obtenção de DNA dos Plasmídios recombinantes	61
3.9.3. Sequenciação e Análise do Fragmento SCAR (OP120)	62
3.9.4. Hibridação de Ácidos Nucleícos (Técnica “Southern-blot”)	62
3.9.5. Marcação da Sonda com Digoxigenina	62
3.9.6. Hibridação do Fragmento (OP120) Marcado com Digoxigenina com DNA Genômico de Diferentes Espécies	63
3.10. Desenho de Primers	64
3.11. PCR-Diagnóstico de <i>P. cinnamomi</i> Baseada nos Primers Específicos “Cin2/Cin1” e Cin3/Cin1”	65
3.11.1. Especificidade e Sensibilidade da PCR-Diagnóstico na Detecção de <i>P. cinnamomi</i>	65
3.11.2. PCR-Diagnóstico em Plantas com Sintomas da Doença da Tinta, em Tecido Armadilha e Água do Solo (zoósporos)	66
3.12. “Nested” PCR	68
3.13. “Multiplex” PCR	69
4. RESULTADOS	71
4.1. Isolamento de <i>Phytophthora</i> spp. Associada com a Doença da Tinta do castanheiro	71
4.2. Formação de oósporos “ <i>in vitro</i> ” e suas características morfológicas	73
4.3. Identificação das Espécies de <i>Phytophthora</i> por Métodos Moleculares	76
4.3.1. Identificação por PCR-RFLP da região ITS – rDNA	76
4.3.2. Identificação das Espécies de <i>Phytophthora</i> por Comparação da Sequência dos Nucleótidos da Região ITS1, 5.8S e ITS2	85
4.4. Caracterização molecular por RAPD-PCR das espécies de <i>Phytophthora</i> associadas com a doença da tinta do castanheiro	93
4.4.1. Seleção dos primers “10-mer”	93
4.4.2. Análise do polimorfismo RAPD	94
4.5. Sensibilidade dos Isolados de <i>P. cinnamomi</i> e <i>P. cambivora</i> ao metalaxil “ <i>in vitro</i> ”	100
4.6. Marcador SCAR	103
4.6.1. Fragmento RAPD-PCR Característico de <i>P. cinnamomi</i> , Clonagem no pGEM®-T, Transformação e Multiplicação em <i>E. coli</i>	103
4.6.2. Sequência e Análise do Fragmento (OP120)	105
4.6.3. Hibridação de Ácidos Nucleícos (“Southern-blot”)	107
4.7. Desenho de Primers Específicos para a Detecção e Identificação de <i>P. cinnamomi</i>	109
4.8. PCR-Diagnóstico de <i>P. cinnamomi</i> Baseada nos Primers Específicos “Cin2/Cin1” e Cin3/Cin1”	110
4.8.1. Condições Químicas e Físicas da PCR-Diagnóstico (Culturas Puras de <i>Phytophthora</i>)	110
4.8.2. Especificidade e Sensibilidade da PCR-Diagnóstico	111
4.9. PCR-Diagnóstico em Plantas com Sintomas da Doença da Tinta, Tecidos Armadilha e Água do Solo (zoósporos)	115
4.9.1. DNA Molde	115

4.9.2. PCR-Diagnóstico em Plantas com Sintomas da Doença da Tinta.....	117
4.9.3. PCR-Diagnóstico em Tecidos Armadilha e Água do Solo (zoósporos)...	118
4.10. “Nested” PCR	120
4.11. “Multiplex” PCR	122
5. DISCUSSÃO	127
6. CONCLUSÕES	149
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153

1. INTRODUÇÃO

A doença da tinta do castanheiro, considerada como uma das principais causas do desaparecimento dos soutos, terá surgido em Portugal por volta de 1838 junto das margens do rio Lima (Fernandes, 1966). O avanço da doença foi de tal forma devastador que hoje praticamente não existem castanheiros no Minho e as áreas de ocupação regrediram em mais de 50 % em Trás-os-Montes e Beira Alta, regiões onde existem ainda as maiores manchas de castanheiro em Portugal (Marques, 1988).

O castanheiro constitui um verdadeiro património civilizacional e paisagístico que caracteriza a região do Nordeste de Portugal, sendo actualmente uma das culturas agrícolas mais rendíveis desta região.

A doença da tinta que invariavelmente provoca a morte do castanheiro é já uma doença endémica em todas as regiões castaneícolas. Na região de Trás-os-Montes várias estimativas indicam 15 % de árvores afectadas pela doença (Carvalheira, 1997; Martins *et al.*, 1997) mesmo nas regiões de maior aptidão para o castanheiro como a Terra Fria Transmontana.

Os meios de luta contra esta doença apesar dos vários métodos utilizados não têm solucionado este grave problema sanitário no castanheiro. As estratégias que assentam na utilização de material de propagação isento de propágulos dos parasitas, na utilização de variedades resistentes e nas actividades fitotécnicas que promovam o equilíbrio microbiológico do solo são consideradas as mais adequadas para travar o desenvolvimento epidémico da doença e evitar a sua dispersão para áreas cada vez mais alargadas.

Para tornar efectiva esta estratégia de luta é necessário que os métodos de diagnóstico sejam sensíveis e fiáveis e que proporcionem resultados num período de tempo que viabilizem a aplicação das medidas sanitárias adequadas. No entanto, os métodos de microbiologia clássica apresentam em *Phytophthora* uma série de limitações de natureza prática na obtenção dos isolados, dado que estes organismos reagem como procariotas a muitos dos antibióticos (Tsao, 1987; Tsao, 1990) e os métodos de rotina laboratorial conduzem na maioria das situações a resultados negativos. Uma vez obtidos os isolados, a identificação ao nível da espécie em *Phytophthora* é considerada difícil, morosa e muito laboriosa (Grente, 1961; Zentmyer 1980; Waterhouse *et al.*, 1987; Gallegly, 1987) que exige considerável conhecimento

do género e da arte para obter as estruturas morfológicas necessárias ao processo de identificação.

Os métodos moleculares aplicados em todas as áreas do estudo dos seres vivos têm contribuído para um conhecimento mais aprofundado em todas os domínios da biologia. Em filogenia e sistemática contribuíram para uma nova organização dos seres vivos ao nível da megasistemática. Os *Oomycetes*, tradicionalmente classificados como fungos, foram incluídos num novo reino que Cavalier-Smith (1986) designou *Chromista* e Dick (1995) *Stramenopila*, atribuindo assim significado às singularidades biológicas, fisiológicas, bioquímicas e de ultra estrutura celular em *Phytophthora*. Estes estudos impulsionaram a aplicação dos métodos moleculares na classificação, identificação, detecção e diagnóstico de *Phytophthora*. Os métodos moleculares de identificação de *Phytophthora* baseados na amplificação PCR da região do genoma que codifica para os ribossomas (rDNA) mais concretamente na região ITS1, 5.8S e ITS2, (Lee & Taylor, 1992; Cooke *et al.*, 1996, Cooke & Duncan, 1997; Cooke *et al.*, 2000), por serem independentes da morfologia, permitem a identificação objectiva das espécies. Esta região genómica foi utilizada com sucesso em estratégias de detecção de *Phytophthora* pelo desenho de “primers” específicos no interior desta mesma sequência de nucleótidos. A especificidade dos primers utilizados em diagnóstico foi também obtida em outras regiões genómicas como a região que codifica para as elicinas (Coelho *et al.*, 1997) e em regiões anónimas do genoma características de determinada espécie (Schubert *et al.*, 1999).

Os métodos moleculares em diagnóstico de *Phytophthora* pela especificidade, sensibilidade e rapidez na obtenção dos resultados constituem uma ferramenta fundamental para que as medidas de protecção do castanheiro baseadas nos meios preventivos sejam implementadas e verdadeiramente efectivas.

Com este trabalho pretendeu-se identificar e caracterizar por métodos moleculares as espécie de *Phytophthora* associadas com a doença da tinta do castanheiro e obter um método de diagnóstico específico e sensível baseado nas técnicas moleculares para aplicação em plantas e solo dos viveiros de castanheiro e em plantações já instaladas.

Para concretizar este propósito estabeleceram-se etapas que foram sucessivamente realizadas e permitiram atingir os objectivos específicos que a seguir se indicam:

- i) Obter isolados de *Phytophthora* associados com a doença da tinta do castanheiro, na região Norte de Portugal em diferentes situações de desenvolvimento do castanheiro: viveiros, plantações jovens e soutos.
- ii) Identificar por métodos moleculares os isolados de *Phytophthora* associados com a doença da tinta do castanheiro, ao nível da espécie.
- iii) Caracterizar a população de *Phytophthora* associada com a doença da tinta quanto ao tipo de compatibilidade sexual, sensibilidade ao metalaxil e variabilidade genética por marcadores moleculares (RAPD).
- iv) Obter um método molecular de diagnóstico baseado na técnica PCR específico para *P. cinnamomi* a utilizar em raízes de castanheiro, solo e água.
- v) Aplicar o método PCR-Diagnóstico em raízes de castanheiro que cresceram em substrato inoculado com *P. cinnamomi*, tecidos vegetais (folhas de castanheiro) e água do solo dos métodos armadilha.

2. O GÉNERO *PHYTOPHTHORA*

2.1. Particularidades do Género *Phytophthora*

“Phytophthora”, palavra de origem Grega que significa destruidor de plantas foi o epíteto escolhido, por Anton de Bary em 1876, para designar o novo género que incluía apenas o organismo responsável pelo míldio da batateira, *Phytophthora infestans*. Durante muitos anos *P. infestans* foi a única espécie deste género. O seu número não parou, entretanto, de aumentar estando incluídas no livro *Phytophthora Diseases Worldwide*, de Erwin & Ribeiro (1996) 64 unidades taxonómicas todas elas parasitas de espécies vegetais. Recentemente foram descritas novas espécies, *P. quercina* (Jung *et al.*, 1999); *P. europaea* E. M. Hansen & T. Jung sp. nov., *P. uliginosa* T. Jung & E. M. Hansen sp. nov., *P. psychrophila* T. Jung. & E. M. Hansen sp. nov. (Jung *et al.*, 2002) parasitas de espécies florestais, *P. ipomoeae* Flier & Grunwald sp. nov. (Flier *et al.*, 2002) parasita em *Ipomoea longipedunculata* e estritamente relacionada com *P. infestans*; *P. brassicae* De Cock & Man in’t Veld sp. nov. (Man in’t Veld *et al.*, 2002) parasita do género *Brassica* e estritamente relacionada com *P. porri* a que se acrescenta ainda a associação de espécies de *Phytophthora* já conhecidas a novos hospedeiros: *P. megasperma* em oliveira (Sanchez *et al.*, 2001), *P. cactorum* em *Carya illinoensis* (Reilly *et al.*, 1997) e *P. boehmeriae* em algodão (Elena & Paplomatas, 1997)

O género *Phytophthora* é um *taxa* de remarcáveis características em termos fitopatológicos. Todas as espécies do género *Phytophthora* são parasitas de plantas estando as espécies dicotiledóneas amplamente representadas. Por outro lado, possui espécies que no seu conjunto são capazes de infectar e colonizar todos os órgãos das plantas, englobando espécies com capacidade de parasitar elevado número de espécies vegetais e espécies que pela sua especificidade se aproximam dos organismos biotróficos.

O género *Phytophthora* caracteriza-se em termos biológicos por possuir micélio cenocítico (alguns septos podem estar presentes em culturas mais velhas), as hifas são hialinas podendo ter uma aparência lisa, nodosa ou botriosa. As ramificações laterais apresentam geralmente uma ligeira constrição na base.

Produz esporos assexuados, os zoósporos, numa estrutura designada por zoosporângio (= esporângio). Os esporangióforos são semelhantes às hifas podendo ter

proliferação interna ou serem produzidos de forma simpodial conseguindo, assim, formar esporângios de forma sucessiva e continuada.

Os esporângios variam na forma e no tamanho, podendo ser esféricos, subesféricos, ovóides, piriformes, obpiriformes, serem papilados ou não papilados, podendo germinar directamente ou libertar zoósporos uninucleados e biflagelados.

Os zoósporos de aspecto reniforme possuem dois flagelos de morfologia diferente (“heterokont”) que emergem da parte côncava. Os zoósporos depois de se movimentarem durante algum tempo desenvolvem uma parede celular que dá origem ao processo de enquistamento. Depois de enquistados germinam por emissão de um tubo germinativo ou podem dar origem a outro zoósporo. São considerados os propágulos mais eficiente no processo de infecção das plantas.

Os clamidósporos são os esporos de resistência às condições desfavoráveis, podendo ser esféricos ou ovais, terminais ou intercalares, sendo delimitados do micélio por um septo.

Os oósporos são os esporos de origem sexuada e resultam da conjugação do anterídio com o oogónio. Os oogónios são globosos ou piriformes e os anterídios podem ser anfigíneos ou paragíneos em função do tipo de ligação ao oogónio.

Algumas espécies são homotáticas (auto-compatíveis) e outras heterotáticas (auto-incompatíveis) necessitando neste caso da presença de micélio de compatibilidade sexual oposta para que ocorra a multiplicação sexual. O processo sexual em *Phytophthora* pode ainda ser desencadeado em resposta a factores exteriores, nomeadamente por estímulo de substâncias químicas produzidas por espécies de *Trichoderma* ou extractos de raízes de plantas.

O género *Phytophthora*, da classe dos *Oomycetes* e família *Pythiaceae*, incluído actualmente no Reino *Chromista* ou *Stramenopila* foi durante muito tempo classificado no reino *Fungi* por serem organismos heterotróficos, possuírem crescimento por polarização das hifas, esporos vegetativos adaptados à dispersão pelas correntes de ar ou pela água e utilizarem estratégias de infecção das plantas semelhantes às dos fungos. De referir no entanto, que desde sempre se conheceram em *Phytophthora* características biológicas e fisiológicas que lhe conferiam singularidade no contexto do reino onde se inseriam e que estudos posteriores foram sucessivamente ampliando.

Zentmyer (1987) refere as seguintes características do género *Phytophthora* não usuais em organismos classificados como fungos:

- Possui zoósporos que produzem a parede celular durante o processo de enquistamento necessário para que possam germinar e causar infecção;
- Os zoósporos possuem dois flagelos com morfologia diferente;
- Formam apenas um oósporo em cada oogónio;
- A parede celular é constituída por β -glucanas e alguma celulose ao contrário dos fungos cujo principal constituinte é a quitina;
- Durante a fase vegetativa são organismos diploides ao contrário dos fungos que são haploides;
- Acumulam como substância de reserva micolaminarinas (β 1-3-glucanas e manitol) enquanto nos fungos acumulam como principal substância de reserva o manitol;
- Não sintetizam esteróis e por essa razão não são sensíveis aos fungicidas que interferem com a sua biosíntese.

2.2. Posição Taxonómica do Género *Phytophthora*

Os *Oomycetes*, por serem eucariotas hetrotróficos nos quais a assimilação ocorre por absorção através da parede celular, foram incluídos pelos sistemas clássicos de classificação no reino dos fungos – Reino *Fungi*.

Na Sub-Divisão *Mastigomycotina* estão incluídos todos os organismos que possuem esporos flagelados. O número, tipo e inserção do flagelo no zoósporo são as características que definem as três classes do *Phylum*: *Chytridiomycetes*, *Hyphochytriomycetes* e *Oomycetes*.

A aplicação de outros critérios na formulação de hipóteses filogenéticas originou esquemas de classificação dos fungos que diferem do anteriormente referido. Moore (1980) considera os *Oomycota* conjuntamente com *Hyphochytriomycota* e *Chytridiomycota*, fungos inferiores, com base nas características de ultraestrutura celular. Kreisel em (1969) tinha já excluído do reino dos fungos os *Myxomycota*, *Chytridiomycetes* e *Oomycetes* classificando os *Oomycetes* como uma classe dos *Chrysophyta (Algae)*.

Ainsworth & Bisby's (1983) consideram o seguinte esquema de classificação para os *Oomycetes*.

Reino *Fungi* (Ainsworth & Bisby's, 1983)

Divisão	Sub-Divisão	Classe	Ordem	Família
<i>Eumycota</i>	<i>Mastigomycotina</i>	<i>Oomycetes</i>	<i>Lagenidiales</i>	3 Famílias
			<i>Leptomitales</i>	2 Famílias
			<i>Peronosporales</i>	<i>Albuginaceae</i>
				<i>Peronosporaceae</i>
				<i>Pythiaceae</i>
				<i>Peronophythoraceae</i>
			<i>Saprolegniaceae</i>	<i>Saprolegnia</i>

Os sistemas clássicos de classificação dos seres vivos, por se basearem num pequeno número de características, podem não reflectir as relações naturais entre os organismos, uma vez que não têm em consideração a possibilidade de determinada característica poder estar presente em grupos não relacionados como resultado de evolução convergente.

Os sistemas de taxonomia mais recentes, ao contrário dos sistemas clássicos, consideram um elevado número de características para classificar os organismos, nomeadamente o sistema de aquisição de nutrientes, ciclo de vida, sistema de reprodução, ultraestrutura dos organelos celulares, características bioquímicas e moleculares. A concordância de resultados, obtidos pela utilização independente dos diferentes critérios, proporciona maior grau de certeza nas afinidades estabelecidas e na evolução sequencial de determinado grupo de organismos.

O estudo dos genes conservados como o 18S rRNA, α e β -tubulina evidenciam que os fungos e os *Oomycetes* são filogeneticamente distintos (Sogin & Silberman, 2001).

As características biológicas, fisiológicas, ultraestruturais, bioquímicas e moleculares diferenciam os *Oomycetes* dos fungos e relaciona-os mais estreitamente com organismos anteriormente classificados como algas ou protistas, nomeadamente com *Phaeophyceae*, *Chrysophyceae*, *Bacillariophyceae* e *Synuridae*, que Cavalier-

Smith (1986) designou Chromistas (organismos com cor) – Reino *Chromista*, e Dick (1995) Straminipila (organismos com “straminipilous flagellum”) – Reino *Stramenopila*.

A organização sistemática dos *Oomycetes* segundo os autores referidos é a que a seguir se apresenta:

Reino *Chromista* (Cavalier-Smith, 1986)

Subdivisão	Subphylum	Classe	Ordem
<i>Heterokonta</i>	<i>Pseudofungi</i>	<i>Oomycetes</i>	<i>Rhipidiales</i> <i>Leptomitales</i> <i>Sclerosporales</i> <i>Pythiales</i> <i>Peronosporales</i>

Reino *Stramenopila* (Dick, 1995)

Subphylum	Classe	Subclasse	Ordem
<i>Peronosporomycotina</i>	<i>Peronosporomycetes</i>	<i>Peronosporomycetidae</i>	<i>Peronosporales</i> <i>Pythiales</i>
		<i>Rhipidomycetidae</i>	<i>Rhipidiales</i>
		<i>Saprolegniomycetidae</i>	<i>Saprolegniales</i> <i>Sclerosporales</i> <i>Leptomitales</i> <i>Salilagenidales</i>
		<i>Hyphochytriomycetidae</i>	<i>Hyphochytriales</i>

Na bibliografia da especialidade não é uniforme a designação adoptada. A última edição do “Dictionary of the Fungi” (Kirk *et al.*, 2001), na sua 9ª edição, adoptam a designação de Reino *Chromista* enquanto a base de dados EMBL da European Bioinformatic Institute (EBI) adopta *Stramenopila* para estes mesmos organismos.

Os métodos moleculares, com a sequenciação de genes conservados como os rRNA (16S ou 18S rRNA) e α e β -tubulina permitiram testar de forma independente as hipóteses filogenéticas obtidas pelas características fenotípicas, fisiológicas ou bioquímicas e promover as alterações na classificação dos organismos ao nível da

megasistemática, no sentido que Cavalier-Smith (1998) lhe atribui, ou seja ao nível da ordem classe e reino.

A perspectiva evolutiva proporcionada pelo 16S rRNA evidencia novos grupos como os *Stramenopila* os *Alveolata*, os *Rhodophytes* e *Haptophytes* e outras linhagens amebóides independentes que terão divergido quase simultaneamente com os animais, plantas e fungos, formando o topo evolutivo dos organismos eucariotas “crown eukaryota” como está representado na Figura 1 de Sogin & Silberman (2001).

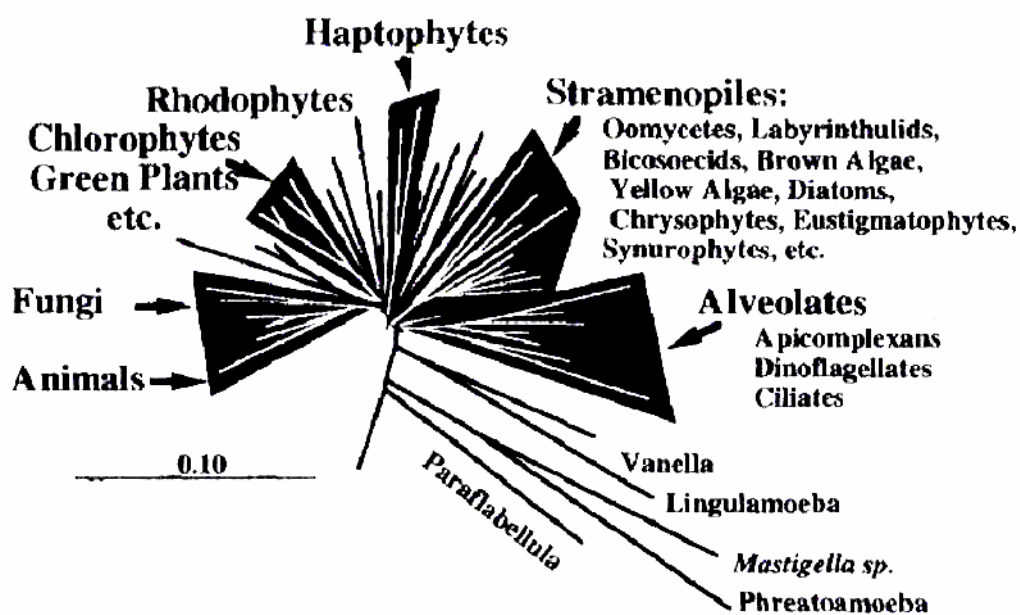


Figura 1 – Radiação eucariota: árvore filogenética 16S rRNA (Sogin & Silberman, 2001).

Os métodos moleculares em taxonomia têm impulsionado as alterações ao nível da classificação dos organismos não só ao nível da megasistemática mas também ao nível da espécie por complementarem as hipóteses baseadas nas características fenéticas ou por clarificarem entre as diferentes hipóteses em estudo.

Nesta perspectiva de classificação dos seres vivos os *Oomycetes* estão filogeneticamente tão distantes dos fungos, plantas e animais como dos *Alveolata* (*Plasmodium malariae*, um dos agentes causadores da malária) e confere-lhe características biológicas específicas, resolvendo assim, muitas das questões que se

colocavam em termos de modelo biológico e dos meios de luta contra estes importantes parasitas das plantas.

2.3. Classificação Taxonómica em *Phytophthora*

A classificação taxonómica do género *Phytophthora* baseia-se essencialmente nas características morfológicas.

As características morfológicas apresentam elevada plasticidade e são em número reduzido face ao elevado número das espécies descritas, o que determina que a classificação e identificação de *Phytophthora* seja considerado pela generalidade dos autores como um processo difícil, laborioso e muito moroso.

Da resenha histórica da classificação em *Phytophthora* (Waterhouse, 1987) realçam-se as chaves de Rosanbaum (1917), um dos primeiros autores a considerar as relações métricas dos esporângios na classificação, a chave de Tucker (1931) e Leonian (1934) que para além das características morfológicas consideram as características fisiológicas e de patogénese na classificação e identificação das espécies. Muitas outras chaves com utilização mais restrita são referidas pelo mesmo autor como a de Wager (1940) na África do Sul, a de Fezzi (1950) na Argentina e a de Schwim (1959) na Alemanha o que dificultou a identificação das espécies de *Phytophthora* com a existência de um número cada vez maior de epítetos com as dificuldades de comunicação daí resultantes. A chave de Waterhouse (1963) baseada em caracteres morfológicos e introduzindo o estudo em cultura pareada como fundamental no aspecto taxonómico, foi aceite por todos os investigadores de *Phytophthora* e estabeleceu a ordem numa altura em que muita confusão existia (Gallegly, 1987). Nesta classificação o género *Phytophthora* é dividido em seis grupos (I - VI) com base em critérios morfológicos dos esporângios e do tipo de anterídio.

A estabilidade desta chave na classificação, identificação e descrição das espécies assenta, segundo os seus autores, na divisão dos caracteres em caracteres estáveis para a definição dos grupos principais, caracteres estáveis ao nível da espécie, caracteres importantes em algumas espécies, e ainda caracteres indicadores (Waterhouse *et al.*, 1987).

A chave de Waterhouse foi revista pela autora e seus colaboradores Newhook e Stamps; (Newhook *et al.*, 1978) e (Stamps *et al.*, 1990) esta última na forma de chave tabular para facilitar a movimentação na chave no processo de identificação.

Os critérios de classificação propostos por Waterhouse, uniformizaram a classificação, identificação e descrição das espécies de *Phytophthora*, designadas actualmente “morfoespécies”, mas mantiveram-se as dificuldades de delimitação das espécies (*P. cryptogea*/*P. drescheleri*) e de sobreposição dos caracteres (*P. parasitica*/*P. nicotiana*).

A chave de Waterhouse e seus colaboradores é considerada por muitos autores como muito minuciosa e Gallegly (1987) considera mesmo que quem trabalha com a chave fica com a sensação que alguns caracteres seriam mais adequados para separar variantes e não espécies.

A variabilidade morfológica no género *Phytophthora* e das espécies individualmente consideradas é um assunto sempre presente na taxonomia deste género. A variabilidade e instabilidade morfológica estão associadas e dependem dos meios de cultura e das condições ambientais. Por outro lado, são necessárias condições especiais para a produção das estruturas necessárias ao processo de identificação em determinadas espécies o que dificulta a estandardização das condições ambientais desde sempre consideradas importantes no processo de identificação.

A variabilidade morfológica em *Phytophthora* leva mesmo alguns autores a questionar o conceito de “type specie”, definido pelo código de nomenclatura botânica, pelo qual se regem estes organismos e propõe o conceito de população para a definição de espécie neste género (Brasier, 1987). Neste conceito de espécie é dada especial ênfase à amplitude global de diversidade dos caracteres morfológicos e à necessidade do desenvolvimento de outras ferramentas não morfológicas para a delimitação das espécies. Este conceito de espécie foi aplicado em espécies de grande variabilidade morfológica por Mchau & Coffey (1994). Estes autores estudaram 77 isolados de *P. citrophthora* obtidos em 30 hospedeiros diferentes e de origens geográficas muito diversas, tendo obtido uma nova descrição de *P. citrophthora* com base na variabilidade global das características morfológicas e nos perfis isoenzimáticos dos isolados em estudo.

Mecanismos intrínsecos de adaptação e evolução associados a fenómenos de hibridação natural são igualmente referidos como factores de instabilidade e variabilidade morfológica. Brasier e seus colaboradores quando do estudo da espécie

de *Phytophthora* que ataca os amieiros classificaram-na como uma espécie de origem recente resultante do cruzamento de *P. cambivora* e *P. fragariae*. Nesta situação fitopatológica foram ainda identificadas formas instáveis com características morfológicas e biológicas particulares e com número de cromossomas intermédio entre diploide e tetraploide, (Brasier *et al.*, 1999; Brasier & Kirk, 2001).

2.4. Reprodução Sexuada em *Phytophthora*

No género *Phytophthora* existem espécies homotáticas (auto-compatíveis) e heterotáticas (auto-incompatíveis). As espécies heterotáticas necessitam da presença de micélio de compatibilidade sexual oposta (A1/A2) para que ocorra a reprodução sexual. A formação dos oósporos ocorre tanto em cruzamentos intra-específicos como inter-específicos desde que o micélio seja de compatibilidade sexual oposta.

Ko (1989) considera o comportamento sexual das espécies de *Phytophthora* como um processo singular no mundo vivo, uma vez que pode ocorrer entre espécies morfológica e fisiologicamente distintas.

Galindo & Gallegly (1960) que identificaram o heterotalismo em *P. infestans*, verificaram que ocorria hibridação entre os isolados de compatibilidade sexual oposta e que os isolados eram bissexuais, formando o tipo A1 o anterídio e o tipo A2 o oogónio acontecendo o oposto noutros pareamentos. Constataram ainda a existência de sexualidade relativa, ou seja isolados que produziam quase exclusivamente anterídios (strong male) e outros isolados que produziam oogónios existindo outros com relatividade sexual intermédia.

Em espécies heterotáticas ocorre ainda a produção de oósporos por auto-compatibilidade como verificou Ko (1978) pela utilização de membranas de policarbonato para impedir o contacto físico das hifas de compatibilidade sexual oposta. Evidências experimentais levaram Ko a postular que uma hormona $\alpha 1$ produzida por micélio de compatibilidade A1 induziria a reprodução sexual em isolados A2 e uma hormona $\alpha 2$ produzida por micélio de compatibilidade A2 induziria a reprodução sexuada em isolados A1, podendo estas hormonas actuar de forma inter-específica. Os isolados seriam heterotáticos porque não teriam receptores para a hormona que eles produzem e não reagem a essa substância ou porque não produzem

hormonas. As espécies homotáticas, por outro lado, reagem às hormonas que produzem podendo ser $\alpha 1$ ou $\alpha 2$ ou mesmo $\alpha 1$ e $\alpha 2$.

Em *P. cinnamomi* e outras espécies heterotáticas de *Phytophthora* e em micélio de compatibilidade sexual A2 foi ainda observada a produção de esporos de origem sexuada por estímulo químico associado a extractos de raízes de abacate (Zentmyer, 1980) e por estímulo de substâncias voláteis produzidas por diferentes espécies de *Trichoderma* (Brasier, 1974), que desta forma produzem oósporos sem ser necessário a presença de micélio compatível.

Os esporos de origem sexuada em *Phytophthora* resultam da união de um núcleo haploide do oogónio com outro núcleo haploide do anterídio sendo, este, o único estado haploide durante o ciclo de vida destes organismos.

O processo sexual (Hemmes & Bartnicki-Garcia, 1975, Hemmes, 1987; Gallegly, 1987; Irwin *et al.*, 1995) inicia-se pelo contacto e penetração do precursor do anterídio (“anteridio initial”) pelo precursor do oogónio (“oogonio initial”) sem que nesta fase ocorram trocas ou misturas de citoplasma entre os gametas. Segue-se a fase de expansão do oogónio que ocorre devido ao fluxo do citoplasma através da haste do oogónio que permanece aberta e funcional. Quando a fase de expansão termina, a haste do oogónio fica bloqueada com material semelhante ao da parede celular. O anterídio circunda a haste do oogónio dando origem ao tipo de anterídio anfigíneo. No tipo de anterídio paragíneo o processo inicial é mais simples uma vez que não ocorre penetração nem expansão do oogónio, ocorrendo a fusão dos gametas por contacto directo. O processo da formação dos oósporos é a partir desta etapa semelhante nas espécies de *Phytophthora* com anterídio anfigíneo ou paragíneo.

Todos os núcleos do oogónio, excepto um, migram para a periferia do oogónio onde ficam sequestrados no periplasma. O tubo fertilizador do anterídio rompe a parede do oogónio e deposita o núcleo haploide do anterídio, formando-se de imediato uma membrana que delimita o periplasma da oósfera. Quando se forma a oósfera a composição do citoplasma modifica-se drasticamente aparecendo vacúolos e corpos lipídicos em quantidade aproximadamente semelhante. O processo de formação dos oósporos termina com a formação de uma parede celular e pelo rearranjo das substâncias de reserva num ooplasto central rodeado por um córtex de corpos lipídicos. A morfogénese dos oósporos em *P. capsici* está representada na Figura 2 que foi adaptada de (Hemmes, 1987).

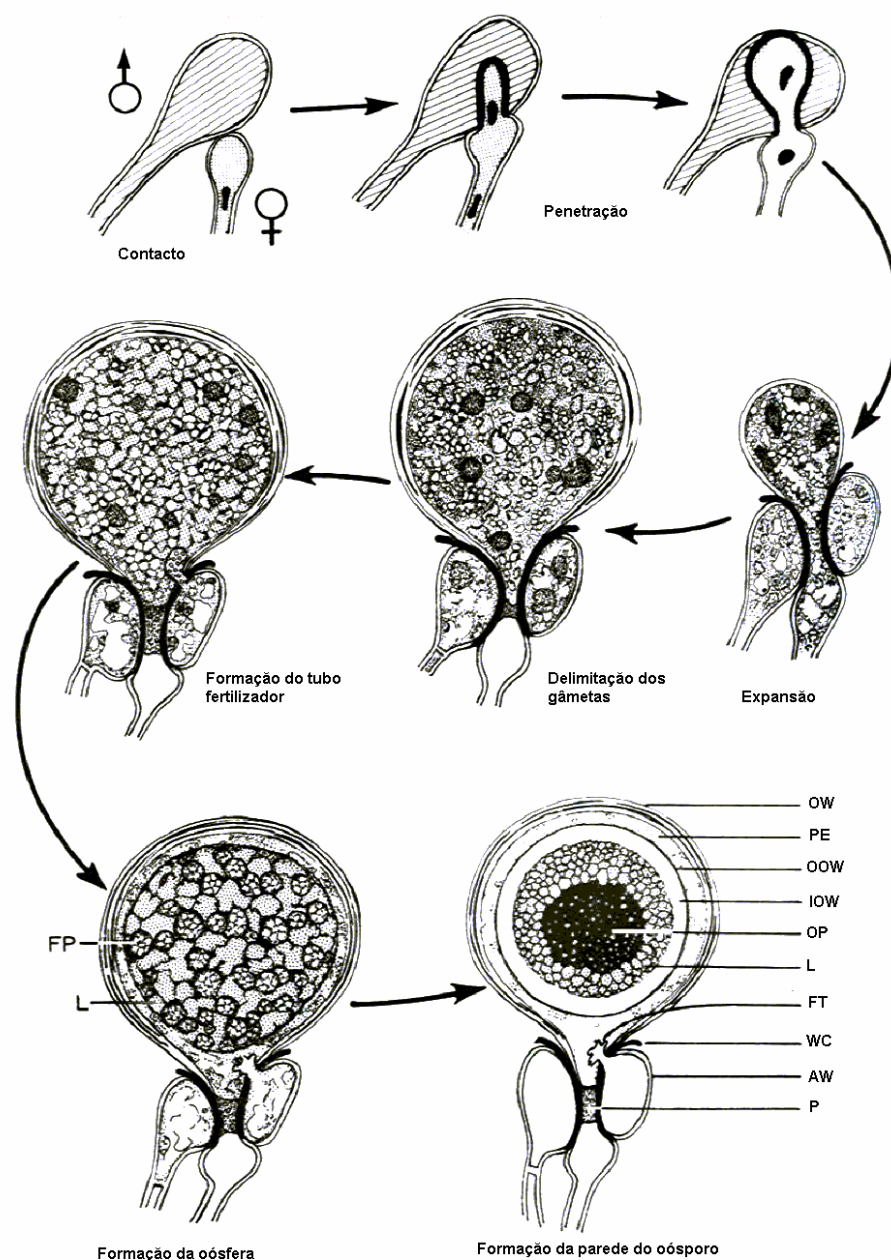


Figura 2 – Morfogênese dos oósporos em *P. capsici*: relação entre os gametas e desenvolvimento do oósporo. AW – Parede do anterídio, FP – vacúolo, FT – Tubo de fertilização (degeneração), IOW – Parede interna do oósporo, L – Corpo lipídico, OOW – Parede exterior do oósporo, OP – ooplasto, OW – Parede do oogónio, P – Obturação do oogónio, PE – Periplasma, WC – Parede da zona de contacto. (Adaptado de Hemmes, 1987)

A morfologia do oogónio e dos oósporos é muito semelhante em todas as espécies de *Phytophthora* para poder ter valor diferenciador na classificação das

espécies, sendo no entanto a posição do anterídio (anfigíneo ou paragíneo) um dos caracteres principais na classificação de Waterhouse. Espécies que possuem anterídios paragíneos são incluídos no Grupo I, II e V e com anterídios anfigíneos no Grupo II, IV e VI. O carácter de anterídio anfigíneo é consistente em todas as espécies do Grupo II, podendo aparecer isolados que também possuem anterídios paragíneos no Grupo IV e VI.

A dimensão dos oogónios é considerada como carácter diferenciador no complexo de espécies englobadas em *P. megasperma*, embora com valor taxonómico muito reduzido dada a falta de estabilidade deste carácter.

2.5. *Phytophthora cinnamomi* e *Phytophthora cambivora*

P. cinnamomi Rands e *P. cambivora* (Petri) Buisman são espécies morfológicamente muito próximas, incluídas no Grupo VI da chave de Waterhouse, Newhook *et al.* (1978) e Stamps *et al.* (1990), por possuírem esporângios não papilados. Os oósporos formam-se por pareamento com micélio compatível e os anterídios são sempre anfigíneos. Neste grupo morfológico estão ainda incluídos *P. cryptogea* Pethyler & Laff., *P. dreschleri* Tucker var. *dreschleri*, *P. dreschleri* var. *cajani* Pal, Grewall & Sarbhoy, *P. cajani* Amin, Aldev & Williams, *P. melonis*, Katsura, *P. sinensis* Yu & Zhuang, *P. erythroseptica* Pethybr. var. *erythroseptica*, *P. erythroseptica* var. *pisi* Byw. & Hickman, *P. richardiae* Buisman, *P. gonapodyides* (Peterson) Waterh. e *P. undulata* (Peterson) Dick.

A chave de Stamps *et al.* (1990) que avalia os caracteres relacionados com os esporângios, anterídios, oogónios, clamidósporos e hifas, só a presença de oogónios ornamentados com protuberâncias em *P. cambivora*, e a presença de micélio coraloide em meios com agar ou dilatações grandes e esféricas em água em *P. cinnamomi*, permitem diferenciar as duas espécies. Os oogónios formam-se por pareamento de micélio de compatibilidade sexual oposta da mesma espécie ou de espécie diferente, não possuindo, no entanto, neste caso valor taxonómico.

As características morfológicas das hifas para que possam ter valor taxonómico devem ser realizadas em determinadas condições. Grente (1961) verificou que o micélio aéreo é igual nas duas espécies e só o micélio submerso no meio de cultura

agarizado permitiria diferenciar as duas espécies. Nestas condições, o micélio de *P. cambivora* é liso e uniforme apresentando vesículas de forma e volume muito variado em *P. cinnamomi*. Estas dilatações diferenciam-se dos clamidósporos por não possuírem septo basal e parede celular contínua à volta das dilatações. Estas características das hifas facilmente observáveis na extremidade das colónias em crescimento activo são indicadoras de *P. cinnamomi* dada a estabilidade destas características nos diferentes meios de cultura. Esta característica das hifas foi por nós utilizada na identificação de *P. cinnamomi* nos isolados de castanheiro. Alguns isolados de *P. cambivora* podem apresentar alguma irregularidade nas hifas tanto em meios com agar como em meios líquidos o que torna esta característica pouco objectiva na delimitação e identificação das espécies.

P. cambivora não produz ou raramente produz clamidósporos em cultura e *P. cinnamomi* apresenta quanto a esta característica comportamento oposto. No entanto, por existirem isolados de *P. cinnamomi* que não produzem clamidósporos torna esta característica pouco estável na identificação dos isolados.

A dificuldade de definição de critérios objectivos de identificação morfológica das espécies do género *Phytophthora*, a necessidade de aplicação de técnicas, meios de cultura e procedimentos muito definidos para a obtenção das estruturas morfológicas diferenciadoras determinou que as novas metodologias no domínio da bioquímica, da serologia e mais recentemente os métodos moleculares fossem aplicados na sistemática, classificação e filogenia do género *Phytophthora*.

2.6. Métodos Moleculares na Classificação e Filogenia do Género *Phytophthora*

Os métodos moleculares, com a disponibilidade de técnicas de fácil aplicação no estudo dos ácidos nucleicos, revolucionaram todas as áreas das ciências biológicas. Em estudos de sistemática, evolução e filogenia as sequências de DNA proporcionam valores semi-quantitativos de relação entre os organismos que permitem elucidar mecanismos de evolução contribuindo assim para a definição de grupos sistemáticos.

Samuels & Seifert (1995) consideram como objectivo fundamental da sistemática, o de organizar os seres vivos num esquema taxonómico que facilite a identificação dos organismos e permita predizer as suas características biológicas. Este

objectivo foi formulado para a sistemática em micologia mas poderá ser alargado a todos os domínios da taxonomia dos seres vivos.

A chave de identificação das espécies de *Phytophthora* de Waterhouse (1963) baseia-se em características morfológicas e foi adoptada pela generalidade dos estudiosos deste género dando origem ao conceito de “morfoespécie”. Este conceito é aplicado ao conjunto dos indivíduos com morfologia definida na chave anteriormente referida, sem que no entanto sejam conhecidas as inter relações genéticas e de compatibilidade sexual entre as unidades taxonómicas. Nos sistemas de classificação natural a compatibilidade sexual entre as unidades taxonómicas é considerada fundamental na definição das unidades taxonómicas.

A morfologia por si só não permite definir as relações entre as espécies do mesmo género sendo difícil identificar e distinguir entre homologia ou convergência das características morfológicas. Os caracteres baseados no DNA são características independentes da morfologia e podem ser utilizadas para determinar a homologia ou convergência das características morfológicas e estabelecer relações de filogenia.

O sucesso dos métodos moleculares nos estudos filogenéticos e de sistemática dependem em grande parte das moléculas escolhidas para a análise. Sogin & Silberman (1998) referem a existência de importantes bases de dados de sequências dos genes da *actina*, *tubulina* e RuBisCo que foram extensivamente estudadas pelo seu papel fundamental em estudos de biologia celular e de bioquímica que apenas permitiram estabelecer relações filogenéticas entre alguns grupos de organismos eucariotas não permitindo no entanto estabelecer relações de filogenia entre esses organismos. Sogin & Silberman (1998) referem ainda que Woese em 1977 tinha considerado a região do genoma que codifica para os ribossomas (rDNA) com um potencial extraordinário em filogenia e sistemática por existir em todas as formas de vida. A sequenciação desta região genómica demonstrou as potencialidades previstas por Woese e tem sido largamente utilizada em estudos de filogenia, sistemática e diagnóstico em medicina, agricultura e ecologia.

O DNA que codifica o RNA dos ribossomas é constituído por genes que codificam respectivamente as subunidades “Large” e “Small”, como está representado na Figura 3.

O produto do gene 18S, que é RNA e não uma proteína, combina-se com proteínas para formar a pequena subunidade “ Small Subunit” dos ribossomas (SSU).

A grande subunidade dos ribossomas “Large Subunit” (LSU) é formada por proteínas e pelo produto do gene 5.8S, 28S e 5S.

Nos eucariotas o gene 5S dos ribossomas é relativamente independente dos outros genes RNA, podendo estar associado aos genes RNA ou existir em série repetitivas mas separadas desta região ou mesmo disperso no genoma (Belkhiri *et al.*, 1992).

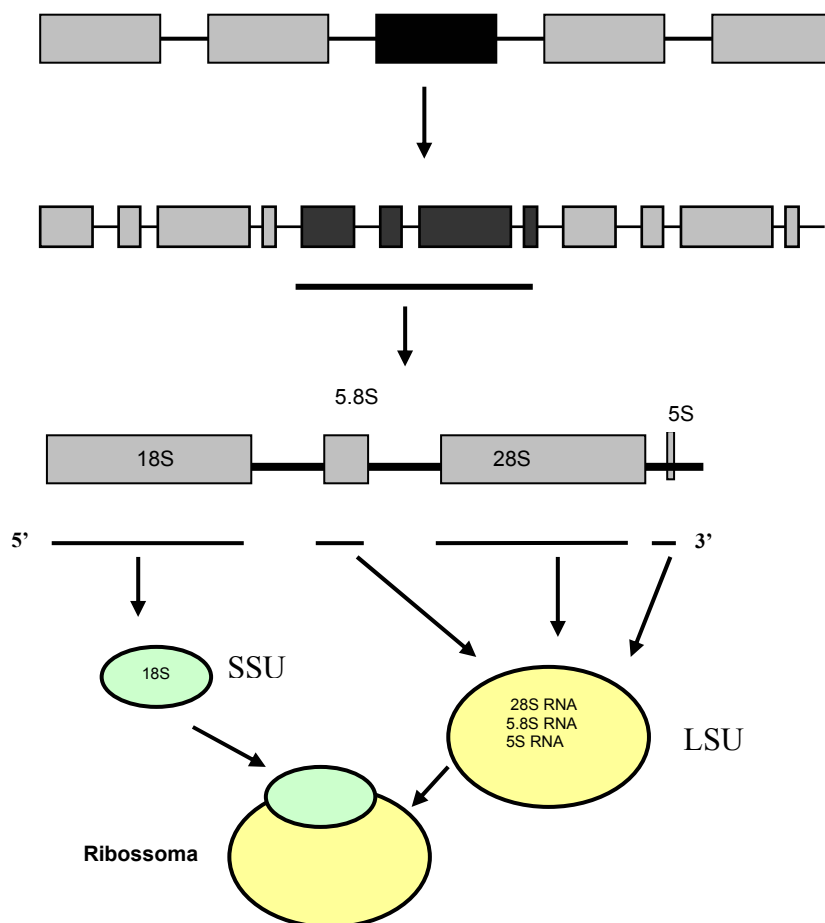


Figura 3 – Esquema representativo da organização do genoma que codifica para o RNA das subunidades dos ribossomas, SSU – “Small Subunit”; LSU – “Large Subunit”.

O gene 18S – rRNA é uma região muito conservada e muito estável em todos os organismos sendo utilizada em estudos filogenéticos ao nível da megasistemática.

A região intergénica (ITS) que se localiza entre o gene 18S e 5.8S é designada ITS1, designando-se ITS2 a região do genoma localizada entre o gene 5.8S e o gene 28S. Estas regiões do DNA, por serem zonas não codificantes acumulam mutações mais rapidamente, sendo muito utilizadas para caracterizar e identificar espécies ao nível de um determinado género.

A parte terminal do gene 28S acumula mutações a uma taxa que se situa entre a que ocorre na zona ITS e no gene 18S, sendo utilizado em estudos de sistemática e filogenia ao nível da família e da ordem.

O conjunto destes genes, todos eles necessários para a produção dos ribossomas, repete-se muitas vezes ao longo do genoma. O conjunto dos genes que codifica para os ribossomas é separado de outro conjunto por regiões intergénicas (IGS) que se revelaram igualmente interessantes em estudos de taxonomia e caracterização das espécies.

Nos procariotas os ribossomas são igualmente constituídos pelas duas subunidades – a subunidade grande e a subunidade pequena como nos eucariotas. Cada subunidade é constituída por RNA e proteínas ribossomais. A subunidade pequena (30S) contém proteínas e o produto do gene RNA denominado 16S enquanto a subunidade grande (50S) além das proteínas ribossomais contém o produto do gene 5S e 23S.

O RNA e as proteínas ribossomais desempenham um papel essencial na manutenção da estrutura e integridade dos ribossomas sendo o RNA fundamental no processo de síntese proteica em todas as células o que lhe confere uma extraordinária importância e conservação em todos os organismos vivos.

Para o desenvolvimento da abordagem molecular em sistemática e filogenia contribuiu de forma decisiva a técnica da reacção em cadeia da polimerase (PCR). A PCR, descrita pela primeira vez em meados dos anos 80 por Saiki *et al.* (1985), permite amplificar um determinado fragmento de DNA de forma exponencial. Inicia-se pela desnaturação do DNA a que se segue a ligação de pequenos oligonucleótidos sintéticos (primers) a cada uma das extremidades da zona que se pretende amplificar. A região do DNA entre os primers é amplificada pela incorporação de nucleótidos individuais fosforilados através da uma enzima específica de polimerização do DNA.

As condições de temperatura são fundamentais para o sucesso da reacção PCR. Inicialmente são necessárias temperaturas superiores a 90 °C para separar as cadeias de DNA (desnaturação), sendo necessário depois temperaturas da ordem dos 35 – 55 °C para a ligação dos primers (emparelhamento). A síntese do DNA (amplificação) ocorre à temperatura óptima de funcionamento da enzima. Cada etapa do processo decorre durante 30 a 120 segundos.

No final de cada ciclo a quantidade de DNA terá duplicado. A utilização de 25 – 45 ciclos nas reacções PCR determina que a quantidade de DNA amplificado seja

muito elevada no final da reacção e seja possível a sua visualização em geis de agarose.

Lee & Taylor (1992) utilizaram pela primeira vez em *Phytophthora* a técnica PCR e da sequenciação dos nucleótidos do DNA da região ITS1 e ITS2 como ferramenta taxonómica e de caracterização das espécies. Analisaram esta região genómica em quatro espécies de *Phytophthora* morfológicamente semelhantes (*P. palmivora*, *P. megakarya* e *P. citrophthora* do Grupo II de Waterhouse) e *P. cinnamomi* do Grupo VI como espécie exterior ao grupo morfológico em estudo. As relações de filogenia entre as espécies em estudo não são conhecidas, apesar das espécies estarem perfeitamente delimitadas por características morfológicas, citológicas e bioquímicas. Os resultados obtidos permitiram a separação das espécies de acordo com os caracteres morfológicos e sugeriam ainda a utilidade desta técnica no estabelecimento de relações inter-específicas no género *Phytophthora*. Verificaram ainda que a variação do ITS1 e ITS2 era reduzida ou nula dentro da mesma espécie e suficientemente grande entre as espécies para permitir a sua delimitação e identificação.

Utilizando a mesma abordagem Cooke *et al.* (1996) estudaram as inter-relações entre as espécies do Grupo I de Waterhouse (*P. cactorum*, *P. ideae*, *P. pseudotsugae*, *P. clandestina*, *P. iranica*). Neste estudo o reduzido número de diferenças nas sequências de nucleótidos da região ITS não permitiu a delimitação de todas as espécies em estudo. Em *P. cactorum*, *P. ideae* e *P. pseudotsugae* a região ITS não foi suficiente para a delimitação específica embora esta separação seja suportada por caracteres morfológicos e outros marcadores genéticos.

Cooke e a sua equipa continuaram os estudos de sequenciação da região ITS em *Phytophthora* tendo sequenciado esta região genómica em espécies de todos os grupos morfológicos (morfoespécies). Cooke & Duncan (1997) publicam a sequência da região ITS1 e ITS2 de outras nove espécies de *Phytophthora* e confirmaram a validade desta estratégia na classificação do género *Phytophthora*. A região ITS1 evidencia menor dimensão e maior polimorfismo que a região ITS2 embora a análise obtida quando se considera individualmente cada uma das regiões proporcione resultados semelhantes.

Cooke *et al.* (2000) publicam posteriormente o estudo da sequenciação da região ITS1, 5.8S e ITS2 de 50 espécies de *Phytophthora* (234 isolados), espécies de *Pythium* e espécies representativas de outros *Oomycetes* como *Saprolegniales* e

Peronosporales. O estudo teve entre outros objectivos o de avaliar a posição filogenética de *Phytophthora* em relação a outros géneros dos *Oomycetes* nomeadamente *Pythium* e *Peronospora*, testar hipóteses de evolução em *Phytophthora* (espécies adaptadas ao ambiente solo ou ambiente aéreo) e verificar se as linhas de evolução detectadas por este tipo de análise correspondiam à definição morfológica para as espécies.

A Figura 4 de Cooke *et al.* (2000) apresenta as relações filogenéticas entre o género *Phytophthora* e outros *Oomycetes* e a Figura 5, do mesmo autor, as inter-relações entre as diferentes espécies de *Phytophthora* obtidas pela utilização da região genómica do ITS1, 5.8S e ITS2.

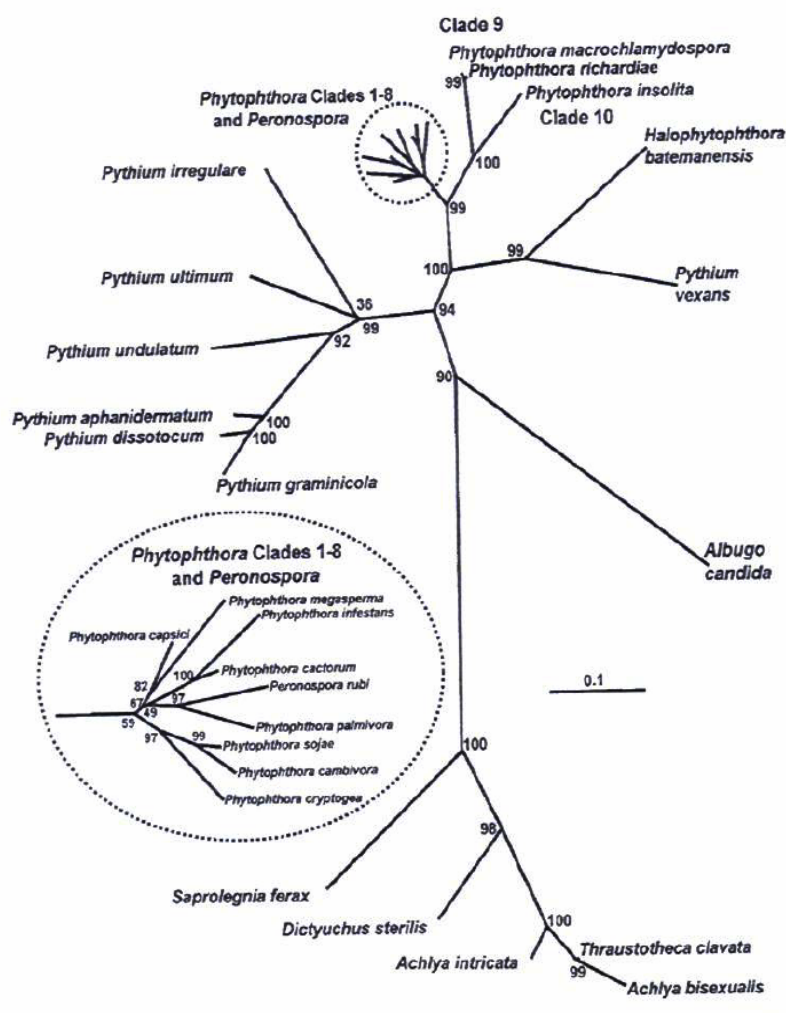


Figura 4. – Diagrama das relações filogenéticas nos *Oomycetes* (Cooke *et al.*, 2000).

Cooke *et al.* (2000) verificaram com a sequenciação desta região genómica que o género *Pythium* é polifilectico e mais diversificado que o género *Phytophthora*. *Phytophthora* é um género parafilectico com dois grupos. Um dos grupos é

monofilectico e inclui 47 espécies, subdividindo-se em oito clades. Neste grupo estão igualmente incluídas as espécies de *Peronospora* que tinham sido incluídas no estudo. Outro grupo é constituído por apenas três espécies: *P. macrochlamydospora*, *P. richardiae* e *P. insolita* que representam uma linha evolutiva diferente.

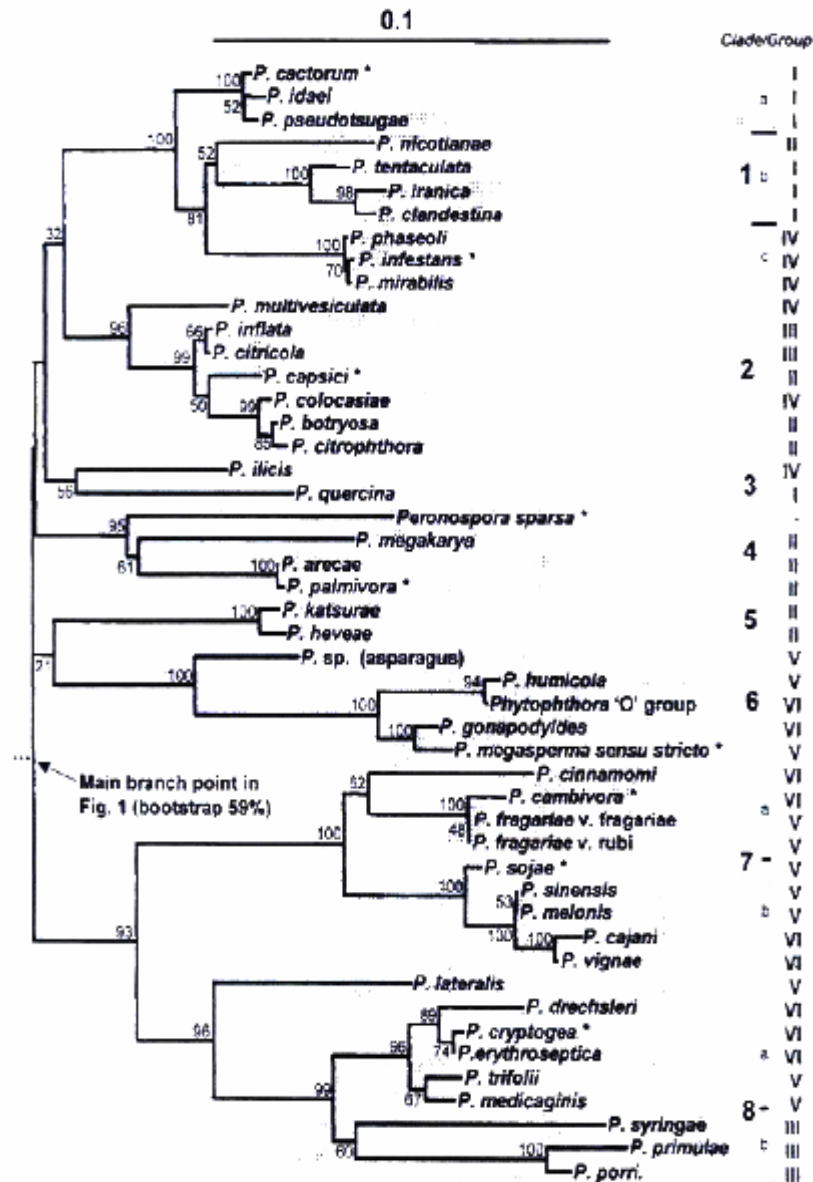


Figura 5 – Diagrama das relações filogenéticas entre diferentes espécies de *Phytophthora* (Cooke *et al.*, 2000).

O trabalho de Cooke *et al.* (2000) que incluiu todas as espécies do género *Phytophthora* demonstrou que o conceito tradicional ao nível do género representa um grupo natural de organismos e as relações filogenéticas estabelecidas com base na

região do ITS estão de acordo com as obtidas com base em critérios morfológicos quando se considera apenas o tipo de esporângio. De referir, que Briard *et al.* (1995) pela utilização da região do domínio D2 do gene 28S não obtiveram concordância dos resultados com a separação das espécies de *Phytophthora* em função do tipo de papila do esporângio e tipo de ligação do anterídio.

A forma de ligação do anterídio (anfigíneo ou paragíneo) ao oogónio e o tipo de reprodução homo ou heterotática não são indicadoras de relações filogenéticas estreitas uma vez que estas características se encontram presentes nas diferentes clades.

Este sistema de classificação molecular é actualmente aplicado na identificação das novas espécies. Jung *et al.* (2002) descreveram pela primeira vez *P. psychrophila*, *P. uliginosa* e *P. europaea* tendo incluído na clade **3** desta classificação a primeira das espécies referidas e na clade **7a** as outras duas espécies.

As relações filogenéticas situadas a outros níveis da classificação dos *Oomycetes* foram igualmente estudadas com a utilização de métodos moleculares. Riethmüller *et al.* (2002) com base em estudos da região 28S do rRNA estudaram a hierarquização sistemática dos *Peronosporomycetidae* (classificação Dick, 1995) e concluíram que a família *Pythiales* e *Peronosporales* são polifilecticas. Os resultados obtidos por este método não são totalmente compatíveis com a classificação em vigor. O género *Phytophthora* assumido como membro da ordem *Pythiales* estaria mais relacionada com a família *Peronosporaceae* do que com o género *Pythium* que ocupa por este método uma posição basal neste grupo sistemático. Estes autores propõem mesmo que *Phytophthora* e *Peronophythora* fossem transferidas para a família *Peronosporaceae*.

Cooke *et al.* (2000) obtiveram, com base na região do ITS, relações filogenéticas mais abrangentes considerando que *Phytophthora* e *Pythium* deveriam ser incluídas na ordem *Peronosporales*. Estes autores consideram que a região genómica por eles estudada estaria no limite de resolução a este nível taxonómico e recomendam o estudo de outras regiões do genoma para a confirmação ou não destes resultados.

A classificação das espécies com base na região genómica do ITS1 e do ITS2 apresenta algumas limitações. Förster *et al.* (2002) referem que a região ITS1 é relativamente pequena e quando se estudam diversos organismos é muito difícil alinhar e analisar as sequências. A região ITS2, que apresenta menor variabilidade

origina filogenias similares, sendo necessário segundo este autor incluir outras regiões genómicas para os estudos filogenéticos.

O rDNA nos eucariotas é constituído por muitas cópias, também designadas parálogos, localizadas num ou em vários grupos. Em plantas foi detectado rDNA divergente em estudos da região ITS. Buckler *et al.* (1997) testaram mesmo a hipótese de alguns parálogos divergentes serem pseudogenes. O rDNA divergente poderá ser um pseudo-gene quando um *locus* do ribossoma se tornou inactivo (O'Donnell *et al.*, 1998), ou quando uma cópia do rDNA ficou disperso noutras zonas do genoma. Os “ITS dos pseudogenes” poderão acumular substituições de bases a uma taxa elevada o que destabilizará a estrutura secundária destas moléculas. A existência de parálogos divergentes coloca sérios problemas para a reconstrução da filogenia das espécies quando se utilizam pequenas amostragens de rDNA (Buckler *et al.*, 1997). Nos parálogos divergentes, segundo o mesmo autor, pode ainda ocorrer recombinação o que poderá comprometer o estabelecimento da filogenia com base nesta região do genoma.

Recentemente a filogenia baseada apenas num único gene ou região genómica não é considerada válida sendo necessário para o estabelecimento da filogenia a concordância de resultados com outras regiões do genoma. Taylor & Fisher (1999) propõem mesmo que para o estabelecimento da filogenia ao nível da espécie é necessário a concordância de resultados entre filogenias obtidas pelo menos em cinco regiões genómicas distintas, incluindo genes com apenas uma cópia em todo o genoma como a β -tubulina ou a *endochitinase 42*.

Em *Phytophthora* os genes citocromo oxidase I e II das mitocôndrias (*cox I* e *cox II*) foram sequenciados por Martin *et al.* (2003) tendo a sua análise evidenciado alguns conflitos com a filogenia obtida com a região ITS. Segundo estes autores é necessário a sequenciação de outras zonas do genoma para que a filogenia com base nos marcadores moleculares seja fiável.

2.7. Métodos Moleculares na Identificação das Espécies de *Phytophthora*

Em *Phytophthora* os estudos de sistemática e filogenia baseados na sequenciação da região genómica que codifica para o RNA dos ribossomas (rDNA) contribuiu

decisivamente para o desenvolvimento de estratégias de identificação, detecção e diagnóstico baseadas na técnicas PCR (Lee & Taylor, 1992; Bonants *et al.*, 1997; Cooke *et al.*, 1999; Cooke & Duncan, 1997; Cooke *et al.*, 2000).

Para além da região genómica que codifica para os ribossomas foram também utilizadas com o mesmo objectivo o gene que codifica para as elicitinias, holoproteínas consideradas características do género *Phytophthora* (Ricci, 1977) e regiões “anónimas” do genoma obtidas por clonagem de fragmentos de DNA, considerados característicos de determinada espécie.

2.7.1. Região Genómica que Codifica para os Ribossomas (rDNA)

A região genómica que codifica para o RNA dos ribossomas contém genes funcionais e conservados em termos evolutivos separados por regiões não codificantes e por regiões intergénicas que ligam as diferentes unidades génicas.

O espaço entre regiões codificantes dos genes rRNA (ITS) é particularmente útil para a discriminação dos organismos ao nível da espécie e do género (Cooke *et al.*, 1999), porque a taxa de acumulação de mutações nesta região se aproxima muitas vezes da taxa de especiação (Lee & Taylor, 1992), razão pela qual muitas das estratégias de identificação molecular por PCR no género *Phytophthora* se baseiam na amplificação desta região do genoma.

O método consiste em desenhar primers nas regiões conservadas do rDNA para amplificação de regiões características que depois de sequenciadas ou analisadas por restrição enzimática permitem a identificação dos organismos em estudo.

A Figura 6 representa a região genómica do rDNA e o diagrama das etapas e das técnicas de identificação molecular das espécies de *Phytophthora* com base na região ITS1, 5.8S e ITS2 do rDNA.

O estudo de Cooke *et al.* (2000) constitui uma referência na caracterização da região ITS no género *Phytophthora*. O DNA foi amplificado por PCR usando os primers universais ITS6 e ITS4. O primer ITS6 é similar ao ITS5 de White *et al.* (1990) mas modificado por Cooke & Duncan (1997) de acordo com a sequência da região 18S do rDNA de *P. megasperma* para aumentar a especificidade da amplificação desta região em *Phytophthora*.

Nas espécies dos *Oomycetes* biotróficos (*Peronosporales*) esta região foi amplificada pela utilização dos primers DC6 e ITS4 que amplifica especificamente a região ITS1, 5.8S e ITS2 de *Peronosporales* e *Pythiales* (Bonants *et al.*, 1997).

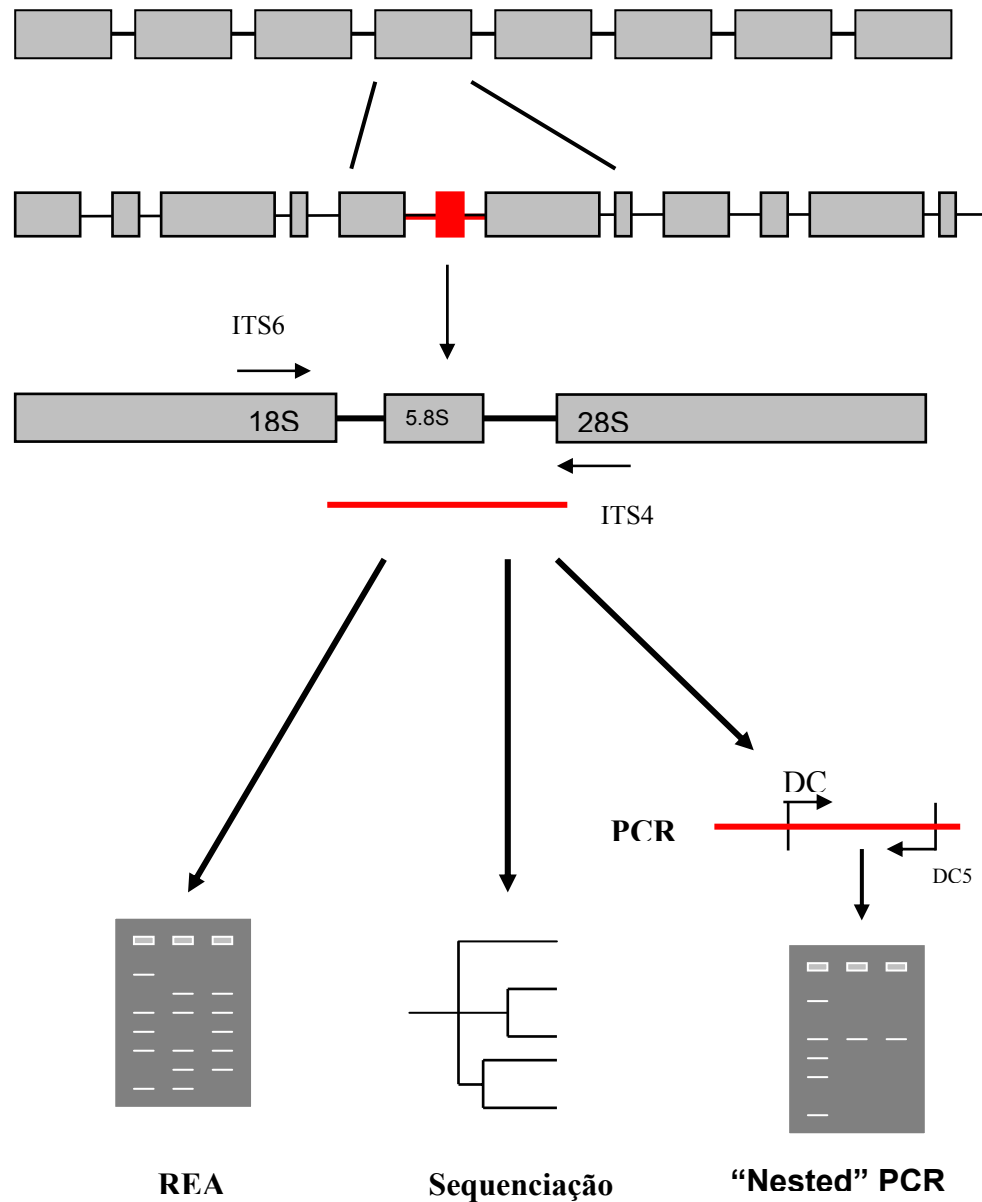


Figura 6 – Esquema representativo da organização do rDNA e estratégias de identificação das espécies de *Phytophthora* com base na Região genômica ITS1, 5.8S e ITS2, (Siglas e métodos descritos no texto).

O fragmento amplificado por PCR, com aproximadamente 900 pb em *Phytophthora* e de 1300 pb nos organismos biotróficos, é posteriormente sequenciado

permitindo a análise da sequência dos nucleótidos, identificar a unidade taxonómica presente por comparação com as existentes em bases de dados.

Alternativamente, o fragmento amplificado pode ser analisado por restrição enzimática (REA) ou também designado Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs). Os perfis de corte obtidos com as enzimas de restrição permitem a identificação da espécie por comparação com as bases de dados.

Esta região genómica permite ainda a detecção e diagnóstico das espécies de *Phytophthora* directamente dos tecidos vegetais, água ou solo. A estratégia consiste na utilização dos primers universais para amplificação da região ITS1, 5.8S, ITS2 e desenhar internamente a esta região primers específicos. Em termos práticos realiza-se uma primeira reacção PCR com os primers universais que constituirá o DNA molde para uma segunda reacção PCR a realizar com os primers específicos desenhados no interior da sequência. Esta abordagem designada “Nested PCR” permite a detecção e identificação simultânea da espécie de *Phytophthora* sem necessidade de se proceder ao isolamento em cultura pura das espécies parasitas.

2.7.2. Região Intergénica (IGS)

As regiões do genoma localizadas entre as unidades repetitivas que codificam para os ribossomas denominam-se regiões intergénicas (IGS) ou regiões não transcritas (NTS). Em *Phytophthora*, e em algumas espécies de *Pythium*, esta região contém o gene 5S embora noutras espécies este gene não se encontra associado a esta região do genoma (Belkhiri *et al.*, 1992). Segundo os mesmos autores o gene 5S rRNA está presente na unidade repetitiva do rDNA nas espécies de *Pythium* que possuem esporângios filamentosos e ausente nas espécies com esporângios globosos. Quando presente na região repetitiva do rDNA esta sequência encontra-se em orientação invertida.

Liew *et al.* (1998) estudaram a região intergénica IGS2, região localizada entre o gene 5S e a região que codifica a SSU, em *Phytophthora* com o objectivo de desenharem primers específicos nesta região genómica para a detecção e identificação de *P. medicaginis* em tecidos vegetais. Esta estratégia de detecção e identificação

proporcionou com base na técnica PCR a detecção de *P. medicaginis* em tecidos de planta de luzerna de forma específica e com elevada sensibilidade.

As características da região IGS são menos conhecidas em *Phytophthora* que as da região ITS, sabendo-se no entanto que em muitas espécies o gene 5S se encontra associado aos genes rRNA na região do rDNA e não está em posição invertida como acontece no género *Pythium* (Liew *et al.*, 1998). Este mesmo autor, verificou que também em algumas espécies de *Phytophthora* o gene 5S rRNA não está na região do rDNA e está organizado em unidades repetitivas noutras regiões do genoma.

O estudo de Liew *et al.* (1998) evidenciou ainda que a variabilidade intraespecífica é reduzida em *P. medicaginis* (10 nucleótidos em 3566 pb). A homologia é elevada em espécies morfologicamente próximas não existindo regiões localizadas com variações acentuadas, encontrando-se a variação dispersa ao longo da sequência o que dificulta o desenho de primers específicos para as diferentes espécies do género *Phytophthora*.

2.7.3. Região Genómica que Codifica as Elicitinas

As elicitinas são holoproteínas de 98 aminoácidos produzidas em grande quantidade por todas as espécies de *Phytophthora* (Ricci, 1997). São proteínas características deste género e não estão relacionadas com outras proteínas elicitoras de bactérias ou fungos. Actuam biologicamente como indutoras de fenómenos de resistência do hospedeiro.

A sequência de aminoácidos das elicitinas é considerada específica de cada espécie, com regiões conservadas e outras de maior variabilidade. Esta característica facilita o desenho de primers específicos ou sondas moleculares com diferentes níveis de especificidade que podem ser utilizadas em identificação das espécies de *Phytophthora* (Panabières *et al.*, 1997).

A elicitina produzida por *P. cinnamomi* denomina-se *cinnamomina* e induz reacções de hipersensibilidade em tabaco (Huet & Pernollet, 1998). Com base na sequência dos nucleótidos, Coelho *et al.* (1997) desenharam primers degenerados para amplificação desta região do genoma de *P. cinnamomi* isolada de *Quercus suber*. A

sequência de bases do gene da *cinnamomina* permitiu o desenho de primers específicos para esta espécie.

Os trabalhos desenvolvidos pelos autores anteriormente referidos evidenciaram que *P. cambivora* produzia uma elicítina “*cambivorina*” com 96 % de homologia com o gene da *cinnamomina* e os primers desenvolvidos para *P. cinnamomi* amplificavam de igual modo *P. cambivora*. Com o objectivo de aumentar a especificidade do método, foram posteriormente desenhados primers na região não codificante da sequência, no entanto, com esta abordagem 20 % dos isolados de *P. cinnamomi* não evidenciaram resultados positivos.

A dificuldade e complexidade em desenhar primers específicos nesta região genómica ficaram, entretanto, ainda mais dificultadas pelo facto de genes de elicitinas terem sido identificadas em três espécies do género *Pythium* (Panabières *et al.*, 1997).

2.7.4. Regiões Genómicas Características (Sequence Characterised Amplified Regions - SCAR)

Regiões genómicas não caracterizadas podem também ser utilizadas para desenhar primers específicos se a sequência de nucleótidos da região característica de determinada espécie for determinada. As técnicas moleculares que proporcionam o acesso a estas regiões incluem a clonagem e sequenciação de fragmentos. As regiões características podem ser obtidas por RAPD (Schubert *et al.*, 1999) ou provenientes de regiões do genoma seleccionadas ao acaso e clonadas em plasmídeos adequados (Érsek *et al.*, 1994).

Esta estratégia para desenhar primers específicos para detecção e identificação de *P. cinnamomi* foi por nós utilizada com o objectivo de ultrapassar algumas dificuldades práticas da técnica “Nested” PCR e será apresentada mais adiante.

2.8. Caracterização Molecular das Espécies de *Phytophthora*

A disponibilidade e facilidade de utilização de técnicas de biologia molecular possibilitaram a aplicação destas metodologias na descoberta e aperfeiçoamento de

marcadores moleculares como os baseados nos fragmentos de restrição enzimática do DNA (Restriction Fragment Length Polymorphisms – RFLP) e os obtidos pela técnica PCR como os Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs) e microssatélites ou Simple Sequence Repeats (SSR) na caracterização das espécies.

2.8.1. Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)

A técnica RFLP baseia-se na utilização de enzimas de restrição, as quais cortam o DNA em sequências muito precisas, dando origem a fragmentos de DNA cujo tamanho depende da distribuição dos locais de restrição.

Nascimento (1997) refere em relação a esta técnica citando outros autores que tem elevada heritabilidade, natureza codominante e identifica sequências únicas ou com baixo número de cópias. No entanto a análise com este tipo de marcadores é consideravelmente lenta, requer grandes quantidades de DNA (5 - 10 µg por indivíduo em estudo), tem custos elevados, necessita de marcação radioactiva das sondas e é exigente em termos dos protocolos laboratoriais.

O polimorfismo obtido com este tipo de marcador molecular é reduzido o que dificulta a utilização desta técnica na caracterização populacional das espécies.

Em *Phytophthora* esta técnica de caracterização molecular foi utilizada para confirmar a identificação e sinonímia de espécies, caracterizar isolados de compatibilidade sexual A1 e A2 em *P. infestans* e caracterizar a população desta mesma espécie com origem geográfica diversificada, como pode ser constatado em Erwin & Ribeiro (1996) que citam mais de 20 referências bibliográficas com utilização desta técnica de caracterização molecular no conjunto das espécies do género *Phytophthora*.

A fiabilidade e reprodutibilidade desta técnica determinou que os marcadores RFLP continuem a ser utilizados na caracterização molecular de populações de *P. infestans* quando o objectivo é comparar a estrutura populacional ao longo do tempo, apesar de actualmente serem mais frequentemente utilizados marcadores moleculares baseados na técnica PCR.

2.8.2. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPDs)

Os RAPDs obtêm-se através da amplificação por PCR do DNA genómico utilizando um único “primer” com sequência nucleotídica arbitrária e de pequena dimensão (10 nucleótidos). Quando o primer se liga ao DNA molde em dois locais que se situam a uma distância conveniente, obter-se-á um produto de amplificação observável por separação electroforética em géis de agarose e coloração com brometo de etídio.

O polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente resulta de alterações na sequência de bases onde o primer se liga ou na existência de deleções ou inserções na região amplificada.

Os RAPD são marcadores moleculares muito utilizados em melhoramento de plantas e na caracterização genética das espécies vegetais (Newton & Graham, 1997), caracterização molecular de fitobactérias (Louws *et al.*, 1999) e caracterização de fungos nomeadamente ferrugens dos cereais (Chen *et al.*, 1995), *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Gerlach *et al.*, 2000) *Trichoderma* spp. (Hermosa *et al.*, 2000), *Armillaria mellea* (Ota *et al.*, 2000) e muitas outras espécies.

Os RAPDs são marcadores moleculares fáceis de realizar e muito informativos, apresentam no entanto a desvantagem da sua elevada sensibilidade a condições laboratoriais e origem dos tecidos dos quais se extrai o DNA que afecta o perfil dos RAPD. A falta de reprodutibilidade desta técnica dificulta consequentemente a uniformização de protocolos laboratoriais que permitam a criação de bases de dados para estudos comparativos a uma escala mais alargada.

Algumas das limitações da técnica RAPD podem ser solucionados com a utilização de controlos apropriados tais como utilizar repetições de preparações de DNA, realizar análise “Southern” ou converter fragmentos amplificados por RAPD em marcadores moleculares (Sequence Characterised Amplified Region - SCAR).

Os RAPDs apesar de não terem uma aplicação sistemática em *Phytophthora* foram utilizados para caracterizar *P. quercina* recentemente descrita por Jung *et al.* (1999), evidenciando os isolados padrões RAPD muito semelhantes entre si e muito diferentes dos evidenciados pelas outras espécies de *Phytophthora*.

Os RAPD são marcadores moleculares muito utilizados na caracterização infra-específica num grande número de organismos. Em *Phytophthora* foram utilizados para diferenciar os isolados de *P. parasitica* var. *nicotianea* com agressividade em plantas

de tabaco dos isolados que não possuem essa característica (Zhang *et al.*, 2001) e por Purwantara *et al.* (2001) para avaliar a diversidade genotípica na população de *P. clandestina* isolada de *Trifolium subterraneum* L. na Austrália.

Em *P. cinnamomi* os RAPDs foram apenas utilizados por Chang *et al.* (1996) para estudar a variabilidade populacional desta espécie em Taiwan onde foram identificados os dois tipos de compatibilidade sexual, A1 e A2.

Os RAPDs foram igualmente aplicados na caracterização da população de *P. infestans* existente no Canadá por Mahuku *et al.* (2000) e no Norte da Irlanda por Carlisle *et al.* (2001), aconselhando estes últimos autores a utilização de marcadores genéticos mais estáveis como os AFLP e a continuação da caracterização das populações de *P. infestans* com base na sonda (RFLP) RG-57 dada a estabilidade e reprodutibilidade associada a estes marcadores.

2.8.3. Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP)

A técnica AFLP assenta na amplificação selectiva por PCR de fragmentos resultantes da digestão enzimática do DNA genómico.

O DNA total é digerido com duas enzimas de restrição, uma delas com elevada frequência de corte e outra com baixa frequência de corte (*Mse* I e *EcoR* I respectivamente). Aos fragmentos de restrição ligam-se adaptadores (oligonucleótidos de cadeia dupla com 25 pares de bases) especificamente concebidos para se unirem aos extremos dos fragmentos cortados com estas enzimas.

Após a ligação dos adaptadores aos extremos dos fragmentos de restrição a amplificação por PCR é conseguida com a utilização de primers que possuem três regiões características: a extremidade 5' correspondente ao adaptador; a zona correspondente ao sítio de restrição e o extremo 3' com nucleotídios selectivos que se estendem para a região desconhecida do fragmento de restrição e determinarão os fragmentos que serão amplificados.

Os perfis AFLP dependem da combinação das endonucleases utilizadas na restrição do DNA genómico e do número de nucleótidos arbitrários na extremidade 3' do primer.

Em geral, a análise de genomas complexos que dão origem a um elevado número de fragmentos de restrição necessitam de primers com elevado número de nucleotídios selectivos na extremidade 3', enquanto genomas menos complexos como o dos fungos geralmente são suficientes dois nucleotídios selectivos na extremidade 3' de cada primer.

A visualização dos produtos amplificados é normalmente realizada com marcação do primer correspondente ao extremo cortado pela enzima com menor frequência de corte com radioisótopos (^{33}P) ou alternativamente por coloração com nitrato de prata.

Os resultados obtidos são de tipo binário baseando-se o polimorfismo na presença ou ausência de determinado produto de amplificação.

Os AFLPs possuem elevada heritabilidade, são muito polimórficos e reprodutíveis e pequenas quantidades de DNA são suficientes para a aplicação desta técnica.

Esta técnica de caracterização molecular, exigente do ponto de vista prático foi utilizada no género *Phytophthora* por Bonants & Weerd (1997) na identificação de raças de *P. fragariae* e recentemente por Cooke *et al.* (2003) na caracterização das populações de *P. infestans* (1995-1997) da Escócia.

As características associadas aos marcadores AFLP possibilitam a utilização desta técnica no estudo da variabilidade biológica e populacional das espécies assim como no estudo de qualquer domínio da sua biologia tais como virulência, patogenicidade, compatibilidade sexual ou especialização parasitária.

2.8.4. Microsatélites ou Simple Sequence Repeats (SSR)

Os microsatélites são sequências de poucos pares de bases dispostas em série tais como (AT) n , (ATT) n ou (GACA) n distribuídos pelo genoma das espécies eucariotas. As sequências que flanqueiam os microsatélites geralmente são conservadas nos indivíduos da mesma espécie permitindo a construção de primers que amplificarão por PCR as sequências repetidas compreendidas entre as regiões conservadas. Os fragmentos amplificados podem ser separados por electroforese em géis de agarose e visualizados por coloração com brometo de etídio.

Os microssatélites ao contrário dos RAPDs e AFLPs necessitam do conhecimento da sequência de bases da região genómica nos quais se baseiam para o desenho dos primers apropriados.

Na bibliografia apenas encontramos a utilização desta técnica em *Phytophthora* por Dobrowolski *et al.* (1998) para a caracterização molecular do DNA mitocondrial (mtDNA) de *P. cinnamomi* com o objectivo de encontrar marcadores moleculares para o estudo da variabilidade populacional. No entanto, os resultados obtidos com os microssatélites (A)n, não evidenciaram polimorfismo no mtDNA de *Phytophthora* ao contrário do que aconteceu com o mesmo microssatélite no DNA dos cloroplastos (cpDNA) das plantas.

Modificações desta técnica como os RAMS (Random Amplified Microsatellites) que amplificam o DNA localizado entre a extremidade distal de dois microssatélites próximos (Hantula *et al.*, 1997), foram utilizados na caracterização de isolados de *P. cactorum* obtidos em hospedeiros diferentes, tendo estes marcadores moleculares evidenciado diferenciação genotípica entre os isolados em estudo.

A caracterização da variabilidade genética das populações está dependente da existência de marcadores precisos e abundantes sendo aconselhável a utilização de diferentes marcadores para obter resultados que permitam avaliar essa variabilidade (Fry *et al.*, 1993).

Os marcadores moleculares anteriormente referidos e a utilização, mais recente, da sequenciação de genes ou regiões génicas são frequentemente utilizadas em conjunto no estudo da estrutura genética da população uma vez que alguns marcadores permitem detectar maior variabilidade do que outros.

2.9. Caracterização Molecular de Populações – Epidemiologia e Dispersão em *Phytophthora*

As doenças causadas por espécies do género *Phytophthora* são unanimemente reconhecidas como das mais devastadoras e das que causam prejuízos mais elevados.

O míldio da batateira, doença associada a *P. infestans* por Anton de Bary em 1876 tem aparecido de forma mais agressiva na Europa nas duas últimas décadas

apesar dos programas de melhoramento da batateira para incorporação da resistência durável a esta doença.

Estudos de caracterização populacional identificaram o México como o centro de origem deste parasita e o vale de Tacula na sua região central para a origem da linhagem clonal designada posteriormente como US-1 que introduzida nos Estados Unidos da América passou por volta de 1884-85 para a Europa e daqui para o resto do Mundo (Goodwin, 1997).

É característica das populações que se estabelecem a partir do centro de origem possuírem menor variabilidade genética, levando as novas introduções ao aumento da variabilidade inicial ou à substituição da população existente por genótipos com vantagens adaptativas.

O conceito de linhagem clonal definido como “ todos os descendentes de um determinado genótipo que diferem da população parental apenas por mutação ou recombinação mitótica” é de grande aplicação prática em estudos de patógenos com populações homogêneas e com multiplicação apenas pela via assexual. Fry (1997) refere que este conceito em *P. infestans* teve grande utilidade por estar associado a características epidemiológicas.

A caracterização das linhagens clonais em *P. infestans* foi realizada inicialmente com base em marcadores genotípicos como: “mating type” (A1 /A2); dois ou três *locus* para Glucose-6-phosphato isomerase (*Gpi*); dois *locus* para Peptidase (*Pep*) e 25 marcadores obtidos com a sonda (RFLP) RG 57 e posteriormente complementada com a caracterização do DNA mitocondrial, caracterização por RAPDs e mais recentemente por AFLPs.

A linhagem clonal US-1 (população inicial que se estabeleceu em todo o mundo) é susceptível ao fungicida metalaxil e esta substância mantém a eficácia em populações identificadas como US-1. As linhagens clonais designadas US-6, US-7 e US-8 apresentam menor sensibilidade ao metalaxil e esta substância não é eficaz no controlo desta doença com base nestas populações. A linhagem US-6 e US-7 são agressivas em batateira e tomateiro e US-7 e US-8 são de “mating type” A2.

Ainda segundo Fry (1997) o conceito de linhagem clonal foi muito útil em estudos epidemiológicos de *P. infestans* enquanto a estrutura da população foi relativamente simples. Nos Estados Unidos e no Canadá em 1990 a população dominante era a US-6 mas depois de 1993 as linhagens dominantes passaram a ser US-7 e US-8 (Goodwin, 1997).

A identificação da linhagem predominante pode ser identificada em termos práticos pela análise do *locus Gpi* num número reduzido de isolados. Com a introdução da variabilidade genotípica e possível ocorrência de multiplicação sexual o conceito de linhagem clonal poderá ser menos útil em termos epidemiológicos uma vez que é mais difícil caracterizar um elevado número de linhagens e identificar com uma metodologia simples os novos isolados. A variabilidade genotípica influencia assim as características epidemiológicas de *P. infestans* devido à maior capacidade de sobrevivência, patogenicidade e virulência assim como maior variabilidade dos factores abióticos e no grau de resistência ao metalaxil.

Na Europa e progressivamente no resto do mundo o aparecimento na população de *P. infestans* do “mating type” A2, da resistência ao metalaxil e da maior complexidade na virulência, foi interpretada com base em estudos das aloenzimas e do DNA mitocondrial como estando associada à substituição da população US-1 por uma população de *P. infestans* de maior variabilidade genotípica.

A população de *P. infestans* tem sido caracterizada em muitos locais da Europa, da América e do Canadá, dada a importância económica da cultura e das trocas comerciais ao nível do material de propagação, para travar a introdução de novos genótipos que ponham em causa a eficácia dos meios e técnicas de luta utilizadas nesta cultura.

Em muitas outras espécies de *Phytophthora* a caracterização genotípica das populações com base em marcadores moleculares permitiu determinar a origem da doença e estudar a evolução dessa população.

P. sojae é um parasita específico de soja apresentando níveis de especificidade parasitária em cultivares desta espécie vegetal estando caracterizadas em todo o mundo 37 raças fisiológicas (Irwin *et al.*, 1995). *P. sojae* introduzida na Austrália a partir dos Estados Unidos, possui uma população patogénica que a caracterização RFLP revelou ser uma sub-população da raça 1 existente na população original.

P. sojae-raça 1 foi a primeira a ser identificada na Austrália e todas as outras raças identificadas posteriormente terão evoluído a partir de mutações ou cruzamentos entre raças existentes e em parte devido à pressão de selecção do hospedeiro (*Glycine max* (L.) Merrill uma vez que nos programas de melhoramento para a resistência a esta doença se obtiveram linhas puras contendo os genes de resistência para as raças existentes na Austrália (Irwin *et al.*, 1995).

2.10. Métodos Moleculares Baseados na Técnica PCR – Detecção e Diagnóstico em *Phytophthora*

A técnica PCR aplicada à detecção de microrganismos parasitas baseia-se no desenho de primers específicos em regiões genómicas conhecidas e em protocolos laboratoriais criteriosamente estabelecidos.

Em fitopatologia os métodos de detecção estabelecem as metodologias para constatar a presença de um determinado organismo numa determinada amostra (planta, solo, água) enquanto o diagnóstico associa a uma situação de doença as causas que a determinam.

As metodologias de detecção e diagnóstico exigem elevado grau de especificidade, sensibilidade e que os resultados sejam obtidos num período de tempo que possibilitem a aplicação das medidas fitossanitárias adequadas.

Os métodos clássicos de detecção por se basearem em técnicas de isolamento dos parasitas em cultura pura, constituem uma referência de especificidade, estabelecendo-se o diagnóstico com a aplicação dos postulados de Kock. A sensibilidade está associada à eficácia do isolamento a partir dos tecidos vegetais ou do solo.

Nos métodos de detecção baseados na técnica PCR a especificidade depende directamente dos primers, da região genómica a amplificar e das condições da reacção de PCR. A sensibilidade da detecção depende do protocolo da reacção PCR, do processo de amostragem e do processo de obtenção da amostra de DNA molde.

A complexidade da amostra influencia a sensibilidade da reacção de detecção. Em tecidos vegetais, a presença de polissacáridos e fenois que inibem a reacção PCR pode originar falsos negativos, acontecendo o mesmo em amostra de solo devido à co-extracção de ácidos húmicos.

Em amostras obtidas directamente no campo é necessário na maioria das situações usar técnicas complementares para a preparação das amostras do DNA para reduzir os factores de inibição da reacção PCR e consequentemente os resultados falsos negativos.

A reacção PCR apresenta elevada sensibilidade, tendo sido já utilizada em material fossilizado, autoclavado e das mais variadas origens (Newton & Graham, 1997). A presença de DNA, mesmo em quantidades ínfimas origina reacções positivas, ocorrendo consequentemente com muita facilidade contaminações que darão origem a reacções “falsas positivas”, que é necessário evitar. Reacções “falsas positivas”

resultam de contaminações introduzidas por aerossóis, reagentes contaminados ou manipulações inadequadas. Os métodos para reduzir os resultados “falsos positivos” baseiam-se essencialmente na manipulação cuidada de todos os reagentes da PCR e num trabalho de laboratório meticoloso. O diagnóstico com base na reacção PCR necessita assim de numerosos controlos negativos para garantir a especificidade do produto amplificado.

No género *Phytophthora* a aplicação dos métodos clássicos de detecção e identificação é difícil e morosa, não se conhecendo na maioria das situações a sensibilidade dos métodos utilizados, o que determinou em grande medida a necessidade da aplicação das novas metodologias de detecção com maior eficácia e sensibilidade.

As técnicas imunoenzimáticas de detecção e diagnóstico com grau de sensibilidade e especificidade muito elevados em vírus, fitoplasmas, bactérias e alguns fungos foram aplicados em *Phytophthora* com o objectivo de se obterem métodos fiáveis específicos e sensíveis. Os resultados obtidos com a utilização destes métodos conduziram mesmo à comercialização de “kits” de diagnóstico como os referidos por Miller *et al.* (1994). A especificidade destes métodos, no entanto, situa-se apenas ao nível do género e não ao nível da espécie de *Phytophthora* envolvida no processo de patogénese como seria desejável. Igual situação é referida por Themann *et al.* (2002) quando produziram antisoros específicos para *P. cactorum* e *P. cinnamomi* para utilizar em DAS-ELISA – (Double – Antibody – Sandwich – Enzyme – Linked Immunosorbent – Assay), tendo obtido nas duas situações desenvolvidas antisoros com especificidade ao nível do género e não da espécie pretendida.

A falta de especificidade ao nível da espécie, o aparecimento em algumas situações de reacções cruzadas com outros parasitas das raízes, a reduzida sensibilidade do método, não detectando baixos níveis de infecção e os elevados custos envolvidos na produção dos antisoros determinaram a limitada utilização prática dos métodos serológicos na detecção de *Phytophthora*.

As técnicas moleculares de detecção e diagnóstico baseadas na PCR pela sua capacidade de discriminação ao nível da espécie, pela elevada sensibilidade e universalidade da sua utilização conjugada com o conhecimento da região genómica do DNA que codifica para os ribossomas em todas as espécies de *Phytophthora* possibilitou o desenvolvimento e utilização prática destas metodologias na identificação, detecção e diagnóstico das espécies de *Phytophthora*.

No Quadro 1 estão referidas algumas das espécies de *Phytophthora* para as quais foram desenvolvidos métodos de detecção baseados no desenho de primers específicos a utilizar em reacções de PCR.

Quadro 1 – Espécies de *Phytophthora* para as quais se desenvolveram métodos de detecção baseados na técnica PCR, região genómica e técnicas utilizadas

Espécie de <i>Phytophthora</i>	Região genómica/Técnica	Reacção cruzada	Referência bibliográfica
<i>P. cactorum</i>	“Nested PCR”	<i>P. idae</i>	Lacourt <i>et al.</i> (1997)
<i>P. cambivora</i>	SCAR PCR	—	Schubert <i>et al.</i> (1999)
<i>P. cambivora</i>	ITS “Nested PCR”	—	Cacciola <i>et al.</i> (2001)
<i>P. cinnamomi</i>	Gene (<i>cinnamomina</i>) PCR	<i>P. cambivora</i>	Coelho <i>et al.</i> (1997)
<i>P. cinnamomi</i>	ITS “Nested PCR”	—	Cacciola <i>et al.</i> (2001)
<i>P. citricola</i>	ITS “Semi – Nested” PCR	—	Nechwatal <i>et al.</i> (2000)
<i>P. citrophthora</i>	Fragmento de DNA <i>PstI</i> /PCR		Érsek <i>et al.</i> (1994)
<i>P. citrophthora</i>	ITS PCR e “Nested PCR”		Ippolito <i>et al.</i> (2002)
<i>P. fragariae</i>	Fragmento clonado e sequenciado PCR	<i>P. citrophthora</i> <i>P. nicotianae</i> <i>P. capsici</i>	Stammler <i>et al.</i> (1993)
<i>P. fragariae</i>	ITS “Nested PCR”	—	Bonnants <i>et al.</i> (1996)
<i>P. fragariae</i>			Baudry (1999)
<i>P. infestans</i>	ITS2	<i>P. mirabilis</i> <i>P. phaseoli</i> <i>P. cactorum</i>	Ristaino <i>et al.</i> (1997)
<i>P. lateralis</i>	ITS “Nested PCR”	—	Winton & Hansen (2001)
<i>P. medicaginis</i>	IGS2 PCR	—	Liew <i>et al.</i> (1998)
<i>P. nicotianae</i>	ITS PCR e “Nested PCR”		Ippolito <i>et al.</i> (2002)
<i>P. parasitica</i>	Fragmento (<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>)	—	Érsek <i>et al.</i> (1994)
<i>P. quercina</i>	ITS “Nested PCR”	—	Nechwatal <i>et al.</i> (2000)

A região genómica mais utilizada para o desenho dos primers específicos é a região do DNA que codifica para os ribossomas (rDNA) baseando-se o método de detecção na realização de reacções de amplificação directamente a partir de tecidos vegetais ou em “Nested PCR” para aumentar a sensibilidade do método de detecção.

A região IGS desta mesma região genómica foi também utilizada para o desenho de primers específicos para a detecção de *P. medicaginis* por Liew *et al.* (1998).

Outras regiões genómicas como a região que codifica para as elicinas consideradas proteínas específicas do género *Phytophthora* e regiões do genoma características de uma determinada espécie, desde que conhecida a sequência de nucleotídios, foram outras abordagens utilizadas para o desenho de primers específicos a utilizar em reacções PCR.

Os métodos de diagnóstico baseados na técnica PCR, apesar de considerados fiáveis, fáceis de implementar e com elevada sensibilidade, não são ainda técnicas de rotina laboratorial no diagnóstico fitopatológico. Martin *et al.* (2000) atribuíram esta situação ao contínuo desenvolvimento de novos protocolos e de equipamentos de PCR cada vez mais automatizados e sensíveis e por outro lado à necessidade do desenvolvimento de protocolos fiáveis e reproduzíveis para a extracção do DNA a partir de tecidos vegetais e do solo dado que muitas vezes estes substratos contêm substâncias que interferem com os métodos enzimáticos de amplificação.

A aplicação das novas tecnologias na detecção e diagnóstico das espécies do género *Phytophthora* mesmo quando experimentalmente desenvolvidos para diferentes situações de doença não estão validados em termos de aplicação prática.

A validação de um método de diagnóstico envolve a participação de vários laboratórios “ring test”. O método é aplicado em todos os laboratórios “ring test” sendo avaliada a especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade quer entre laboratórios quer nas diferentes situações de aplicação.

A validação do método determina a sua utilização como método fiável ficando perfeitamente definidos os parâmetros do teste de diagnóstico, nomeadamente a época de recolha de amostras, número de amostras e tecidos a amostrar assim como o número de repetições a realizar.

Estas especificações constituirão parâmetros importantes para a aplicação dos protocolos de diagnóstico baseados na técnica PCR como método de rotina em diagnóstico.

A nível europeu o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico fiáveis, sensíveis e rápidas foram incentivadas pelo financiamento de projectos de investigação. O projecto DIAGPRO (Diagnostic Protocols for Organisms Harmful to Plants) cujo objectivo inicial foi o do estabelecimento de protocolos de diagnóstico para 15 organismos de quarentena incluídos na directiva 2000/29/EC e já publicados em <http://www.col.gov.uk/prodserv/know/Diagpro> foi alargado aos 200 organismos fitopatogénicos incluídos na directiva segundo intenção anunciada pelos promotores do projecto.

Os protocolos de detecção contribuem para a harmonização de procedimentos a nível europeu quanto às técnicas de diagnóstico dos organismos de quarentena e apesar de não constituírem por si só um meio de luta contribuem de forma decisiva para a eficácia das medidas de quarentena evitando a introdução e dispersão dos organismos prejudiciais para as culturas.

Os métodos e protocolos de diagnóstico a utilizar em cada situação dependem da natureza do organismo de quarentena em avaliação e todos os métodos de diagnóstico são utilizados para garantir a fiabilidade da detecção. Os métodos rápidos de “screening” incluem na maioria das situações os métodos imunoenzimáticos, de imunofluorescência e os métodos baseados na PCR.

Os métodos moleculares de diagnóstico baseados na PCR são métodos validados em todos os protocolos até agora publicados no Projecto DIAGPRO estando definidas para além dos protocolos específicos o processo de amostragem e o da preparação das amostras.

As medidas de protecção fitossanitária destinadas a evitar a introdução e dispersão de organismos prejudiciais aos vegetais estão uniformizadas a nível europeu pela directiva 2000/29/CE e consagrada na ordem jurídica interna de Portugal através do Decreto-Lei nº 517/99. Neste Decreto-Lei apenas *P. fragariae* Hickman var. *fragariae* é considerado um organismo de quarentena no conjunto das espécies do género *Phytophthora*. Este organismo considerado importante para toda a comunidade e estando já presente em alguns locais da comunidade, exige-se especificamente que o material vegetal destinado à plantação seja originário de áreas reconhecidas como isentas deste organismo prejudicial e não se observem sintomas da sua presença no local de produção, desde o início do último ciclo vegetativo completo.

Outra espécie do género *Phytophthora*, *P. ramorum* Werres, De Cock & Man in't Veld sp. nov., foi recentemente incluída na lista dos organismos prejudiciais pela

Portaria nº 1485-2002 em consequência do disposto na decisão 2002/757/CE da Comissão relativa a medidas fitossanitárias provisórias de emergência destinadas a impedir a introdução e dispersão de organismos prejudiciais dos vegetais na Comunidade. Para esta espécie exige-se que os vegetais susceptíveis originários dos EUA sejam acompanhados de certificado fitossanitário e passaporte fitossanitário para poder circular na comunidade. Para os isolados europeus desta espécie determinaram-se medidas de erradicação que constam da destruição dos vegetais infectados e de todos os vegetais susceptíveis a uma distância de 2 m dos vegetais infectados. Os vegetais susceptíveis num raio de 10 m e os lotes afectados são retidos no local de produção e submetidos a inspecções adicionais.

As doenças associadas a *Phytophthora* que atacam as raízes conduzem invariavelmente à morte do hospedeiro. Acrescenta-se ainda a não menos gravosa inviabilização cultural desse solo dado que introduzido o parasita rapidamente se multiplica e dissemina. As soluções fitotécnicas baseadas em plantas resistentes nem sempre estão disponíveis e as medidas de luta química quando eficazes têm um efeito efêmero em plantas lenhosas como o castanheiro. A produção de material de propagação isento de propágulos destes parasitas é assim um requisito básico para evitar a dispersão destas doenças para áreas cada vez mais alargadas.

A actividade de produção de material de propagação está regulamentada a nível europeu para garantir a qualidade sanitária e identidade varietal das espécies produzidas em viveiro. Em Portugal a Portaria 106/96 de 9 de Abril regula a produção e comercialização de material vegetal em viveiro (*Conformitas Agraria Communitatis* – CAC). Este regulamento inicialmente aplicado a espécies frutícolas foi, pela Portaria n.º 29/2003 de 14 de Janeiro, alargada a outras espécies produzidas em viveiro onde o castanheiro se encontra incluído.

A produção de material CAC corresponde ao padrão de qualidade mínimo para comercialização de material de propagação dos vegetais estando uniformizada a nível europeu. Em relação ao material de propagação dos vegetais produzido em viveiros existe ainda “material certificado” com um nível de maior exigência em termos sanitários e com regulamentação própria em cada país da União Europeia.

No material de viveiro de categoria “certificado” são controladas, nas diferentes etapas de produção, todas as viroses prejudiciais à espécie em causa e a planta quando comercializada está isenta desses vírus além de maiores exigências na garantia da qualidade sanitária e identidade varietal.

As medidas legislativas (quarentena no sentido lato) que regulamentam em termos sanitários os materiais de viveiro classificam as espécies de *Phytophthora* que atacam as raízes das plantas e fungos do solo como *Verticillium* spp., *Armillaria* spp. e *Roselinia necatrix* como organismos prejudiciais, reflectindo desta forma a importância destes parasitas na viabilidade biológica e económica das plantas. No entanto, estão longe de garantir a ausência de propágulos no material de propagação não existindo mesmo esquemas de certificação para este tipo de parasitas.

A I & D apesar de unanimemente considerar estes parasitas das raízes dos vegetais como extremamente prejudiciais e de todo o esforço no sentido de produzir metodologias de detecção, identificação e quantificação adequadas a este tipo de patogénios ainda não produziu e validou metodologias adequadas e com um grau de sensibilidade que possam ser aplicadas às situações de produção de plantas em viveiro.

Os métodos moleculares baseados na técnica PCR pela fiabilidade, sensibilidade do diagnóstico, facilidade de aplicação a um número elevado de amostras e rapidez na obtenção dos resultados, constituem uma ferramenta fundamental para o desenvolvimento das metodologias necessárias para que os métodos preventivos baseados na produção de plantas isentas destes parasitas sejam eficazes e efectivas.

A detecção dos pontos críticos no processo de produção das plantas em viveiro contribuirá de igual forma para a obtenção de plantas isentas de propágulos e de boa qualidade sanitária, medida considerada de grande utilidade no combate a estas doenças.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolamento de *Phytophthora* spp. Associada com a Doença da Tinta do Castanheiro

A estratégia para obtenção de isolados de *Phytophthora* patogénicos em castanheiro na região de Bragança/Vinhais baseou-se no isolamento em planta-armadilha.

Os isolados foram obtidos de castanheiros jovens existentes na área de influência de um castanheiro adulto com sintomas evidentes da doença da tinta. A amostragem decorreu de Junho a Setembro, época do ano em que é normal existirem nos soutos este tipo de material vegetal.

Na região de Bragança e Vinhais (Figura 7) seleccionaram-se soutos que manifestavam sintomas característicos da doença da tinta. A doença evidencia-se pela presença de árvores mortas, em declínio ou pela presença de árvores em apoplexia ou seja que iniciaram o ciclo vegetativo e tiveram uma morte fulgurante.

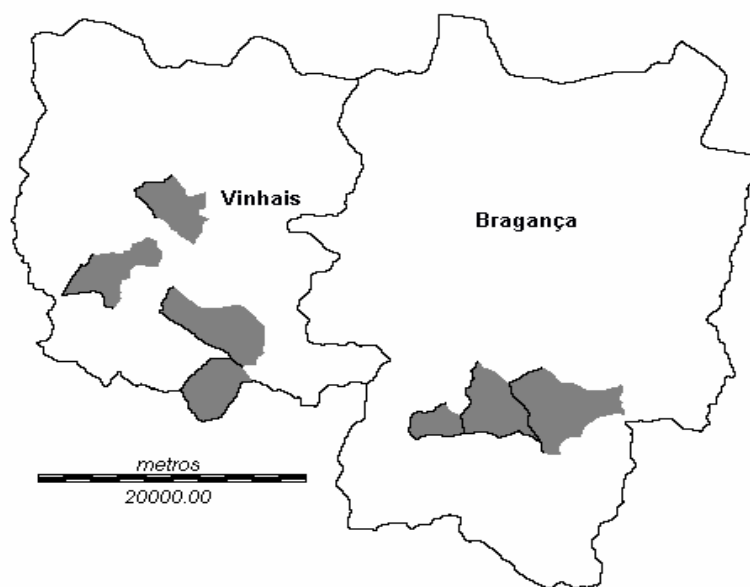


Figura 7 – Locais de Bragança e Vinhais onde se isolou *Phytophthora* spp. associada com a doença da tinta do castanheiro (*Castanea sativa*) nas acções de prospecção.

Em cada árvore adulta com sintomas da doença da tinta fez-se a avaliação do grau de ataque (árvore morta, sintomas evidentes e sintomas ligeiros) e recolhem-se todos os castanheiros jovens existentes de forma que alguma terra acompanhe o castanheiro. Nesta época do ano os castanheiros jovens não apresentam sintomas de doença e serão destruídos, na sua maioria, pelas lavouras de final de Verão.

O isolamento é realizado em tecidos do córtex da raiz e do colo da planta. Os tecidos são desinfectados com hipoclorito de sódio a 3 % durante 3 minutos, posteriormente passados por água destilada e retirado o excesso de água por pressão com papel absorvente.

Utilizou-se o meio de cultura selectivo P₁₀VPH de Tsao e Guy (1977) tendo-se substituído o meio base por PDA (39 g L⁻¹, Difco) mantendo-se todos os outros constituintes nas proporções indicadas (PCNB – 100 mg L⁻¹; hymexazol – 50 mg L⁻¹; vancomicina – 200 mg L⁻¹; pimaricina – 10 mg L⁻¹).

A identificação de *Phytophthora* é realizada por observação microscópica das hifas. As observações iniciam-se às 48 horas e mantêm-se até ao sétimo dia, altura em que a contaminação das placas com microrganismos de crescimento mais rápido suprime o desenvolvimento de *Phytophthora*.

A purificação dos isolados é conseguida por repicagens sucessivas em meio P₁₀VPH sendo conservados em PDA (39 g L⁻¹, Difco) a 16 °C e repicados cada 10 – 12 meses. Alternativamente, os mesmos isolados foram conservados em água destilada e estéril a 16 °C, às escuras. Por este último processo de manutenção, a viabilidade dos isolados é muito alargada no tempo não sendo necessário proceder a repicagens regulares como no processo referido anteriormente.

Nem todos os isolados de *Phytophthora* spp. foram obtidos em acções de prospecção nos soutos da região de Bragança/ Vinhais. Alguns isolados resultaram de acções de diagnóstico (Quadro 2). Nestes casos, os isolados foram obtidos de plantas de castanheiro com sintomas característicos da doença da tinta. O meio de cultura, o processo de isolamento dos tecidos vegetais e manutenção dos isolados foi realizado como o descrito anteriormente.

Os isolados obtidos do solo (Quadro 2) resultaram de acções de prospecção de *Phytophthora* em castanheiros com três anos de plantação onde se recolheram plantas com sintomas da doença ou amostras de solo junto de plantas que entretanto tinham morrido.

Quadro 2 – Isolados de *Phytophthora* spp. associados com a doença da tinta do castanheiro (*Castanea sativa*) obtidos por diferentes técnicas de isolamento na região Norte de Portugal

Isolado	Ano de isolamento	Local	Concelho	Hospedeiro	Técnica de isolamento
801	1998	Rossas	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
802	1998	Rossas	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
803	1998	Rossas	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
804	1998	Rossas	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
806	1998	Rossas	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
807	1998	Rossas	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
808	1998	Rossas	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
809	1998	Rossas	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
810	1998	Rossas	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
811	1998	Sobreiró	Vinhais	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
812	1998	Agrochão	Vinhais	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
813	1998	Agrochão	Vinhais	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
814	1998	Espinhoso	Vinhais	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
816	1998	Pinela	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
817	1998	Pinela	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
818	1998	Pinela	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
819	1998	Penhas Juntas	Vinhais	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
820	1998	Penhas Juntas	Vinhais	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
821	1998	Amarante	Amarante	<i>Castanea sativa</i>	Diagnóstico
822	1998	Amarante	Amarante	<i>Castanea sativa</i>	Diagnóstico
823	1998	Amarante	Amarante	<i>Castanea sativa</i>	Diagnóstico
824	1998	Amarante	Amarante	<i>Castanea sativa</i>	Diagnóstico
825	1998	Amarante	Amarante	<i>Castanea sativa</i>	Diagnóstico
826	1998	Amarante	Amarante	<i>Castanea sativa</i>	Diagnóstico
827	1998	Amarante	Amarante	<i>Castanea sativa</i>	Diagnóstico
828	1998	Agrochão	Vinhais	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
831	1998	Penhas Juntas	Vinhais	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
202	1992	Bornes	M. Cavaleiros	<i>Castanea sativa</i>	Diagnóstico
609	1996	Bornes	M. Cavaleiros	<i>Castanea sativa</i>	Diagnóstico
610	1996	Bornes	M. Cavaleiros	<i>Castanea sativa</i>	Diagnóstico
704	1997	Rossas	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
709	1997	Agrochão	Vinhais	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
112	2001	Paredes	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Diagnóstico
115	2001	Paredes	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Diagnóstico
120	2001	Paredes	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Diagnóstico
122	2001	Paredes	Bragança	Solo	Tecido Armadilha
123	2001	Paredes	Bragança	Solo	Tecido Armadilha
124	2001	Paredes	Bragança	Solo	Tecido Armadilha
125	2001	Paredes	Bragança	Solo	Tecido Armadilha
128	2001	Paredes	Bragança	Solo	Tecido Armadilha
129	2001	Paredes	Bragança	Solo	Tecido Armadilha
130	2001	Paredes	Bragança	Solo	Tecido Armadilha
135	2001	Paredes	Bragança	Solo	Tecido Armadilha
101	2001	Arufe (Rossas)	Bragança	<i>Castanea sativa</i> *	Diagnóstico
102	2001	Arufe (Rossas)	Bragança	<i>Castanea sativa</i> *	Diagnóstico
105	2001	Rossas	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
106	2001	Rossas	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
107	2001	Rossas	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha
108	2001	Rossas	Bragança	<i>Castanea sativa</i>	Planta Armadilha

* - Plantas de castanheiro com 6 anos de plantação

Os isolados obtidos de plantas com sintomas foram realizados em meio selectivo P₁₀VPH como o descrito anteriormente e para os isolados a partir do solo utilizou-se a técnica de tecido armadilha. Como tecido armadilha utilizaram-se discos de folha de castanheiro com 0,5 cm de diâmetro. Os tecidos armadilha foram postos a flutuar numa mistura de terra e água na proporção de 1:4 (v/v) em condições de luz e temperatura ambiente.

Às 24, 48 e 72 horas retiram-se discos de tecido armadilha e procede-se ao isolamento em meio selectivo P₁₀VPH como o descrito anteriormente.

3.2. Outros Organismos Utilizados neste Estudo

3.2.1. Espécies de *Phytophthora*

As culturas de referência das espécies de *Phytophthora* foram adquiridos na colecção internacional do Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) da Holanda e na Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), depois da respectiva autorização emitida pelo Ministério da Agricultura de Portugal.

Quadro 3 – Culturas de referência das diferentes espécies de *Phytophthora* utilizados neste estudo.

Espécie	Código	Hospedeiro	Grupo	Mating type	Depositor e ano
<i>Phytophthora cactorum</i>	CBS 304.53	<i>Malus sylvestris</i>	I	Homotática	Beverwijk /1953
<i>Phytophthora cambivora</i>	CBS 248.60	<i>Castanea sativa</i>	VI	-	Grente /1960
<i>Phytophthora capsici</i>	CBS 521.77	<i>Capsicum annum</i>	II	A ₁	Steekelenburg /1977
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	CBS 270.55	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	VI	-	Buddenhagen/ 1955
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	CBS 341.72	<i>Camellia japonica</i>	VI	A ₁	Zentmyer/ 1972
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	CBS 342.72	<i>Persea gratissima</i>	VI	A ₂	Zentmyer/ 1972
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	CECT 2965	<i>Castanea sativa</i>	VI	-	Grente/ 1959
<i>Phytophthora cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>	CBS 441.96	<i>Baucamea sp.</i>	VI	-	Marwitz/ 1996
<i>Phytophthora citricola</i>	CBS 221.88	<i>Citrus sinensis</i> (fruit)	III	Homotática	Clark/ 1987
<i>Phytophthora cryptogea</i>	CBS 307.62	<i>Godetia sp.</i>	VI	A ₂	Gallegly/ 1962
<i>Phytophthora nicotianae</i>	CBS 535.92	-	II	-	-
<i>Phytophthora quercina</i>	CBS 789.95	<i>Quercus cerris</i> (Rizosfera)	-	-	Jung/ 1995
<i>Phytophthora syringae</i>	CECT 2351	-	III	Homotática	Tuest/ 1990

CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures

CECT- Colección Española de Cultivos Tipo

3.2.2. Outros Organismos

Foram ainda utilizados neste estudo isolados de *Phytophthora* obtidos em noqueira (isolado 210), *P. cinnamomi* (80-IMI 335492) isolado de referência em ensaios de inoculação, *Cryphonectria parasitica* obtida de castanheiros com cancro americano, *Rhodoturula mucilaginosa* isolada do mel, *Pythium* sp. obtido quando da realização dos isolados de *Phytophthora* em castanheiro e plantas jovens de castanheiro (*Castanea sativa*) para extracção de DNA e inoculação com *P. cinnamomi*.

3.2.3. *Escherichia coli*

Utilizou-se a estirpe *E. coli* DH 5 α : *supE44* Δ *lac* U169 (Φ 80 *lac* Z Δ M15) *hsd* R17 *recA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*.

E. coli cresceu a 37 °C em meio LB (0,5 % Bacto extracto de levedura, 1 % Bacto triptona, 1 % NaCl) a que se adiciona agar a 2 % quando se pretendem meios sólidos. O crescimento em meio líquido realiza-se em incubadora orbital a 250 rpm a 37 °C durante 12 horas. Quando é necessário a selecção de clones com resistência à ampicilina, os meios são adicionados com 50 μ g mL⁻¹ deste antibiótico.

A bactéria conservou-se em glicerol a 50 % e a temperatura de -80 °C.

3.3. Vector de Clonagem

Utilizou-se como vector de clonagem o plasmídeo multicópia pGEM[®]-T (Figura 8). Este plasmídeo com 3.0 kb da Promega é um sistema adequado para clonar produtos de PCR uma vez que a *Taq* polimerase incorpora desoxiadenosinas nos extremos 3' do fragmento de DNA sintetizado na reacção de PCR.

O vector pGEM[®]-T contém o gene de resistência à ampicilina para selecção e multiplicação em *E. coli*. Possui ainda uma região de múltiplos sítios de clonagem incluída na região do gene *Lac Z* que codifica para um α péptido de uma β -galactosidase. Os clones que contêm inserções nesta região identificam-se directamente pela ausência de cor azul em placas de LB com ampicilina a que se

adicionou X-Gal e IPTG (a cor azul das colónias é consequência da actividade do péptido α da β -galactosidase).

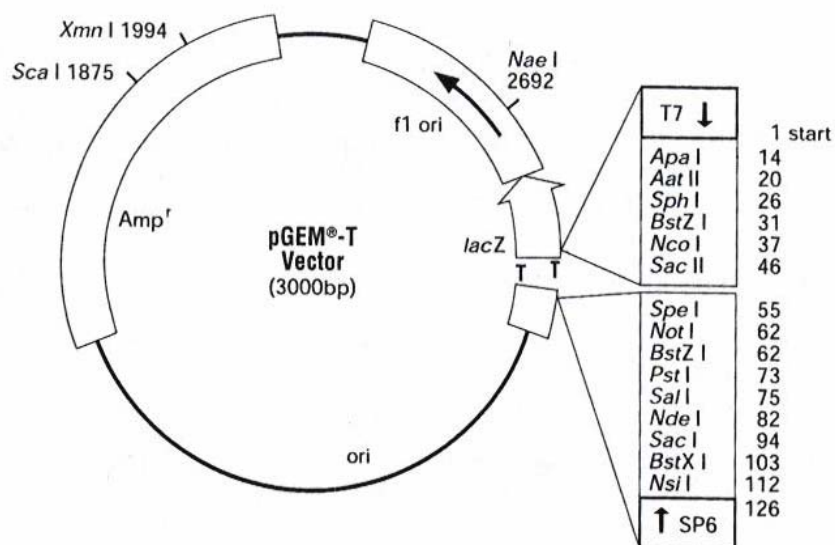


Figura 8 – Plasmídeo pGEM®-T utilizado na clonagem dos fragmentos de DNA amplificados por RAPD – PCR.

Possui ainda os promotores das RNA polimerase T₇ e Sp₆ que permitem a transcrição “*in vivo*” e “*in vitro*” das sequências e a origem de replicação do fago filamentosos f₁ que permite obter DNA de cadeia simples no sentido universal e reverso úteis para sequenciar o fragmento clonado.

3.4. Formação de Oósporos “*in vitro*” e suas Características Morfológicas

Para determinar o tipo de compatibilidade sexual (A1 ou A2) utilizou-se o método de Kellam & Zentmyer (1986). Os isolados em estudo crescem em meio de cenoura clarificado (200g de cenoura ralada, 20 g de agar, prefazer a um litro com água destilada) durante 4 dias assim como as culturas de referência de *P. cinnamomi*

de compatibilidade sexual conhecida; *P. cinnamomi* (341.72 – A1) e *P. cinnamomi* (342.72 – A2).

Troços com aproximadamente um cm de diâmetro retirados de culturas em activo crescimento são verticalmente pareados, colocando-se entre eles meio de cenoura não inoculado: um dos troços é de compatibilidade sexual conhecida (A1 ou A2) e o outro é do isolado que se pretende estudar (método sandwich).

As placas são colocadas a 20-22 °C às escuras, uma vez que a luz impede a formação dos oósporos. Após seis dias de incubação retira-se o troço central e observa-se ao microscópio.

A presença de oósporos no pareamento com culturas de compatibilidade sexual de tipo A1 determina que o isolado em estudo é de tipo A2, sendo de tipo A1 se ocorrer formação de oósporos no pareamento com culturas de compatibilidade sexual A2. Com este método realizaram-se pareamentos de todos os isolados em estudo com *P. cinnamomi* A1 (341.72), *P. cinnamomi* A2 (342.72) e ainda o autopareamento de todos os isolados.

Ao microscópio identificam-se as estruturas morfológicas presentes: hifas, clamidósporos, oósporos. Na presença de oósporos classifica-se o tipo de anterídio (anfigíneo ou paragíneo) o número de células que apresenta e realizam-se, em 10 destas estruturas reprodutivas, as seguintes medições micrométricas: largura e comprimento do anterídio, diâmetro do oógonio e do oósporo.

3.5. DNA Genómico e Soluções de DNA

3.5.1. Obtenção de DNA Genómico de *Phytophthora*

3.5.1.1. Crescimento em Celofane-PDA (C-PDA)

O micélio para extracção do DNA genómico foi obtido de todos os isolados em estudo por crescimento em celofane-PDA (C-PDA). Colocam-se círculos de celofane, depois de autoclavado, sobre placas de Petri com 15 mL de PDA. As placas são mantidas abertas na câmara de fluxo laminar para que toda a água remanescente se evapore.

A inoculação das placas de C-PDA é realizada como habitualmente, colocando pequenos círculos de meio com micélio retirado de colónias em activo crescimento. As placas são colocadas a incubar às escuras durante 4-6 dias a 22-24 °C. O micélio é retirado com espátulas esterilizadas e colocado em tubos eppendorf de 1,5 mL de capacidade procedendo-se de imediato à extracção do DNA genómico.

3.5.1.2. Extracção de DNA Genómico

O DNA dos isolados de *Phytophthora* utilizados neste estudo obteve-se a partir de micélio que cresceu em C-PDA. Todo o material utilizado (vidro, plástico, papel) foi previamente esterilizado em autoclave a 120 °C durante 15 minutos.

A extracção de DNA foi efectuada em tubos eppendorf de 1,5 mL e compreende os seguintes procedimentos:

A 100 mg de micélio adicionam-se 10 mg de areia estéril (seasand, Fluka), 10 mg de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP, Sigma) e 750 µL de buffer de extracção (SDS a 0,5% em 200 mM Tris HCl, pH 7.5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA).

O micélio é fragmentado com homogenizadores de plástico. O homogeneizado assim obtido é centrifugado a 13000 rpm durante 5 minutos, removendo-se o sobrenadante para um microtubo limpo. As proteínas são retiradas da solução aquosa pela adição de 500 µL de fenol/clorofórmio/isoamilalcool (25:24:1) e centrifugação a 13000 rpm durante 5 minutos. A fase aquosa é cuidadosamente transferida para um microtubo limpo e o DNA aí existente é precipitado com isopropanol por centrifugação a 13000 rpm durante 10 minutos. O precipitado é limpo com 1000 µL de etanol frio a 70% (v/v) e centrifugado a 13000 rpm durante 2 minutos. Retira-se o excesso de etanol e deixa-se secar à temperatura ambiente. O precipitado é ressuspenso em água ultra pura esterilizada (SDW) com RNase (5 mg mL⁻¹). As amostras de DNA genómico conservaram-se a -20 °C.

3.5.2. Purificação de Soluções de DNA

Para remover proteínas de soluções de DNA faz-se a extracção com fenol:clorofórmio, seguida de extracção com clorofórmio. Alternativamente a extracção pode ser realizada com fenol: clorofórmio: isoamilalcool (25:24:1) seguida de extracção com clorofórmio, para remover os resíduos de fenol dos ácidos nucleicos.

Para realizar o protocolo de purificação adicionam-se à solução de DNA, 100 µL de tampão TE (100 mM Tris HCl; 1 mM EDTA pH 8) e 100 µL de fenol: clorofórmio (1:1) e por inversão do tubo obtém-se uma emulsão. Centrifuga-se a mistura a 12000 rpm durante 3 minutos, aumentando-se este período se as fases não ficarem perfeitamente separadas. Transfere-se a fase aquosa para um microtubo limpo e repete-se o processo até que não sejam visíveis proteínas na interface orgânica e aquosa.

Adiciona-se, depois, igual volume de clorofórmio e repetem-se os procedimentos anteriormente descritos. Finaliza-se com a precipitação dos ácidos nucleicos com etanol.

3.5.3. Concentração de DNA

Para a concentração dos ácidos nucleicos utilizou-se a precipitação em isopropanol ou etanol na presença de acetato de sódio (0,3 M, pH 5.2) seguido de centrifugação. O precipitado é dissolvido em água ou TE (100 mM Tris HCl; 1 mM EDTA, pH 8) de forma a conseguir-se a concentração pretendida.

3.5.4. Quantificação de DNA

3.5.4.1. Espectrofotometria

A quantificação e pureza do DNA efectuou-se por espectrofotometria. Fizeram-se diluições das amostras de DNA antes de medir a absorvância a 260 e 280 nm num espectrofotómetro (Cary 50 Scan - Varian). A pureza do DNA avaliou-se pela relação entre os dois valores de absorvância (OD_{260}/OD_{280}). Valores desta relação de 1,8 são

característicos de soluções de DNA puro enquanto valores inferiores são indicadores de contaminações com proteína ou fenol.

A quantidade de DNA presente nas soluções foi calculada considerando que uma unidade de absorvância a 260 nm corresponde a 50 µg de DNA (Sambrook *et al.*, 1998).

3.5.4.2. Quantificação por Fluorescência de BrEt

A concentração de DNA genómico ou fragmentos de DNA obtidos por PCR estimou-se por electroforese em géis de agarose comparando-se a intensidade das bandas com a intensidade de marcadores de DNA de concentração conhecida. Este processo foi utilizado em quantificação de rotina e quando as amostras tinham baixas concentrações de DNA.

3.6. Identificação das Espécies de *Phytophthora* por Métodos Moleculares

A região do genoma que codifica para a produção do RNA dos ribossomas (rDNA) é constituído por sequências de DNA muito conservadas nas sub-unidades do gene e zonas de maior variabilidade situadas entre as diferentes subunidades.

O estudo das regiões ITS do rDNA em *Phytophthora* tem evidenciado que a acumulação de mutações nesta região se aproxima do nível de especiação, razão que determinou a sua utilização nos estudos de sistemática e evolução assim como em diagnóstico e identificação.

O método de identificação baseia-se na amplificação por PCR da região ITS. A região amplificada (ITS1, 5.8S e ITS2) é digerida com 2 – 3 enzimas de restrição. Os perfis de digestão enzimática (característicos da espécie) permitem por comparação com a base de dados identificar, ao nível da espécie, os isolados de *Phytophthora*.

A identificação dos isolados pode ainda ser realizada pela sequenciação dos nucleótidos da região amplificada e comparação com as sequências desta região do genoma depositadas na base de dados EMBL ou NCBI pelo algoritmo FASTA (Pearson & Lipman, 1988).

3.6.1. Identificação por PCR-RFLP da Região ITS – rDNA

3.6.1.1. Amplificação da Região ITS1, 5.8S e ITS2 do rDNA por PCR

3.6.1.1.1. Primers

O DNA da região que codifica para os ribossomas foi amplificado pelos primers universais ITS6 e ITS4. O primer ITS6 é semelhante ao ITS5 de White *et al.* (1990). As alterações na sequência dos nucleótidos propostas por Cooke & Duncan (1997) resultaram de estudos da sequência 18S rDNA em *P. megasperma* (Forter *et al.*, 1990) permitindo uma maior especificidade e eficácia na ampliação de *Phytophthora* pela reação PCR.

O ITS4 de White *et al.* (1990) é um primer universal em eucariotas localizado na extremidade 5' do gene 28S rDNA, localizando-se o primer ITS6 (Cooke & Duncan, 1997) na extremidade 3' do 18S rDNA como o indicado na Figura 9.

ITS6 – 5' GAA GGT GAA GTC GTA ACA AGG 3'

ITS4 - 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'

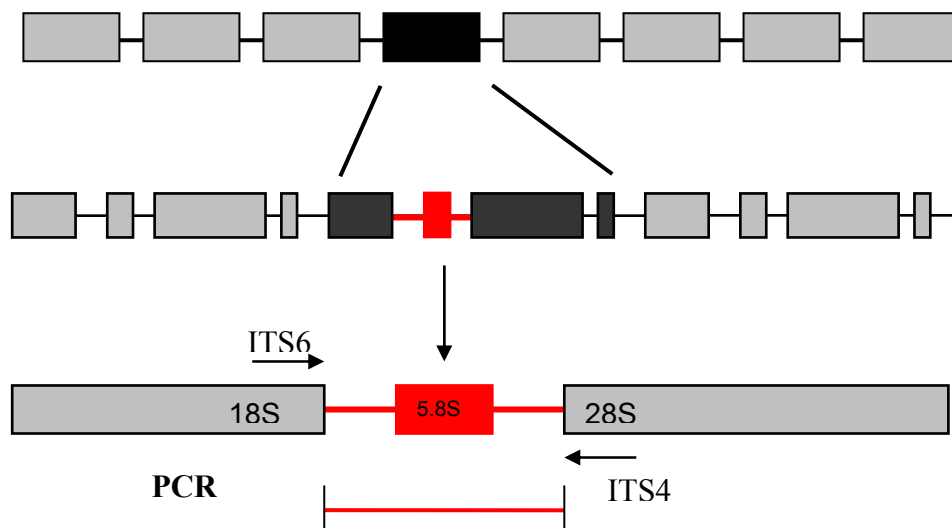


Figura 9 – Representação esquemática da organização das unidades repetitivas do genoma que codificam para o RNA dos ribossomas e localização dos primers ITS6 (Cooke & Duncan, 1997) e ITS4 (White *et al.*, 1990) utilizados na amplificação do fragmento de DNA – ITS1, 5.8S e ITS2 em *Phytophthora*.

3.6.1.1.2. Condições Químicas e Físicas da Reacção PCR

As reacções de PCR foram realizadas num volume final de 25 µL. As condições químicas foram empiricamente ajustadas tendo-se obtidos resultados consistentes nas seguintes condições: 100 µM de cada dNTPs, 20 pmoles de cada primer, 1,5 mM de MgCl₂, buffer da enzima na concentração final 1×, uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Promega), BSA (Bovine Serum Albumin) na concentração de 0,1 mg mL⁻¹, 1 µL de DNA e água ultra pura esterilizada até perfazer o volume final da reacção.

As reacções de PCR foram realizadas num termociclador UNO II (Biometra). A reacção inicia-se com um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C durante 3 minutos seguido-se 35 ciclos de amplificação com os seguintes parâmetros: 55 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos e 94 °C durante 30 segundos. A reacção terminou com um período final de extensão a 72 °C durante 10 minutos.

3.6.1.1.3. Digestão Enzimática da Região Genómica – ITS1, 5.8S e ITS2

Utilizaram-se as enzimas de restrição *Msp* I, *Alu* I e *Taq* I (Promega) para o estudo do polimorfismo da região ITS1, 5.8S e ITS2. A reacção ocorreu a 37 °C durante toda a noite, tendo-se utilizado 10 µL de produto PCR e seguindo as condições de reacção indicadas pela casa comercial.

A enzima *Taq* I origina fragmentos de pequena dimensão e por isso difíceis de visualizar de forma adequada nos géis de agarose, razão pela qual não se realizou em todos os isolados *Phytophthora*.

3.6.1.1.4. Electroforese de Fragmentos de DNA

A separação dos fragmentos do DNA em função do seu tamanho realizou-se mediante electroforese em géis de agarose. A concentração de agarose varia com o tamanho do fragmento a separar tendo-se utilizado concentrações de agarose de 1,5 % para os fragmentos obtidos na reacção PCR e NuSieve® (BMA) a 2,5 % para a resolução dos perfis das enzimas *Msp* I e *Alu* I e 3,5 % para a enzima *Taq* I que origina

muitos fragmentos inferiores a 100 pb. A migração realizou-se a corrente constante (50 - 70 V).

Os tampões utilizados foram o TAE (Tris - Acetato 40 mM; EDTA 1 mM) ou TBE (Tris – Borato, 90 mM; EDTA 2 mM pH 8.0).

Para visualização dos fragmentos de DNA através de iluminação UV adicionou-se aos geis Br Et ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Utilizaram-se câmaras de electoforese Bio-Rad ligadas a fontes “Bio-Rad Power-Pac 200” (Bio-Rad).

O DNA foi visualizado em luz UV, fotografado e guardado em suporte informático pelo sistema Eagle Eye® II (Stratagene).

A dimensão dos fragmentos foi estimada em pares de bases por comparação com o marcador de tamanhos de 100 bp Ladder (Promega) no programa Diversity Database (Bio-Rad) e comparados com os valores da base de dados disponibilizados pelo CABI Bioscience e de acesso livre na web em www.phytlID.org para identificação das espécies em estudo.

3.6.2. Identificação das Espécies de *Phytophthora* por Comparação da Sequência dos Nucleótidos da Região ITS1, 5.8S e ITS2

3.6.2.1. Purificação e Sequenciação dos Fragmentos do DNA Correspondentes à Região ITS1, 5.8S e ITS2

O DNA amplificado por PCR com os primers universais ITS6, ITS4 foi purificado para se proceder à sequenciação dos nucleótidos. Este processo de purificação envolve a remoção do gel e a separação do fragmento de DNA da matriz da agarose. Depois de removido do gel de agarose os fragmentos de DNA foram purificados utilizando o kit Wizard[®] – PCR Preps DNA Purification System (Promega) seguindo as instruções do fabricante.

Para a sequenciação dos fragmentos de DNA da região ITS1, 5.8S e ITS2 utilizaram-se 50 – 150 ng de DNA molde e 5 pmoles de cada um dos primers iniciadores ITS6 e ITS4 num total de 8 μL de reacção.

A sequenciação foi realizada na Universidade de Salamanca num sequenciador automático de DNA.

As sequências de nucleótidos foram analisadas com o programa de bioinformática “BioEdit” disponível no servidor European Bioinformatics Institute (EBI) com acesso livre na Web (www.ebi.ac.uk). No mesmo servidor analisaram-se as sequências com a utilização do programa ClustalW para avaliar a similaridade entre as diferentes sequências e o programa FASTA (Pearson & Lipman, 1988) para a pesquisa da homologia com outras sequências de nucleótidos da base de dados da EMBL ou bases de dados de proteínas como a da Swiss-Prot.

3.7. Caracterização Molecular dos Isolados de *Phytophthora* por RAPD-PCR

As reacções de amplificação de DNA genómico utilizando primers com 10 nucleótidos, primers “10-mer”, de sequência arbitrária e utilizando apenas um primer por reacção, proporcionam padrões de amplificação que são utilizados com marcadores genéticos neutros. A amplificação ocorre em locais específicos do genoma não se conhecendo as características dessa região.

O número de produtos em cada reacção depende da sequência do primer da sequência do genoma e do seu tamanho. Assumindo a distribuição aleatória de determinada sequência (“10-mer” primer) no genoma a teoria das probabilidades indica que o número de produtos amplificado é de aproximadamente $2.5 \times 10^{-9} \times G$, sendo G o tamanho do genoma em pb (Operon Technologies).

O género *Phytophthora* com um genoma que varia entre 6.2×10^7 a 2.4×10^8 pb (Judelson, 2002) determina, em termos teóricos, que muitos primers não amplificarão qualquer produto no genoma de *Phytophthora* o que nos levou a testar inicialmente um elevado número de primers.

Realizaram-se amplificações RAPD nas espécies de *Phytophthora* de referência, *P. cinnamomi* (341.72; 342.72; 2965; 270.55) *P. cinnamomi* var. *parvispora*, *P. cambivora*, *P. cactorum*; *P. capsici*, *P. citricola*; *P. cryptogea*; *P. nicotianae*; *P. quercina*; *P. syringae*. Tendo-se ainda incluído dois isolados de *P. cinnamomi* isolados de castanheiro (80, 822) e dois isolados de *P. cambivora* igualmente isolados de castanheiro (101, 102).

Este estudo foi posteriormente alargado a uma população de *Phytophthora* (Paredes), com os primers “10-mer” que evidenciaram polimorfismo em *P. cinnamomi*.

3.7.1. Primers “10-mer” e Condições Físicas e Químicas da Amplificação

Utilizaram-se todos os oligonucleótidos iniciadores “10-mer” da série O (OPO-1 a OPO-20) e os vinte oligonucleótidos da série U (OPU-1 a OPU-20).

As reacções de amplificação foram realizadas num volume final de 25 µL no tremociclador UNO II (Biometra), contendo: 100 mM de cada dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 µL de buffer da enzima (buffer B), 20 pmoles de cada primer “10-mer”, uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Promega) e 1 uL DNA genómico depois de diluído em água ultra pura e esterilizada na proporção de 1:20.

As reacções foram programadas com um ciclo inicial de desnaturação do DNA a 94 °C durante 3 minutos a que se seguiram 40 ciclos de amplificação com 94 °C, 30 segundos; 36 °C, 30 segundos e 72 °C, 30 segundos terminando a reacção com um período de extensão final de 5 minutos a 72 °C.

Os produtos amplificados separaram-se em géis a 1,4 % de agarose nos quais se incluiu um marcador de tamanho de 100 pb (Promega) sendo os géis visualizados, fotografados e colocados em suporte informático no sistema Eagle Eye ® (Stratagene).

3.7.2. Análise dos Perfis RAPD-PCR

O perfil das bandas de amplificação em cada um dos isolados e para cada um dos primers foi analisado no programa Diversity Database (Bio-Rad) considerando a presença/ausência (1/0) dos produtos de amplificação com a mesma dimensão. Utilizou-se o coeficiente de Dice para o cálculo da similaridade entre os isolados em estudo e os dendrogramas foram gerados pelo programa Diversity Database usando o método Ward's.

3.8. Sensibilidade dos Isolados de *Phytophthora* spp. ao metalaxil “*in vitro*”

Da extremidade de cada isolado em activo crescimento retiram-se discos com 5 mm de diâmetro que são colocados em placas de Petri de 90 mm de diâmetro com 15 mL de PDA a que se adicionou Ridomil 5G[®] (Syngenta) de forma a obter-se a concentração em metalaxil de 1 µg mL⁻¹. O Ridomil 5G[®] foi dissolvido em água e esterilizado por filtração antes de ser adicionado ao meio de cultura.

Com esta concentração testaram-se todos os isolados e realizam-se 3 repetições por isolado. As placas incubaram a 22-24 °C às escuras.

Os isolados que evidenciaram crescimento a esta concentração foram testados novamente na concentração de 1 µg mL⁻¹, 10 µg mL⁻¹ e 20 µg mL⁻¹ de metalaxil, em dois ensaios independentes e com três repetições por isolado e concentração em estudo.

A determinação do EC₅₀ (concentração de metalaxil que causa 50 % de inibição do crescimento) em cada isolado foi estimada pela recta de regressão linear obtida pela transformação “probit” da percentagem de inibição e pela transformação logarítmica da concentração da substância fungicida.

O padrão de referência para o crescimento foi obtido em cada isolado pelo crescimento em PDA sem adição de qualquer substância.

O crescimento foi avaliado pela medição do diâmetro da colónia em duas direcções perpendiculares.

3.9. Marcador Molecular Específico (SCAR) para a Detecção e Identificação de *P. cinnamomi*

3.9.1. Clonagem do Fragmento RAPD no Plasmídeo pGEM[®]-T e Multiplicação em *E. coli*

Identificado o fragmento de DNA característico de *P. cinnamomi*, procedeu-se à sua purificação pela utilização do kit Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System (Promega) seguindo as instruções do fabricante. O fragmento foi posteriormente ligado ao vector de clonagem pGEM[®]-T (Promega) com a utilização da enzima *T4* ligase. Na ligação usou-se a proporção de 4:1 de inserto/vector e 3 unidades da enzima num

volume final de reacção de 10 µL. A reacção incubou uma hora a temperatura ambiente ou 10 horas a 4 °C.

A transformação da *E. coli*, estirpe DH5α, foi realizada por choque térmico adicionando-se o produto da reacção de ligação a células competentes de *E. coli* (DH5α) entretanto liquefeitas. As células e o produto da ligação são mantidos em gelo durante 20 minutos e colocadas de seguida num banho a 42 °C durante 90 segundos passando-as de imediato para gelo durante 2 minutos.

Os transformantes foram seleccionados pela resistência à ampicilina em meio LB com 50 mg de ampicilina, 0,1 mM de IPTG e 2 % de X-Gal. As placas incubaram-se a 37 °C durante 12 horas. Depois deste período colocam-se 30 minutos a 4 °C para diminuir o número de colónias “falsas positivas”.

Seleccionam-se as colónias brancas e colocam-se a crescer em meio LB líquido com ampicilina durante 16 – 20 horas a 37 °C e com agitação orbital.

3.9.2. Obtenção de DNA dos Plasmídios recombinantes

Para a obtenção do DNA plasmídico, na triagem das colónias transformadas, utilizou-se NaOH, SDS e agitação para a lise celular e sais (acetato e potássio) e etanol para a precipitação do DNA. A eficácia da incorporação dos plasmídios foi observada em géis de agarose a 0,8 % a que se seguiu a digestão enzimática do DNA plasmídico com as enzimas de restrição *Sal* I e *Apa* I para a confirmação da presença do fragmento clonado. Depois de confirmada a presença do fragmento as colónias transformadas com sucesso crescem em meio LB líquido e extrai-se o DNA plasmídico com a utilização do kit Wizard Plus Mini preps DNA Purification System (Promega) com o objectivo de se obter um grau de purificação adequado para posterior sequenciação.

3.9.3. Sequenciação e Análise do Fragmento SCAR (OP120)

A sequência de bases do fragmento clonado no pGEM[®]-T e multiplicado na estirpe DH5 α da *E. coli* foi realizada no sequenciador automático da Universidade de Salamanca.

A análise da sequência de nucleótidos foi realizada no programa BioEdit (European Bioinformatics Institute, EBI) tendo-se determinado a dimensão final do fragmento por eliminação das bases comuns ao plasmídeo pGEM[®]-T e identificação do primer “10 mer” que lhe deu origem nas extremidades do fragmento clonado.

A sequência final do fragmento clonado no pGEM[®]-T (OP120) foi analisada pelo programa FASTA (Pearson & Lipman, 1988) disponibilizado na web pelo European Bioinformatics Institute (EBI) e nas bases de dados da EMBL e Swiss-Prot.

3.9.4. Hibridação de Ácidos Nucleícos (Técnica “Southern-blot”)

Com o objectivo de caracterizar a região do genoma do SCAR – OP120 e confirmar a especificidade em *P. cinnamomi*, o fragmento foi marcado com digoxigenina por PCR e foi usado em hibridação “Southern” com DNA genómico de diferentes espécies de *Phytophthora*: *P. cambivora* (102), *P. cinnamomi* (120), *P. cactorum* (304.53), *P. quercina* (789.95), *P. nicotianae* (535.92), *P. citricola* (221.88), *P. capsici* (521.77), *P. cryptogea* (307.62), *P. syringae* (2351), *P. cinnamomi* (342.72), DNA de castanheiro (*Castanea sativa*), e *Rhodoturula mucilaginoso*, uma levedura isolada no mel.

O DNA genómico dos organismo em estudo foi digerido com a enzima de restrição *Rsa* I

3.9.5. Marcação da Sonda com Digoxigenina

A marcação do fragmento de DNA com digoxigenina foi realizada utilizando o kit “PCR Dig Labeling Mix” (Boehringer). Para a reacção de PCR utilizou-se 1,5 μ L de DNA plasmídico, 20 pmoles de cada um dos primers universais, 5 μ L de uma

solução (2 mM de dATP, dCTP, dGTP, 1,9 mM de dTTP e 0,1 mM de dUTP-11-digoxigenina), 1,5 mM de MgCl₂, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, 5 µL de buffer da enzima num volume final de reacção de 50 µL.

A reacção de amplificação ocorreu num amplificador programado com um período inicial de desnaturação de 5 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de amplificação com 94 °C – 60 segundos; 51 °C – 60 segundos e 72 °C – 60 segundos, finalizado por um período de extensão final 5 minutos a 72 °C.

Depois de confirmada a marcação da sonda por “dot-blot” procedeu-se à hibridação com DNA genómico de diferentes espécies de *Phytophthora*, *Castanea sativa* e *R. mucilaginosa*.

3.9.6. Hibridação do Fragmento (OP120) Marcado com Digoxigenina com DNA Genómico de Diferentes Espécies

A hibridação DNA/DNA realizou-se seguindo o método descrito por Southern (1975). O DNA genómico (10 µg) das espécies referidas em 3.9.4. foi digerido com a enzima de restrição *Rsa* I (Promega) seguindo o protocolo indicado pelo fabricante.

A enzima *Rsa* I foi seleccionada por cortar o fragmento em estudo apenas duas vezes e uma delas muito próximo das extremidade 5'. Os fragmentos de DNA foram separados em géis de agarose a 0,7% mediante electroforese em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 2 mM EDTA).

Desnaturou-se o gel numa solução de NaOH a 0,5 M e NaCl a 1,5 mM, durante 60 minutos. Posteriormente transferiu-se para uma membrana de nylon (Hybond™, Amersham International) com a utilização de SSC 10 × (NaCl, 1,5 M; citrato sódico, 0,15 M, pH 7) durante 12 horas.

O DNA fixou-se à membrana numa estufa a 80°C durante 90 minutos.

A pré-hibridação ocorreu em forno de hibridação durante uma hora a 60 °C, com 70 mL de uma solução SSC 5×, blocking reagent, 0,1 % (p/v); N-lauroyl sarcosina, 0,1 % (p/v) e SDS a 0,02 % (p/v). A hibridação realizou-se com 25 mL da solução anteriormente referida a que se incorporou 15 µL da sonda marcada e se deixou a incubar a 65 °C durante 12 horas.

A membrana foi lavada com soluções salinas de força iónica decrescente à temperatura de 37 °C.

As hibridações marcadas com digoxigenina (DIG) foram detectadas com o kit CDP-Star™ (Boehringer) seguindo as recomendações dos fabricantes, que compreende os seguintes passos:

- Lavar a membrana durante 5 minutos em “Washing buffer” – (B1) (ácido maleico, 0,1 M; NaCl, 0,15 M pH 7,5; Tween 20 a 0,3 % (v/v)).
- Incubar a membrana durante 30 minutos no buffer – (B2) (1:10 blocking solution em B1).
- Incubar de seguida durante 30 minutos numa solução diluída 1:20 000 do conjugado anti-DIG-AP (Boehringer, Mannheim) preparada por diluição do anti-corpo numa solução 1× do buffer B2.
- Lavar duas vezes durante 15 minutos cada em buffer B1.
- Equilibrar a membrana durante 5 minutos com 30 mL de buffer de detecção – (B3) – (Tris- HCl, 0,1 M; NaCl, 0,15 M pH 9.5).
- Incubar 5 minutos numa solução 1:100 de CDP-Star™ a 25 mM, colocar de seguida a membrana em película aderente, retirar todas as bolhas de ar e o excesso de solução.
- Expor a membrana sobre uma película X-Ray Fuji Medical (Fuji Photo Film) e revelar a película através de uma solução reveladora e uma solução fixadora.

3.10. Desenho de Primers

O desenho de primers, para amplificação do fragmento característico de *P. cinnamomi*, baseou-se em princípios gerais e empíricos não existindo normas que garantam a amplificação do produto pretendido.

Da muita bibliografia existente e de programas de desenhos de primers extraíram-se algumas orientações que devem ser tidas em consideração:

- Utilizar primers com número de nucleótidos compreendidos entre 18 e 28 com uma percentagem em G + C de 50 a 60 %.
- Evitar complementaridade nos extremos 3' do par de primers de uma reacção.
- Evitar sequências palindrómicas para reduzir a formação de dímeros.

- A temperatura de emparelhamento (T_m) estimada pelo somatório de: 4 °C por cada base G ou C, 2 °C por cada T ou A, a que se subtrai 5 °C. A T_m deve ser idêntica nos dois primers a utilizar na reacção PCR. Esta temperatura tem apenas um valor indicativo, podendo os valores determinados empiricamente ser superiores em 5-10 °C. A temperatura mais elevada deve ser a utilizada nas reacções.

Seguindo os princípios gerais desenharam-se três primers com nucleótidos completamente complementares com a sequência do marcador SCAR – OP120 na extremidade 5' e 3' sem incluir a sequência do primer “10-mer” que lhe deu origem e que designamos por Cin3, Cin1. Desenhou-se ainda um terceiro primer próximo da extremidade 5' que designamos por Cin2. Os três primers organizados em dois pares de primers (Cin2/Cin1 e Cin3/Cin1) foram testados em reacções de PCR diagnóstico.

3.11. PCR-Diagnóstico de *P.cinnamomi* Baseada nos Primers Específicos “Cin2/Cin1” e Cin3/Cin1”

3.11.1. Especificidade e Sensibilidade da PCR-Diagnóstico na Detecção de *P. cinnamomi*

Os primers desenhados no marcador SCAR – OP120, Cin1, Cin2 e Cin3 foram testados em reacções de PCR na combinação Cin2/Cin1 e Cin3/Cin1 para determinar a especificidade e limite de detecção da reacção PCR.

Nesta fase inicial utilizou-se DNA obtido de culturas puras de diferentes espécies de *Phytophthora* e de *P. cinnamomi*.

As condições, químicas e físicas, das reacções PCR foram empiricamente determinadas alterando-se apenas um dos parâmetros da reacção em cada experiência.

Nas condições de reacção PCR, empiricamente determinadas, foram testadas as espécies de *Phytophthora* de referência e muitos dos isolados de *Phytophthora* obtidos em castanheiros doentes.

A sensibilidade da reacção foi determinada a partir de diluições sucessivas de DNA previamente quantificado em reacções PCR onde o factor diluição do DNA era a única variável da reacção.

3.11.2. PCR-Diagnóstico em Plantas com Sintomas da Doença da Tinta, em Tecido Armadilha e Água do Solo (zoósporos)

Para se concretizar este objectivo utilizaram-se plantas de castanheiro que cresceram em terra vegetal inoculada com 0,5 % (v/v) de *P. cinnamomi*.

O inóculo de *P. cinnamomi* foi produzido em terra vegetal e vermiculite (1:1) esterilizada por autoclavagem (120 °C, 1 hora) repetida às 48 e 96 horas a que se seguiu a inoculação com micélio de *P. cinnamomi* (80). Os sacos hermeticamente fechados foram homogeneizados a intervalos regulares durante um mês.

Para concretizar a técnica armadilha utilizou-se terra vegetal inoculada com *P. cinnamomi* na qual tinham crescido plantas de castanheiro, na proporção (1:4) de água destilada. Como tecido armadilha utilizaram-se discos de folha de castanheiro postos a flutuar na água (3 repetições) e radículas de cânhamo (uma repetição). Realizaram-se reacções PCR diagnóstico às 24, 48, 72 e 96 horas de ensaio.

Testes clássicos de detecção de *Phytophthora* em meio selectivo P₁₀VPH foram realizados em todas as plantas de castanheiro que cresceram em terra vegetal inoculada com *P. cinnamomi* e nos tecidos vegetais (folhas de castanheiro e radículas de cânhamo às 24 horas de ensaio de detecção) do método armadilha.

3.11.2.1. Extracção do DNA dos Tecidos da Raiz de castanheiro

Em plantas de castanheiro que cresceram em substrato inoculado com *P. cinnamomi* (80) e com sintomas da doença da tinta foram retiradas dos vasos e as raízes lavadas em água corrente. De cada planta retiraram-se os tecidos radiculares, muitos deles já em avançado estado de degradação, para extracção do DNA. A extracção do DNA das raízes foi realizada utilizando o kit de extracção “DNeasy Plant Mini Kit”(Qiagen) seguindo as instruções do fabricante.

3.11.2.2. Extracção do DNA de Tecidos armadilha

Retiraram-se discos de folha de castanheiro e radículas de cânhamo (tecido armadilha) às 24, 48, 72 e 96 horas. Os discos de folha depois de cuidadosamente lavados em água destilada e estéril foram pesados e adiciona-se 10 µL de NaOH, 0,5 M por mg de tecido vegetal, macerando-se os tecidos num almofariz de porcelana. Depois de centrifugado a 13000 rpm durante 5 minutos retiram-se 5 µL para 495 µL de Tris HCl 200 mM, pH 8 e utiliza-se 1 µL por reacção PCR.

3.11.2.3. Extracção do DNA da Água do Solo (zoósporos)

Os zoósporos constituem em *Phytophthora* a principal unidade infecciosa característica biológica em que se baseiam os métodos armadilha de detecção. Considerando que estas unidades infecciosas se encontram na água e que irão deslocar-se para os tecidos vegetais, utilizou-se 1 mL desta solução para a extracção do DNA.

Por centrifugação ligeira separaram-se os restos de tecidos vegetais e outros constituintes orgânicos do solo. O sobrenadante é sujeito a uma centrifugação de 13000 rpm durante 10 minutos. O precipitado é ressuspenso em 30 µL de Tris HCl, 200 mM, pH 8 e colocado a 94 °C durante 5 minutos. Depois de centrifugado a 13000 rpm utiliza-se 1 µL do sobrenadante por reacção PCR.

3.11.2.4. Condições Químicas e Físicas da PCR-Diagnóstico em Plantas com Sintomas da Doença da Tinta, em Tecidos Armadilha e Água do Solo (zoósporos)

As condições físicas e químicas da reacção de amplificação com a utilização de 1 uL da solução de DNA obtida das raízes de castanheiro, tecidos armadilha e água do solo foram determinadas empiricamente a partir do protocolo de reacção PCR em culturas puras de *Phytophthora*. Em todas as reacções PCR incluiu-se um controlo negativo (água em substituição do DNA) e um controlo positivo com a utilização de DNA extraído de uma cultura pura de *P. cinnamomi*.

Os fragmentos amplificados foram analisados por electroforese em TBE (Tris-Borato, 90mM; EDTA 2 mM pH 8,0) em géis de 1,5 % de agarose e visualizados por incorporação de 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Br Et e iluminação UV.

3.12. “Nested” PCR

A designação de “nested” PCR resulta do facto do fragmento amplificado por PCR numa primeira reacção PCR ser usado como molde para uma segunda reacção PCR, utilizando primers desenhados no interior do fragmento inicialmente amplificado.

O conhecimento da região rDNA no género *Phytophthora* permitiu o desenho de primers, no interior desta região, específicos para a identificação de determinadas espécies.

Cacciolla *et al.* (2001) utilizaram esta estratégia no desenho de primers específicos para *P. cambivora* e *P. cinnamomi* e que também será utilizado neste trabalho como método de detecção e identificação destas espécies obtidas em castanheiro.

Na primeira reacção PCR utilizam-se os primers DC6 (SCRI) e ITS4 (White *et al.*, 1990) e na segunda reacção PCR os primers desenhados por Cacciolla *et al.* (2001): DC4 para a detecção específica de *P. cambivora* e DC9 para a detecção específica de *P. cinnamomi*. O primer reverso é para as duas espécies o primer DC5 já anteriormente desenhado no SCRI, baseado nas sequências da região ITS2 em mais de 20 espécies de *Phytophthora* (Bonants *et al.*, 1999). Este primer desenhado no ITS2 permite segundo os autores anteriormente referidos discriminar este grupo de espécies.

Para a aplicação deste método utilizaram-se inicialmente as condições químicas e físicas da reacção PCR referidas por estes autores que foram ajustadas empiricamente para a obtenção de resultados de forma consistente.

3.13. “Multiplex” PCR

“Multiplex” PCR é uma variante da reacção PCR em que dois ou mais *loci* são amplificados simultaneamente.

Schubert *et al.* (1999) identificaram um fragmento amplificado por RAPD-PCR característico em *P. cambivora* e desenharam os primers CAMB3 e CAMB4. Este par de primers amplifica em *P. cambivora* um fragmento com 1105 pb. Estes primers serão utilizados neste trabalho em “multiplex” PCR com o par de primers Cin3/Cin1 para a detecção em simultâneo das duas espécies de *Phytophthora* associadas com a doença da tinta do castanheiro.

As condições químicas e físicas da reacção “multiplex” PCR foram experimentalmente determinadas utilizando-se culturas puras de *P. cinnamomi* e *P. cambivora* como DNA molde.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento de *Phytophthora* spp. Associada com a Doença da Tinta do castanheiro

Os isolados de *Phytophthora* associados à doença da tinta do castanheiro, nos quais se baseia o trabalho experimental deste estudo, foram obtidos pela utilização dos métodos clássicos de isolamento em meio de cultura selectivo.

O método e a escolha do material vegetal a utilizar foi determinado em função da cada situação concreta de forma a permitir um número de isolados que possibilitasse a concretização do trabalho a que nos tínhamos proposto.

Os métodos de isolamento utilizados incluíram diferentes estratégias. Os meios de cultura selectivos, utilizado em todas as situações de diagnóstico, ou seja, quando estavam disponíveis plantas de castanheiro com sintomas evidentes da doença da tinta. O isolamento por métodos “armadilha”, quando se pretendia isolar espécies de *Phytophthora* associadas ao solo das raízes das plantas que tinham morrido e os tecidos vegetais se encontravam em estado avançado de degradação e, ainda o método de planta armadilha quando se pretendia obter isolados de *Phytophthora* em sotos com mais de 30 anos onde eram evidentes, em árvores adultas, os sintomas da doença da tinta.

Os isolados incluídos neste estudo (Quadro 2) foram seleccionados de forma a abrangerem uma região geográfica alargada e ainda a de caracterizar as espécies de *Phytophthora* associados com a doença da tinta.

Os isolados obtidos em situação de diagnóstico, obtidos em castanheiros jovens de viveiros florestais (Amarante e Bornes) e em plantas de castanheiro com três anos de plantação (Paredes) e ainda castanheiros com 6 – 8 anos de plantação (Rossas – Arufe), representam neste estudo 30.6 %. Os isolados obtidos pela técnica de tecido armadilha a partir do solo (Paredes) representam 16 %, tendo os restantes 53,4 % sido obtidos pela técnica de “planta armadilha”, em sotos com mais de 30 anos, localizados na região de Bragança /Vinhais.

O método utilizado para a detecção de *Phytophthora* a partir do solo foi empiricamente desenvolvido e baseia-se na utilização de discos de folha de castanheiro como tecido armadilha e no isolamento de *Phytophthora* a partir destes tecidos em

meio selectivo P₁₀VPH (Figura 10). A técnica foi realizada em amostras de solo recolhidas no final do Verão e nas condições naturais de laboratório nesta época do ano.

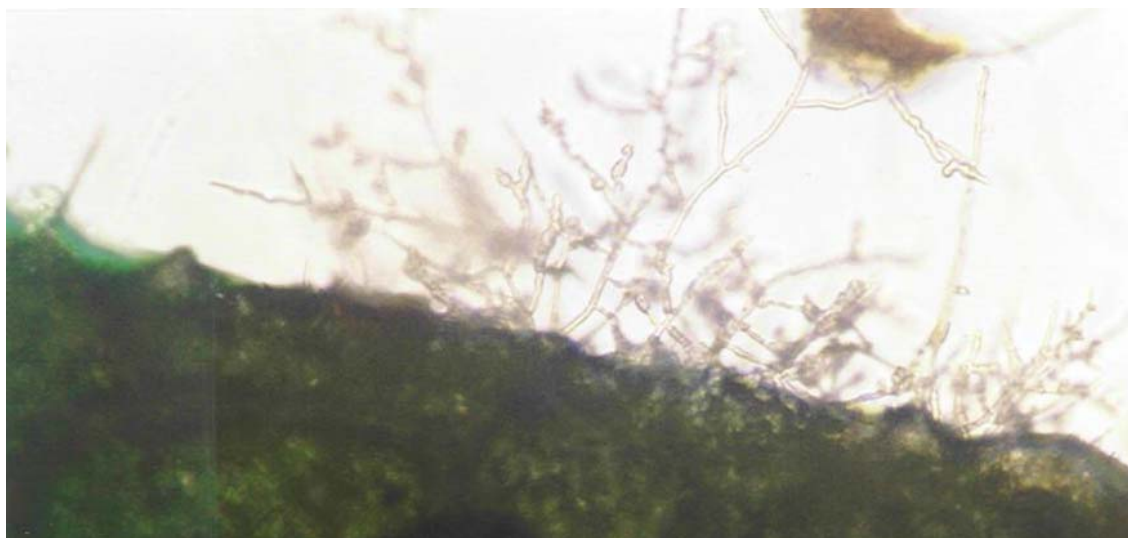


Figura 10 – Hifas de *Phytophthora* sp. observadas ao microscópio 48 horas depois do isolamento ($\times 400$).

O método armadilha (planta inteira) utilizado em soutos com mais de 30 anos permitiu o isolamento destes parasitas em todos os locais amostrados. A eficácia do método, ou seja o isolamento positivo de espécies de *Phytophthora* variou no entanto de 14 a 100 % conforme o local. A variação da eficácia do isolamento foi associada na maioria das situações à irregularidade da distribuição e escassez do material vegetal presente nos soutos.

Em Rossas, local escolhido para o estudo dos isolados associados com a doença da tinta ao nível de um soto, foram recolhidos todos os castanheiros jovens existentes na área de influência de castanheiros adultos com sintomas evidentes da doença da tinta. A percentagem de isolamento positivo de espécies de *Phytophthora* nos nove castanheiros adultos (Quadro 4) variou de 33 a 67 %.

De referir que os castanheiros jovens na altura da amostragem não evidenciam, na grande maioria dos casos, sintomas da doença da tinta e podem por observação visual ser considerados como plantas sãs.

Quadro 4 – Percentagem de castanheiros jovens com isolamento positivo de *Phytophthora* em Rossas (“armadilha de planta-inteira”)

Nº da árvore	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
Sintomatologia	SE	SE	AM	AM	SL	SE	SL	SE	AM
%	60	50	33	67	50	66	50	33	33

AM – Árvore Morta

SL – Sintomas ligeiros

SE – Sintomas Evidentes

Os isolados 105, 106, 107 e 108 foram obtidos em Rossas no mesmo souto dos isolados 801 a 810 utilizando a mesma técnica de isolamento – armadilha de planta inteira” mas no ano 2001.

4.2. Formação de oósporos “*in vitro*” e suas características morfológicas

Todos os isolados de *Phytophthora* em estudo (Quadro 2) produziram oósporos quando pareados com *P. cinnamomi* (341.72) de tipo de compatibilidade sexual A1. Não se observaram oósporos nos pareamentos dos isolados com *P. cinnamomi* (342.72) de compatibilidade sexual A2, nem nos auto-pareamentos dos isolados.

Em todos os auto-pareamentos observaram-se clamidósporos com excepção dos auto-pareamentos dos isolados 135, 101, 102 e 107 que apenas evidenciaram micélio.

Quando ocorreu cruzamento sexual o anterídio observado foi sempre de tipo anfigíneo. Observaram-se dois tipos de anterídio: um unicelular constituído por uma única célula e outro bicelular constituído por duas células (Figura 11 – a e b).

O anterídio de tipo unicelular foi o mais frequente, aparecendo em 78 % dos isolados aparecendo o tipo bicelular em 22 % dos isolados. Os isolados com anterídio bicelular apresentavam também anterídios unicelulares.

Erwin & Ribeiro (1996) referem para a espécie *P. cinnamomi*, as dimensões de 19 - 21 × 16 - 17 µm para o comprimento e largura do anterídio, 21 - 58 µm de diâmetro para o oogónio e 19 - 54 µm para o diâmetro do oósporo. Para a espécie *P. cambivora* os mesmo autores referem 25 – 35 × 19 µm para as dimensões do oogónio, 23 – 62 µm para o anterídio e 34 µm para o diâmetro dos oósporos.

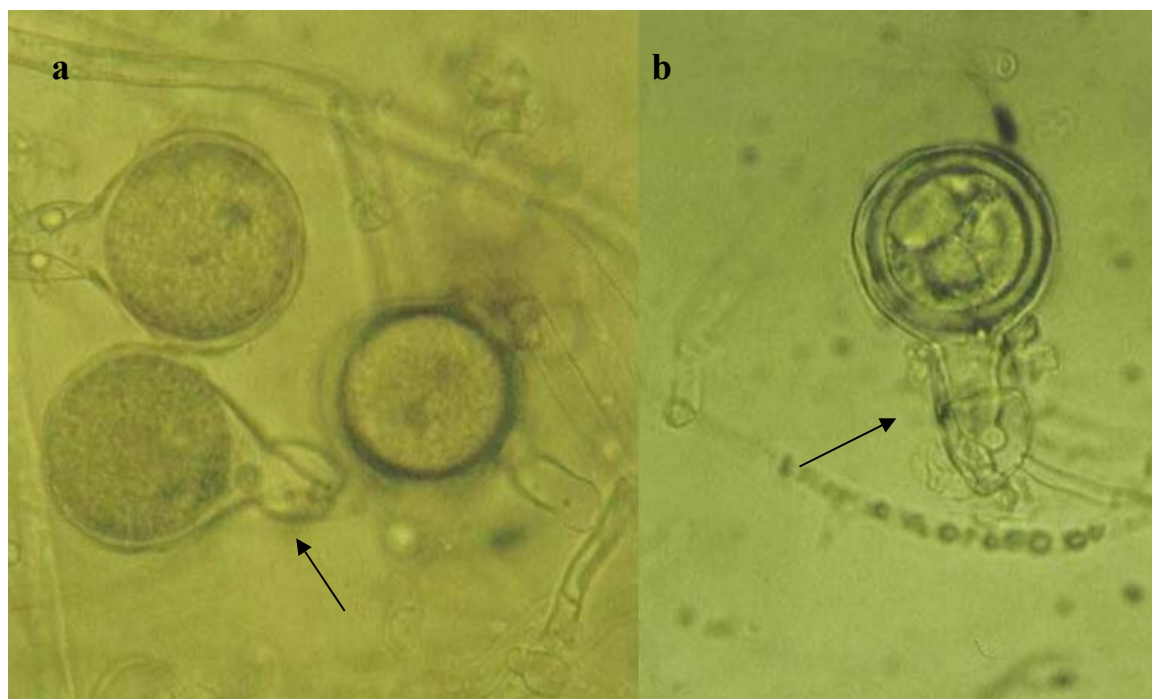


Figura 11 – Formação dos oósporos em *Phytophthora cinnamomi* – a) – Anterídios unicelulares, b) – Anterídios bicelulares.

As dimensões do oogónio e dos oósporos (Quadro 5) estão situadas na gama de variação das dimensões destas estruturas para a espécie *P. cinnamomi*, apresentando o anterídio dimensões que variaram de 17,88 a 27,82 μm em anterídios unicelulares e de 21,56 a 26,30 μm nos anterídios bicelulares. O comprimento dos anterídios bicelulares é em geral maior do que o dos anterídios unicelulares.

Na espécie *P. cambivora* os anterídios têm maior comprimento que os anterídios de *P. cinnamomi*, situando-se a largura destas estruturas na mesma gama de valores nas duas espécies. A dimensão dos oogónios situa-se no intervalo de variação referida por Erwin & Ribeiro (1996), apresentando os oósporos dimensões ligeiramente inferiores.

Este estudo evidenciou que todos os isolados são de compatibilidade sexual A2 uma vez que apenas se formaram estruturas de reprodução sexuada em pareamentos com *P. cinnamomi* (341.72) com tipo de compatibilidade sexual A1. Evidenciou ainda que nenhum dos isolados é auto-fértil uma vez que não se observaram estruturas reprodutivas nos auto-pareamentos.

Os isolados 135, 101, 102 e 107, identificados posteriormente por métodos moleculares como *P. cambivora*, não evidenciaram clamidósporos quando auto-pareados.

Quadro 5 – Dimensões das estruturas de reprodução sexuada: anterídio, oogónio e oósporos, dos isolados de *Phytophthora* em estudo

Isolado	Local	Anterídio				Oogónio	Oósporo
		Tipo	Nº Células	Comp ± dp (µm)	Larg ± dp (µm)	Diâm ± dp (µm)	Diâm ± dp (µm)
801	Rossas	anfigíneo	1 e 2	21.56±3.42	15.25±1.17	35.73±7.10	30.47±9.00
802	Rossas	anfigíneo	1 e 2	26.11±9.30	14.85±1.14	36.35±1.14	30.72±1.81
803	Rossas	anfigíneo	1	17.88±1.17	15.78±0.00	39.393±2.28	33.66±3.42
804	Rossas	anfigíneo	1	22.61±4.77	17.35±1.44	36.76±3.22	32.55±5.39
806	Rossas	anfigíneo	1 e 2	26.30±1.85	17.35±1.44	40.47±3.04	36.20±2.86
807	Rossas	anfigíneo	1	20.51±3.42	15.25±1.17	38.89±5.71	36.29±6.80
808	Rossas	anfigíneo	1	21.56±3.42	15.25±1.17	38.36±3.01	38.36±3.01
809	Rossas	anfigíneo	1	22.09±3.98	17.35±2.35	38.92±5.99	36.76±4.92
810	Rossas	anfigíneo	1	22.61±6.86	16.30±1.17	36.18±4.42	28.93±5.88
811	Sobreiró	anfigíneo	1	21.50±2.92	16.38±2.29	36.86±1.40	32.77±2.14
812	Agrochão	anfigíneo	1	27.82±3.97	16.30±2.20	33.13±4.40	26.31±5.56
813	Agrochão	anfigíneo	1	20.51±3.42	17.88±1.17	36.17±1.10	30.50±3.52
814	Espinhoso	anfigíneo	1	22.50±2.80	14.85±1.14	32.26±3.88	27.65±3.34
816	Pinela	anfigíneo	1	19.98±4.77	17.88±1.17	33.63±2.14	28.40±2.88
817	Pinela	anfigíneo	1	22.63±1.42	15.25±1.17	29.98±2.99	25.40±3.31
818	Pinela	anfigíneo	1 e 2	23.14±2.88	16.30±2.20	34.19±4.92	28.40±5.70
819	Penhas Juntas	anfigíneo	1 e 2	22.61±2.99	15.78±1.85	31.56±3.22	27.35±2.99
820	Penhas Juntas	anfigíneo	1	20.54±1.19	15.78±0.00	34.13±2.55	28.40±2.20
821	Amarante	anfigíneo	1 e 2	24.76±2.35	16.83±1.44	33.63±2.14	28.95±3.11
822	Amarante	anfigíneo	1	23.14±4.70	14.72±2.99	37.42±6.11	29.97±2.98
823	Amarante	anfigíneo	1 e 2	21.56±2.88	17.36±2.35	37.87±2.99	30.50±5.45
824	Amarante	anfigíneo	1	19.98±3.52	15.78±2.63	32.61±3.98	28.93±1.85
825	Amarante	anfigíneo	1	25.24±7.10	15.25±2.20	33.66±1.17	28.40±1.17
826	Amarante	anfigíneo	1	18.41±3.22	14.21±1.38	35.78±1.44	31.03±1.17
827	Amarante	anfigíneo	1	28.93±5.26	15.25±2.20	36.29±2.88	29.98±2.99
828	Agrochão	anfigíneo	1	24.73±2.33	15.78±0.00	32.61±4.77	25.77±1.17
831	Penhas Juntas	anfigíneo	1	20.51±1.17	16.83±2.35	29.45±3.42	24.72±2.35
202	Bornes	anfigíneo	1 e 2	22.02±5.89	17.41±1.14	35.84±2.56	30.21±3.34
609	Bornes	anfigíneo	1	18.43±2.80	14.84±1.14	37.38±1.40	33.28±0.00
610	Bornes	anfigíneo	1	23.67±1.86	18.41±1.86	36.82±6.16	34.53±5.22
704	Rossas	anfigíneo	1 e 2	24.19±2.20	15.78±0.00	37.28±2.21	33.10±2.95
709	Agrochão	anfigíneo	1	24.19±2.20	17.35±1.44	38.30±2.42	36.20±2.86
112	Paredes	anfigíneo	1	19.46±2.99	14.79±1.35	34.68±3.88	29.93±4.41
115	Paredes	anfigíneo	1	20.51±3.42	15.24±1.16	32.01±2.90	27.73±2.90
120	Paredes	anfigíneo	1	22.00±0.00	11.00±0.00	31.08±4.96	—
122	Paredes	anfigíneo	1	24.72±3.98	17.88±1.17	34.65±2.12	28.93±0.00
123	Paredes	anfigíneo	1	23.14±4.32	14.72±1.43	32.53±3.11	26.22±3.65
124	Paredes	anfigíneo	1	24.72±2.35	16.3±1.17	33.28±3.08	27.27±3.49
125	Paredes	anfigíneo	1	23.67±3.22	15.78±0.00	33.13±3.98	28.93±3.22
128	Paredes	anfigíneo	1	21.56±3.90	15.24±1.70	33.66±4.32	28.40±3.40
129	Paredes	anfigíneo	1	23.14±2.88	16.29±2.19	34.71±4.32	26.82±3.40
130	Paredes	anfigíneo	1	17.76±6.07	11.10±0.00	35.52±9.28	—
135	Paredes	anfigíneo	1 e 2	30.88±1.44	15.78±0.00	35.24±2.35	30.50±2.35
101	Arufe (Rossas)	anfigíneo	1	25.77±2.35	17.35±1.44	33.10±2.29	26.87±2.81
102	Arufe (Rossas)	anfigíneo	1 e 2	27.35±2.35	22.09±5.84	34.65±5.84	28.93±2.63
105	Rossas	anfigíneo	1	19.97±4.21	13.82±1.40	41.47±3.34	35.33±4.92
106	Rossas	anfigíneo	1	21.50±2.92	16.90±1.40	38.91±1.14	33.79±1.14
107	Rossas	anfigíneo	1	24.19±2.20	17.35±1.44	35.15±2.27	30.50±1.44
108	Rossas	anfigíneo	1	16.90±2.92	13.31±1.14	35.84±1.81	30.21±2.80

Os clamidósporos estão presentes quando estes isolados foram pareados com *P. cinnamomi* – 342.72, tendo-se formado oósporos, semelhantes aos dos demais isolados, quando pareados com *P. cinnamomi* – 341.72.

Os anterídios de tipo anfigíneo estavam presentes em todos os pareamentos que deram origem à formação de estruturas de origem sexuada e os oogónios não apresentaram protuberâncias na sua superfície.

4.3. Identificação das Espécies de *Phytophthora* por Métodos Moleculares

4.3.1. Identificação por PCR-RFLP da região ITS – rDNA

4.3.1.1. Produção de Micélio e Extração do DNA Genómico

O crescimento dos isolados em C-PDA proporciona quantidades de micélio que possibilitam a aplicação do protocolo de extração de DNA num período de tempo reduzido (4 – 5 dias) obtendo-se por vezes quantidades de micélio que possibilita a duplicação do protocolo. Este processo de produção de micélio simplifica ainda o processo de extração de DNA por não ser necessário todo o processamento inicial de lavagens e liofilização do micélio quando os isolados crescem em meios líquidos.

A metodologia de extração de DNA proporciona na maioria das situações DNA em quantidade e qualidade (Figura 12) que permite a sua utilização nas técnicas moleculares subsequentes sem necessidade de se proceder à concentração ou limpeza de proteínas ou outras substâncias inibidoras.

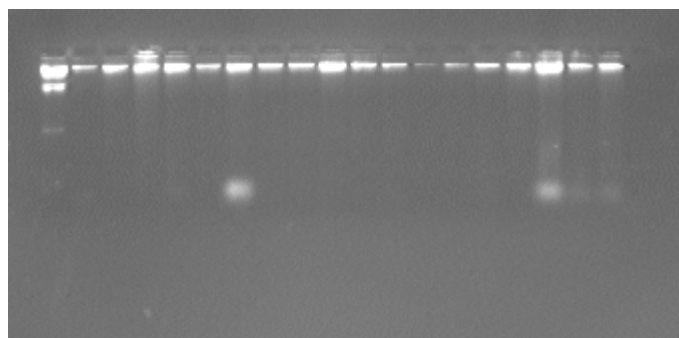


Figura 12 – DNA genómico extraído de micélio de isolados de *Phytophthora* patogénicos em castanheiro. Coluna 1 – Marcador DNA, Lambda DNA/*Hind III* (Promega) Coluna (2-19) – isolados de *Phytophthora* (811, 812, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 831, 709, 901, respectivamente). Gel de agarose a 0,8 %, coloração por Br Et e visualização por luz UV.

4.3.1.2. Amplificação PCR da Região ITS1, 5.8S e ITS2 do rDNA

O protocolo de PCR, depois de optimizadas as condições físicas e químicas e com os primers específicos para as espécies da família *Pythiales* e *Penorosporales* – ITS6 (Cooke & Duncan, 1997) e ITS4 (White *et al.*, 1990), proporcionou a amplificação de uma banda única com aproximadamente 900 pb (Figura 13) nas espécies de *Phytophthora*.

Com a utilização dos primers anteriormente referidos não se obteve nenhum fragmento de amplificação com a utilização de DNA genómico de *Cryphonectria parasitica* fungo ascomiceta da família Valsacea associado com a doença do cancro do castanheiro e DNA genómico de *Castanea sativa*.

Em alguns isolados de *Phytophthora* a reacção PCR funcionou de forma irregular não amplificando, por vezes, nenhum fragmento de DNA, situação que se associou à presença de elevadas quantidades de RNA no DNA ou à degradação extemporânea do DNA. Nestas circunstâncias optou-se pela repetição do protocolo de extracção de DNA a partir de produção de novo micélio.

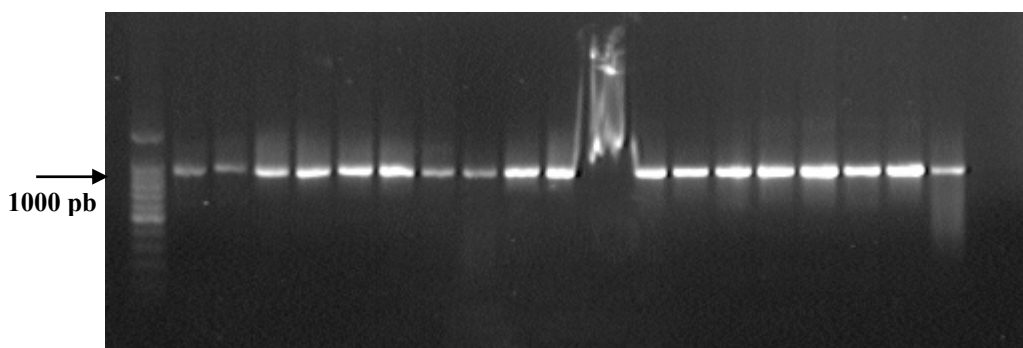


Figura 13 – Fragmento de ampliação PCR com a utilização de DNA genómico de isolados de *Phytophthora*, patogénicos em castanheiro com os primers ITS6 (Cooke & Duncan, 1997), ITS4 (White *et al.*, 1990). Coluna 1 – Marcador molecular (100 bp DNA Ladder, Promega); Coluna (2-20) – Isolados de *Phytophthora* (202, 210, 609, 610, 704, 705, 709, 11B, 811, 812, 813, 814, 816, 817, 818, 819, 820, 828, 831, respectivamente). A coluna 12 correspondente ao isolado 813 apresenta anomalias, a dimensão do fragmento de amplificação PCR foi confirmado noutras separações electroforéticas.

4.3.1.3. Polimorfismo RFLP da Região Genômica – ITS1, 5.8S e ITS2

O polimorfismo do produto PCR da região do genoma – ITS1, 5.8S e ITS2, foi evidenciado pela digestão enzimática do fragmento amplificado por PCR pelas enzimas de restrição *Msp* I, *Alu* I e *Taq* I (Figura 14, a e b e Figura 15) em alguns isolados e *Msp* I, *Alu* I (Figura 16 e 17) em todos os isolados de *Phytophthora* em estudo.

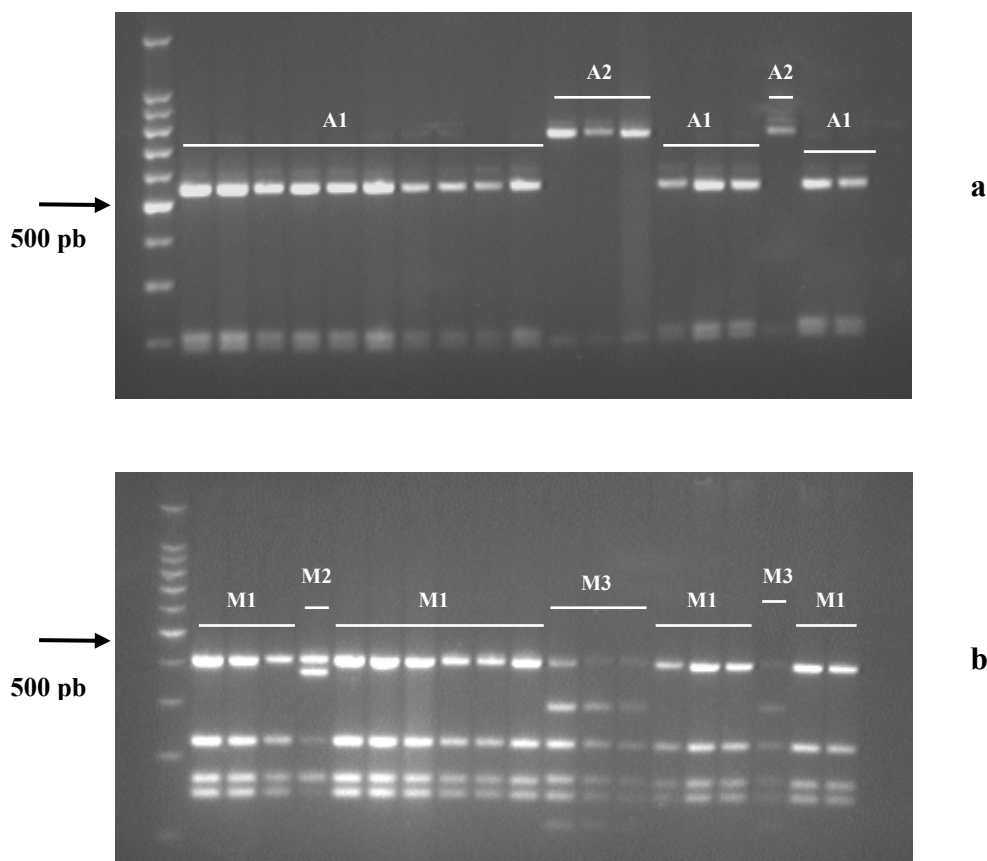


Figura 14 a, b – Padrão de restrição do fragmento de DNA amplificado pelos primers ITS6 (Cooke & Duncan, 1997) e ITS4 (White *et al.*, 1990) com a enzima *Alu* I (a) e *Msp* I (b) em 19 isolados de *Phytophthora*, patogênicos em castanheiro. Coluna 1 – Marcador molecular (100 bp DNA Ladder, Promega); Coluna (2-20) – Isolados de *Phytophthora* (112, 115, 120, 122, 123, 124, 125, 128, 129, 130, 135, 101, 102, 104, 105, 106, 107, 108, 2965). A identificação das colunas é igual na parte a e b da figura. Os fragmentos foram separados por electroforese em gel de 2,5 % de NuSieve® e coloração com BrEt.

A enzima de restrição *Alu* I (Figura 14, a) evidenciou dois padrões de corte distintos que se designaram A1 e A2 indicando os valores que se seguem a dimensão

aproximada dos fragmentos de DNA expressa em pares de bases (pb) por comparação com o marcador molecular (100 bp DNA Ladder, Promega):

A1 – 540, 210, 180

A2 – 750, 190

Do conjunto dos isolados em estudo quatro deles evidenciaram o padrão **A2** e os restantes o padrão **A1**.

Com a enzima de restrição *Msp* I (Figura 14, b) obtiveram-se três padrões de corte distintos que designamos, **M1**, **M2** e **M3**, com dimensões, estimadas em pb por comparação com o marcador molecular (100 bp DNA Ladder, Promega) que a seguir se indicam:

M1 – 400; 220; 160, 140

M2 – 400; 390; 220; 160; (140)

M3 – 400; 290; 220; 160; 140

O padrão de corte **M1** é o mais frequente aparecendo em 33 isolados, o padrão **M2** é evidenciado por 12 isolados e o padrão **M3** está presente em 4 isolados. No padrão de restrição **M2** o fragmento de 140 pb não é evidente em nove dos isolados e aparece com menor intensidade em 3 isolados.

A enzima de restrição *Taq* I proporcionou dois padrões de corte distintos (Figura 15), **T1** e **T2** com bandas de dimensões estimadas por comparação com um marcador molecular de 25 bp DNA Step Ladder (Promega) de:

T1 – 190, 180, 150, 125, 120, 90, 59

T2 – 195, 150, 125, 120, 90

A enzima *Taq* I que corta o DNA na sequência de bases T'CG_A, origina fragmentos de DNA de pequena dimensão sendo necessário géis de elevada concentração de agarose para que seja possível visualizar o maior número de fragmentos.

Com a enzima *Taq* I não se testaram todos os isolados uma vez que os padrões de corte obtidos com as enzimas *Alu* I e *Msp* I permitem, na maioria das situações, a identificação dos isolados de *Phytophthora* (Cooke *et al.*, 1999).

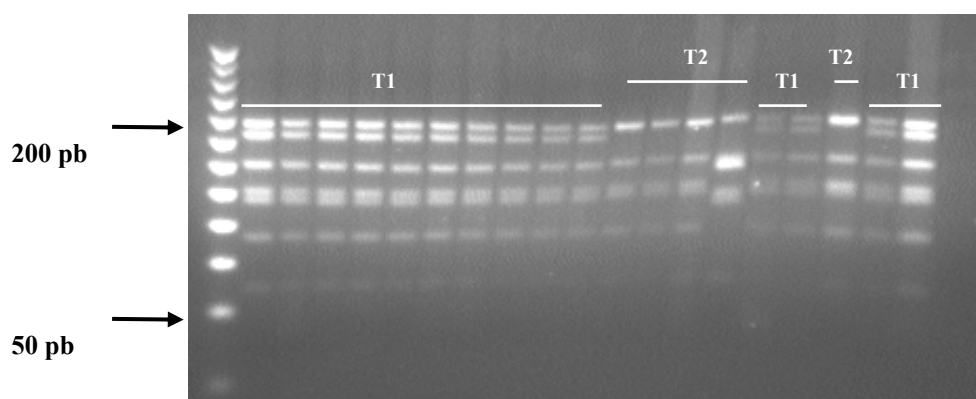


Figura 15 – Padrão de restrição do fragmento de DNA amplificado pelos primers ITS6 (Cooke & Duncan, 1997) e ITS4 (White *et al.*, 1990) com a enzima *Taq* I em 19 isolados de *Phytophthora*, patogênicos em castanheiro. Coluna 1 – Marcador molecular (25 bp DNA Step Ladder, Promega); Coluna (2-20) – Isolados de *Phytophthora* (112, 115, 120, 122, 123, 124, 125, 128, 129, 130, 135, 101, 102, 103, 104, 105, 107, 108, 2965). Os fragmentos foram separados por electroforese em gel de 3,5 % de NuSieve[®] e coloração por Br Et.

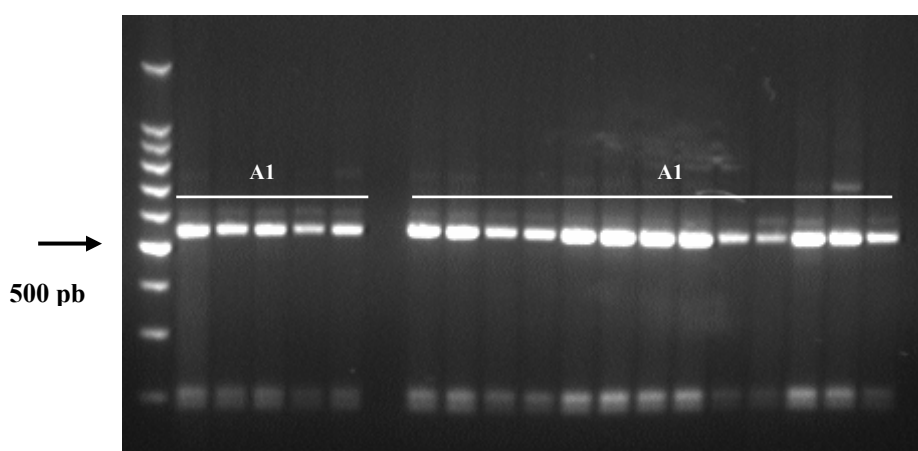


Figura 16 – Padrão de restrição do fragmento de DNA amplificado pelos primers ITS6 (Cooke & Duncan, 1997) e ITS4 (White *et al.*, 1990) com a enzima *Alu* I em 19 isolados de *Phytophthora*, patogênicos em castanheiro. Coluna 1 – Marcador molecular (100 bp DNA Ladder, Promega); Coluna (2-20) – Isolados de *Phytophthora* (202, 609, 210, 610, 704, 705, 709, 11B, 811, 812, 813, 814, 816, 817, 818, 819, 820, 828, 831). O padrão de restrição do isolado 705 foi confirmado posteriormente. Os fragmentos foram separados por electroforese em gel de 2,5 % de NuSieve[®] e coloração por Br Et.

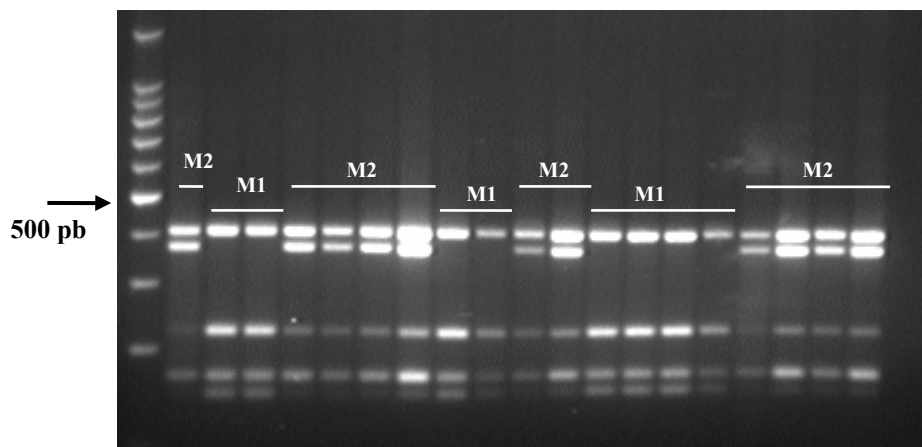


Figura 17 – Padrão de restrição do fragmento de DNA amplificado pelos primers ITS6 (Cooke & Duncan, 1997) e ITS4 (White *et al.*, 1990) com a enzima *Msp* I (b) em 19 isolados de *Phytophthora*, patogênicos em castanheiro. Coluna 1 – Marcador molecular (100 bp DNA Ladder, Promega); Coluna (2-20) – Isolados de *Phytophthora* (202, 210, 609, 610 704, 705, 709, 11B, 811, 812, 813, 814, 816, 817, 818, 819, 820, 828, 831). Os fragmentos foram separados por electroforese em gel de 2,5 % de NuSieve® e coloração por Br Et.

No Quadro 6 estão indicados os isolados de *Phytophthora* incluídos neste estudo com padrão de restrição A1 M1 (T1); A1 M2 (T2) e A2 M3 T2.

Quadro 6 – Padrões de restrição enzimática obtidos com *Alu* I, *Msp* I e *Taq* I ou *Alu* I, *Msp* I dos fragmentos de DNA amplificados por PCR pelos primers universais ITS6 (Cooke & Duncan, 1997) e ITS4 (White *et al.*, 1990) nos isolados de *Phytophthora* incluídos neste estudo.

Polimorfismos de corte com as enzimas de restrição <i>Alu</i> I, <i>Msp</i> I e <i>Taq</i> I	Isolados de <i>Phytophthora</i>
A1 M1 (T1)	(801), (802), (803), (804), (806), (807), (808), (809), (810), (811), (814), (816), (817), (818), (821), (822), (823), (824), (825), (826), (827), 609, 112, 115, 120, 123, 124, 125, 128, 129, 130, 105, 106, 108, (210)
A1 M2 (T1)	(812), (813), (819), (820), (828), (831), (202), (610), (704), (705), (709), 122, (80)
A2 M3 T2	101, 102, 107, 135

(X) – Padrão de restrição com a enzima *Taq* I não determinado experimentalmente

Para se completar o processo de identificação das espécies de *Phytophthora* é necessário ainda comparar o padrão de restrição enzimática obtido nos isolados em estudo com os padrões de restrição enzimática das espécies referência de *Phytophthora* disponibilizado pelo CABI Bioscience com acesso livre em (www.PhytID.org) na página PhytID – Identification of Plant Pathogenic *Phytophthora* Species by ITS Fingerprinting.

Os resultados obtidos na base de dados são expressos em percentagem de similaridade com as espécies de referência em função do número de fragmentos em comum tendo em consideração a utilização das enzimas de restrição referidas anteriormente.

A percentagem de similaridade dos isolados com padrão de restrição **A1 M1 T1**; **A1 M2 T1** e **A2 M3 T2** com as espécies de referência da base de dados estão indicadas no Quadro 7.

Quadro 7 – Percentagem de similaridade dos isolados de *Phytophthora* com padrão de restrição **A1 M1 T1**; **A1 M2 T2** e **A2 M3 T2** com as espécies de referência existentes na base de dados.

Padrão de restrição	Espécies referência da base de dados	Similaridade (%)	Total de bandas em comum	Total de bandas na espécie referência
A1 M1 T1	<i>P. cinnamomi</i>	53	9	17
	<i>P. sojae</i>	36	5	14
	<i>P. melonis</i>	31	4	13
	<i>P. sinensis</i>	31	4	13
	<i>P. cajani</i>	31	4	13
	<i>P. vignae</i>	31	4	13
A1 M2 T1	<i>P. cinnamomi</i>	53	9	17
	<i>P. sojae</i>	36	5	14
	<i>P. mirabilis</i>	33	4	12
	<i>P. vignae</i>	31	4	13
	<i>P. melonis</i>	31	4	13
A2 M3 T2	<i>P. cambivora</i>	50	8	16
	<i>P. fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	50	7	14
	<i>P. cambivora</i> “rare pattern”	50	7	14
	<i>P. fragariae</i> var. <i>rubi</i>	43	6	14
	<i>P. sojae</i>	43	6	14
	<i>P. cinnamomi</i>	29	5	17

A bibliografia associada a cada uma das espécies permite ponderar a identificação dos isolados em estudo. Na nossa situação a identificação da espécie não apresenta dificuldades nos isolados com padrão de restrição **A1 M1 T1** e **A1 M2 T1**, uma vez que *P. sojae*, com 36 % de similaridade com os isolados em estudo, apenas é parasita em soja (*Glycine max*).

Os isolados com padrão de restrição **A2 M3 T2**, com percentagem de similaridade de 50 % com *P. cambivora* e de igual valor com *P. fragariae* var. *fragariae* também não apresentam dificuldades na identificação da espécie em causa uma vez que esta última espécie apenas é patogénica em morangueiro.

Com a utilização da base de dados e com base na patogenicidade em castanheiro, os isolados com o padrão de corte **A1 M1 T1** e, **A1 M2 T1** foram identificados como *P. cinnamomi* e os isolados com perfil de corte **A2 M3 T2** foram identificados como *P. cambivora*.

Com a utilização da base de dados disponível no CABI e considerando apenas os fragmentos de restrição obtidos com as enzimas *Alu* I e *Msp* I que, Cooke *et al.* (1999) consideram ser suficientes para a identificação das espécies na maioria das situações, obteve-se com o padrão de restrição **A2 M3** uma percentagem de similaridade de apenas 44% com *P. cambivora* mas que aparece na primeira posição da lista das espécies, conforme o indicado no Quadro 8.

Quadro 8 – Percentagem de similaridade dos isolados de *Phytophthora* com padrão de restrição **A2 M3** com as espécies referência existentes na base de dados

Padrão de restrição enzimática com as enzimas <i>Alu</i> I, <i>Msp</i> I e <i>Taq</i> I	Espécies de referência da base de dados	Similaridade (%)	Total de bandas em comum	Total de bandas na espécie de referência
A2 M3	<i>P. cambivora</i>	44	7	16
	<i>P. fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	43	6	14
	<i>P. sojae</i>	43	6	14
	<i>P. cambivora</i> “rare pattern”	43	6	14

Com o padrão de restrição **A1 M1** obtêm-se valores de similaridade de 35 % com *P. cinnamomi* aparecendo no entanto na oitava posição da lista de similaridade. O

padrão de restrição **A1 M2** evidencia 24 % de similaridade com *P. cinnamomi* e na sétima posição da lista de similaridade conforme pode ser constatado no Quadro 9.

Apesar dos resultados obtidos na base de dados quando se utilizaram os perfis de restrição enzimática da enzima *Alu* I e *Msp* I, os isolados com perfil **A1 M1** e **A1 M2** foram identificados como *P. cinnamomi* tendo em consideração a uniformidade dos padrões de restrição o reduzido número de fragmentos de restrição utilizados pela base de dados para a determinação da similaridade assim como as características biológicas e de patogénese dos isolados em estudo.

Quadro 9 – Percentagem de similaridade dos isolados de *Phytophthora* em estudo com padrão de restrição **A1 M1** e **A1 M2** com as espécies de referência existentes na base de dados.

Padrão de restrição enzimática <i>Alu</i> I, <i>Msp</i> I	de	Espécies de referência da base de dados	de	Similaridade de (%)	Padrão de restrição enzimática <i>Alu</i> I, <i>Msp</i> I	Espécies de referência da base de dados	Similaridade (%)
A1, M1		<i>P. sp. (aspargus megasperma type)</i>		38	A1, M2	<i>P. sp. (aspargus megasperma type)</i>	31
		<i>P. iranica</i>		36		<i>P. tentaculata</i>	27
		<i>P. tentaculata</i>		36		<i>P. iranica</i>	27
		<i>P. fragariae</i> var. <i>rubi</i>		36		<i>P. phaseoli</i>	25
		<i>P. sojiae</i>		36		<i>P. mirabilis</i>	25
		<i>P. fragariae</i> var. <i>fragariae</i>		36		<i>P. fragariae</i> var. <i>rubi</i>	24
		<i>P. multivesiculata</i>		36		<i>P. cinnamomi</i>	24
		<i>P. cinnamomi</i>		35		-	

Os isolados de *P. cinnamomi* com o padrão de restrição enzimática **M1** foram detectados em maior número e constituem 74 % dos isolados em estudo tendo sido isolados em todos os locais com excepção de Agrochão e Penhas Juntas onde apenas se detectaram isolados com padrão de restrição **M2**. O padrão de restrição **M2** presente em menor número de isolados (26 %) tem no entanto uma distribuição muito alargada na região em estudo.

O facto de se obter o mesmo padrão de restrição enzimática depois de várias repetições da reacção e mesmo com ligeiras alterações no protocolo, associado ainda à presença deste padrão no isolado UTAD 80 – IMI 335492, organismo de referência para a espécie *P. cinnamomi* em ensaios de inoculação e infecção, por nós realizados, e

ainda a manutenção do padrão de corte com a enzima *Msp* I nos re-isolados deste parasita num ensaio em que foi inoculado o isolado 80 (resultados não apresentados) levou-nos a que se estudasse, por sequenciação dos nucleótidos, esta região do genoma nos isolados com padrões de restrição *Msp* I de tipo **M1** e **M2**.

4.3.2. Identificação das Espécies de *Phytophthora* por Comparação da Sequência dos Nucleótidos da Região ITS1, 5.8S e ITS2

4.3.2.1. Sequenciação dos Fragmentos do DNA Correspondentes à Região ITS1, 5.8S e ITS2

A sequenciação do fragmento amplificado por PCR correspondente à região genómica ITS1, 5.8S e ITS2 do rDNA foi realizada em quatro isolados com padrão de restrição **A1**, **M1** (609, 814, 817, 822), três isolados com padrão de restrição **A1**, **M2**, (80, 819, 831), num isolado de *P. cinnamomi* obtido em nogueira (210) e no isolado identificado como *P. cambivora* (101) obtido num castanheiro com oito anos de plantação.

O cromatograma da sequência de bases obtido directamente do sequenciador automático da Universidade de Salamanca foi visualmente analisado e determinada no programa Bio Edit a sequência final das bases do fragmento em análise.

A sequência “consensus” de cada um dos isolados e a similaridade (ClustalW) entre os isolados de *P. cinnamomi* – 210, 609, 80, 809, 814, 817, 819, 822, 831 está apresentada na Figura 18.

```

210      CCACACCTAAAAAAGTTCCACGTGAACCGTATCAACCCAATTAGTTGGGGGCTGCTCT 60
609      CCACACCTAAAAAAGTTCCACGTGAACCGTATCAACCCAATTAGTTGGGGGCTGCTCT 60
80       CCACACCTAAAAAAGTTCCACGTGAACCGTATCAACCCAATTAGTTGGGGGCTGCTCT 60
809      CCACACCTAAAAAAGTTCCACGTGAACCGTATCAACCCAATTAGTTGGGGGCTGCTCT 60
814      CCACACCTAAAAAAGTTCCACGTGAACCGTATCAACCCAATTAGTTGGGGGCTGCTCT 60
817      CCACACCTAAAAAAGTTCCACGTGAACCGTATCAACCCAATTAGTTGGGGGCTGCTCT 60
819      CCACACCTAAAAAAGTTCCACGTGAACCGTATCAACCCAATTAGTTGGGGGCTGCTCT 60
822      CCACACCTAAAAAAGTTCCACGTGAACCGTATCAACCCAATTAGTTGGGGGCTGCTCT 60
831      CCACACCTAAAAAAGTTCCACGTGAACCGTATCAACCCAATTAGTTGGGGGCTGCTCT 60
          *****

210      GGGCGGCGGCTGTCGATGTCAAAGTCGACGGCTGCTGCTGCGTGGCGGGCCCTATCACTG 120
609      GGGCGGCGGCTGTCGATGTCAAAGTCGACGGCTGCTGCTGCGTGGCGGGCCCTATCACTG 120
80       GGGCGGCGGCTGTCGATGTCAAAGTCGACGGCTGCTGCTGCGTGGCGGGCCCTATCACTG 120
809      GGGCGGCGGCTGTCGATGTCAAAGTCGACGGCTGCTGCTGCGTGGCGGGCCCTATCACTG 120
814      GGGCGGCGGCTGTCGATGTCAAAGTCGACGGCTGCTGCTGCGTGGCGGGCCCTATCACTG 120
817      GGGCGGCGGCTGTCGATGTCAAAGTCGACGGCTGCTGCTGCGTGGCGGGCCCTATCACTG 120
819      GGGCGGCGGCTGTCGATGTCAAAGTCGACGGCTGCTGCTGCGTGGCGGGCCCTATCACTG 120
822      GGGCGGCGGCTGTCGATGTCAAAGTCGACGGCTGCTGCTGCGTGGCGGGCCCTATCACTG 120
831      GGGCGGCGGCTGTCGATGTCAAAGTCGACGGCTGCTGCTGCGTGGCGGGCCCTATCACTG 120
          *****

```

```

210 GCGAGCGTTTGGGTCCCTCTCGGGGGAAGTGAAGTCTCTGCTTTTAAACCCATTTC 180
609 GCGAGCGTTTGGGTCCCTCTCGGGGGAAGTGAAGTCTCTGCTTTTAAACCCATTTC 180
80 GCGAGCGTTTGGGTCCCTCTCGGGGGAAGTGAAGTCTCTGCTTTTAAACCCATTTC 180
809 GCGAGCGTTTGGGTCCCTCTCGGGGGAAGTGAAGTCTCTGCTTTTAAACCCATTTC 180
814 GCGAGCGTTTGGGTCCCTCTCGGGGGAAGTGAAGTCTCTGCTTTTAAACCCATTTC 180
817 GCGAGCGTTTGGGTCCCTCTCGGGGGAAGTGAAGTCTCTGCTTTTAAACCCATTTC 180
819 GCGAGCGTTTGGGTCCCTCTCGGGGGAAGTGAAGTCTCTGCTTTTAAACCCATTTC 180
822 GCGAGCGTTTGGGTCCCTCTCGGGGGAAGTGAAGTCTCTGCTTTTAAACCCATTTC 180
831 GCGAGCGTTTGGGTCCCTCTCGGGGGAAGTGAAGTCTCTGCTTTTAAACCCATTTC 180
*****

210 TGTAATACTGAACATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTC 240
609 TGTAATACTGAACATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTC 240
80 TGTAATACTGAACATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTC 240
809 TGTAATACTGAACATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTC 240
814 TGTAATACTGAACATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTC 240
817 TGTAATACTGAACATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTC 240
819 TGTAATACTGAACATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTC 240
822 TGTAATACTGAACATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTC 240
831 TGTAATACTGAACATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTC 240
*****

210 AGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATG 300
609 AGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATG 300
80 AGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATG 300
809 AGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATG 300
814 AGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATG 300
817 AGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATG 300
819 AGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATG 300
822 AGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATG 300
831 AGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATG 300
*****

210 CGAATTGCAGGATTTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAG 360
609 CGAATTGCAGGATTTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAG 360
80 CGAATTGCAGGATTTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAG 360
809 CGAATTGCAGGATTTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAG 360
814 CGAATTGCAGGATTTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAG 360
817 CGAATTGCAGGATTTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAG 360
819 CGAATTGCAGGATTTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAG 360
822 CGAATTGCAGGATTTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAG 360
831 CGAATTGCAGGATTTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAG 360
*****

210 TCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTAACATCAAACCTGGCTCTCTTCCCTCCGTGT 420
609 TCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTAACATCAAACCTGGCTCTCTTCCCTCCGTGT 420
80 TCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTAACATCAAACCTGGCTCTCTTCCCTCCGTGT 420
809 TCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTAACATCAAACCTGGCTCTCTTCCCTCCGTGT 420
814 TCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTAACATCAAACCTGGCTCTCTTCCCTCCGTGT 420
817 TCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTAACATCAAACCTGGCTCTCTTCCCTCCGTGT 420
819 TCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTAACATCAAACCTGGCTCTCTTCCCTCCGTGT 420
822 TCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTAACATCAAACCTGGCTCTCTTCCCTCCGTGT 420
831 TCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTAACATCAAACCTGGCTCTCTTCCCTCCGTGT 420
*****

210 AGTCGGTGGATGGAGGTGCCAGACGTGAGGTGTCTTGC GGCGGTCTTCGGACTGGCTGT 480
609 AGTCGGTGGATGGAGGTGCCAGACGTGAGGTGTCTTGC GGCGGTCTTCGGACTGGCTGT 480
80 AGTCGGTGGATGGAGGTGCCAGACGTGAGGTGTCTTGC GGCGGTCTTCGGACTGGCTGT 480
809 AGTCGGTGGATGGAGGTGCCAGACGTGAGGTGTCTTGC GGCGGTCTTCGGACTGGCTGT 480
814 AGTCGGTGGATGGAGGTGCCAGACGTGAGGTGTCTTGC GGCGGTCTTCGGACTGGCTGT 480
817 AGTCGGTGGATGGAGGTGCCAGACGTGAGGTGTCTTGC GGCGGTCTTCGGACTGGCTGT 480
819 AGTCGGTGGATGGAGGTGCCAGACGTGAGGTGTCTTGC GGCGGTCTTCGGACTGGCTGT 480
822 AGTCGGTGGATGGAGGTGCCAGACGTGAGGTGTCTTGC GGCGGTCTTCGGACTGGCTGT 480
831 AGTCGGTGGATGGAGGTGCCAGACGTGAGGTGTCTTGC GGCGGTCTTCGGACTGGCTGT 480
*****

210 GAGTCCCTTGAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGACGTTGCTGG 540
609 GAGTCCCTTGAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGACGTTGCTGG 540
80 GAGTCCCTTGAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGACGTTGCTGG 540
809 GAGTCCCTTGAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGACGTTGCTGG 540
814 GAGTCCCTTGAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGACGTTGCTGG 540
817 GAGTCCCTTGAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGACGTTGCTGG 540
819 GAGTCCCTTGAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGACGTTGCTGG 540
822 GAGTCCCTTGAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGACGTTGCTGG 540
831 GAGTCCCTTGAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGACGTTGCTGG 540
*****

210 TTGTGGAGGCTGCCTGTATGGCCAGTCGGGACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAAATGG 600
609 TTGTGGAGGCTGCCTGTATGGCCAGTCGGGACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAAATGG 600
80 TTGTGGAGGCTGCCTGTATGGCCAGTCGGGACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAAATGG 600
809 TTGTGGAGGCTGCCTGTATGGCCAGTCGGGACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAAATGG 600
814 TTGTGGAGGCTGCCTGTATGGCCAGTCGGGACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAAATGG 600
817 TTGTGGAGGCTGCCTGTATGGCCAGTCGGGACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAAATGG 600
819 TTGTGGAGGCTGCCTGTATGGCCAGTCGGGACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAAATGG 600
822 TTGTGGAGGCTGCCTGTATGGCCAGTCGGGACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAAATGG 600
831 TTG-GGAGGCTGCCTGTATGGCCAGTCGGGACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAAATGG 598
* * *

```

```

210      AGGAGTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAAAGCGCTTATTGGATGTT 660
609      AGGAGTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAAAGCGCTTATTGGATGTT 660
80       AGGAGTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAAAGCGCTTATTGGATGTT 660
809      AGGAGTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAAAGCGCTTATTGGATGTT 660
814      AGGAGTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAAAGCGCTTATTGGATGTT 660
817      AGGAGTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAAAGCGCTTATTGGATGTT 660
819      AGGAGTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAAAGCGCTTATTGGATGTT 660
822      AGGAGTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAAAGCGCTTATTGGATGTT 660
831      AGGAGTGTTCGATTTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAAAGCGCTTATTGGATGTT 658
*****

210      TTCCTGCTGTGGCGGTACGGATCGGTGAACCGTAGCTGTGCTAGGCTTGGCGTTTGAACC 720
609      TTCCTGCTGTGGCGGTACGGATCGGTGAACCGTAGCTGTGCTAGGCTTGGCGTTTGAACC 720
80       TTCCTGCTGTGGCGGTACGGATCGGTGAACCGTAGCTGTGCTAGGCTTGGCGTTTGAACC 720
809      TTCCTGCTGTGGCGGTACGGATCGGTGAACCGTAGCTGTGCTAGGCTTGGCGTTTGAACC 720
814      TTCCTGCTGTGGCGGTACGGATCGGTGAACCGTAGCTGTGCTAGGCTTGGCGTTTGAACC 720
817      TTCCTGCTGTGGCGGTACGGATCGGTGAACCGTAGCTGTGCTAGGCTTGGCGTTTGAACC 720
819      TTCCTGCTGTGGCGGTACGGATCGGTGAACCGTAGCTGTGCTAGGCTTGGCGTTTGAACC 720
822      TTCCTGCTGTGGCGGTACGGATCGGTGAACCGTAGCTGTGCTAGGCTTGGCGTTTGAACC 720
831      TTCCTGCTGTGGCGGTACGGATCGGTGAACCGTAGCTGTGCTAGGCTTGGCGTTTGAACC 718
*****

210      GGCGGTGTTGTTGCGAAGTAGGGTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGGA 780
609      GGCGGTGTTGTTGCGAAGTAGGGTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGGA 780
80       GGCGGTGTTGTTGCGAAGTAGGGTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGGA 780
809      GGCGGTGTTGTTGCGAAGTAGGGTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGGA 780
814      GGCGGTGTTGTTGCGAAGTAGGGTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGGA 780
817      GGCGGTGTTGTTGCGAAGTAGGGTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGGA 780
819      GGCGGTGTTGTTGCGAAGTAGGGTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGGA 780
822      GGCGGTGTTGTTGCGAAGTAGGGTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGGA 780
831      GGCGGTGTTGTTGCGAAGTAGGGTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGGA 778
*****

210      ACTCTGTGTCTCTGCGGCGCACTTGTGTGCTTGTGGTGGCATCTCAA 827
609      ACTCTGTGTCTCTGCGGCGCACTTGTGTGCTTGTGGTGGCATCTCAA 827
80       ACTCTGTGTCTCTGCGGCGCACTTGTGTGCTTGTGGTGGCATCTCAA 827
809      ACTCTGTGTCTCTGCGGCGCACTTGTGTGCTTGTGGTGGCATCTCAA 827
814      ACTCTGTGTCTCTGCGGCGCACTTGTGTGCTTGTGGTGGCATCTCAA 827
817      ACTCTGTGTCTCTGCGGCGCACTTGTGTGCTTGTGGTGGCATCTCAA 827
819      ACTCTGTGTCTCTGCGGCGCACTTGTGTGCTTGTGGTGGCATCTCAA 827
822      ACTCTGTGTCTCTGCGGCGCACTTGTGTGCTTGTGGTGGCATCTCAA 827
831      ACTCTGTGTCTCTGCGGCGCACTTGTGTGCTTGTGGTGGCATCTCAA 825
*****

```

Figura 18 – Sequência de nucleótidos da região genômica ITS1, 5.8S e ITS2 amplificada por PCR com os primers ITS6 (Cooke & Duncan, 1997) e ITS4 (White *et al.*, 1990) em 9 isolados de *P. cinnamomi* e similaridade ClustalW entre os isolados. A existência de * assinala homologia na sequência dos nucleótidos. (Nucleótidos: 1.. 232 - “internal transcribed spacer 1” (ITS1); 233.. 391 - gene 5.8S rRNA; 392.. 827 – “internal transcribed spacer 2” (ITS2).

A sequência de bases é igual em todos os isolados de *P. cinnamomi*, com exceção do isolado 831. A sequência deste isolado tem 825 pb, menos dois nucleótidos que as sequências dos restantes isolados tendo o programa ClustalW introduzido duas deleções na região do ITS2, uma na posição 543, correspondente a uma tiamina e outra na posição 571 correspondente a uma base citosina tendo ocorrido na posição 570 uma transição, C-T (assinaladas na Figura 18 por rectângulos azuis). A sequência de bases nesta região é no isolado 831 “TGG” e não “CCGG” como a existente em todos os outros isolados. Esta última sequência de nucleótidos, corresponde a um local de corte da enzima *Msp* I, que deixou, portanto, de existir no

isolado 831 e determina o aparecimento nos géis de um padrão de restrição diferente com esta endonuclease.

O programa BioEdit permite obter o padrão de restrição enzimática nos fragmentos de sequência conhecido com um largo conjunto de enzimas de restrição. No Quadro 10 indicam-se os locais de restrição com as enzimas *Alu* I, *Msp* I e *Taq* I na sequência de bases correspondentes à região genómica ITS1, 5.8S e ITS2 dos isolados de *Phytophthora* em estudo e a dimensão correspondente dos fragmentos de DNA.

Quadro 10 – Fragmentos de restrição enzimática (*Alu* I, *Msp* I, *Taq* I) na região sequenciada ITS1, 5.8S e ITS2 dos isolados de *P. cinnamomi* (BioEdit)

Padrão de restrição enzimática (Isolado de <i>Phytophthora</i>)	Dimensão da região ITS1, 5.8S e ITS2 (pb)	Posição de corte com a enzima <i>Alu</i> I, <i>Msp</i> I, <i>Taq</i> I	Dimensão em pb dos fragmentos de DNA (nos géis)
M1 (80, 210, 609, 814, 817, 822)	827	<i>Alu</i> I – 154, 696	>154, 542 , >136
	827	<i>Msp</i> I – 353, 574, 720	>353, 221, 146 , >112
M2 (80, 819)		<i>Taq</i> I – 74, 86, 267, 326, 520, 610, 760, 767	>74, 12, 181, 59, 194, 90, 150, 7 , >65
M2 (831)	825	<i>Alu</i> I – 154, 696	>154, 542 , >144
		<i>Msp</i> I – 353, 720	>353, 367 , >110
		<i>Taq</i> I – 74, 86, 267, 326, 520, 610, 760, 767	>74, 12, 181, 59, 194, 90, 150, 7 , >63

> Fragmentos que aparecerão nos géis com dimensões superiores ao indicado por se situarem na extremidade 3' da região 18 S ou extremidade 5' do 28 S que foram igualmente amplificados na reacção PCR e não incluídos na análise de restrição enzimática do fragmento ITS1, 5.8S e ITS2.

Alguns isolados de *P. cinnamomi* com padrão de restrição **M2** evidenciaram igual sequência de bases que os isolados **M1** e apenas o isolado 831 (**M2**) evidenciou um perfil de corte diferente com a enzima *Msp* I.

Este padrão não é exclusivo dos isolados por nós obtidos em castanheiro uma vez que também o isolado de *P. cinnamomi* CBS – 270.55 obtido de *Chamaecyparis lawsoniana* evidenciou o padrão **M2** de restrição enzimática com *Msp* I (resultado não apresentado).

A comparação das sequências pelo programa FASTA (Pearson & Lipman, 1988) que permite determinar a homologia com sequências já existentes nas bases de dados (EMBL) evidenciou homologia de 100 % com *P. cinnamomi* em mais de 30 sequências depositadas na base de dados e homologia muito elevada da ordem dos 99,6 % quando se realizou o FASTA da sequência de bases da região ITS1,5.8S e ITS2 do isolado 831. No Quadro 11 estão indicados alguns dos números de acesso dessas sequências. De referir que nenhuma sequência da base de dados com homologia com *P. cinnamomi* (831) evidencia as alterações encontradas na sequência de bases deste isolado.

A sequência do isolado de *P. cinnamomi* obtido em noqueira (210) evidenciou homologia completa desta região com os isolados desta espécie quando obtido em castanheiro como pode ser constatado na Figura 18.

Quadro 11 – Homologia da região amplificada por PCR com os primers ITS6 (Cooke & Duncan, 1997) e ITS4 (White *et al.*, 1990) dos isolados de *P. cinnamomi* 822 e 831 pelo programa FASTA

Sequência de nucleótidos	Espécie	Número de acesso	Similaridade (%)
ITS1, 5.8S e ITS2 Isolado 822	<i>P. cinnamomi</i>	AY 302152.1	100
		AY 302153.1	
		AY 302143.1	
		AY 302142.1	
		AY 302147.1	
ITS1, 5.8S e ITS2 Isolado 831	<i>P. cinnamomi</i>	AY 302152.1	99.644
		AY 302153.1	
		AY 302143.1	
		AY 302142.1	
		AY 302147.1	

A sequência de nucleótidos da região ITS1, 5.8S e ITS2 do isolado 101 indicado na Figura 19, identificado pelo método ITS – RFLP como *P. cambivora* evidenciou homologia muito elevada com as sequências da região ITS1, 5.8S e ITS2 de *P. cambivora* existentes na base de dados EMBL (Quadro 12).

Quadro 12 – Homologia da região amplificada por PCR com os primers ITS6 (Cooke & Duncan, 1997) e ITS4 (White *et al.*, 1990) do isolado de *P. cambivora* 101, pelo programa FASTA.

Sequência de nucleótidos	Espécie	Número de acesso	Similaridade (%)
ITS1, 5.8S e ITS2 Isolado 101 (AJ 438991)	<i>P. cambivora</i>	AJ344547.1	99.760
	<i>P. cambivora</i>	AJ344548.1	99.760
	<i>P. cambivora</i>	AF139369.1	99.519
	<i>P. cambivora</i>	AF266763.1	99.519
	<i>P. fragariae</i>	AF139370.1	99.159
	<i>P. fragariae</i>	AF266762.1	99.159
	<i>P. cambivora</i>	AJ007040.1	98.936

O alinhamento das sequências da região do ITS1, 5.8S e ITS2 de *P. cinnamomi* (822) e *P. cambivora* (101 = AJ438991) foi obtido no programa ClustalW e está apresentado na Figura 19.

822	-----CCACACCTAAAAAACTTTCACGTGAACCGTATCAACCCAATTAGTT	47
AJ438991	CGGTTCCAAATTACCACACCTAAAAAACTTTCACGTGAACCGTATCAACCCAATTAGTT	60

822	GGGGGCTGCTCTGGGGGGCGGCTGTCGATGTCAAAGTCGACGGCTGCTGCTGCGTGGCG	107
AJ438991	GGGGGCTAGTCCCTGGGGGGCGGCTGTCGATGTCAAAGTCGACGGCTGCTGCTGCTGTCG	120

	DC4	DC9
822	GGCCCTATCACTGGCGAGCGTTTGGGTCCCTCTCGGGGCTAAGTCTAGCTAGCCCTCT--	165
AJ438991	GGCCCTATCA-TGGCGAGCGTTTGGGTCCCTCTCGGGGGAAGTCTAGCCAGTAGCCCTTAT	179
	*****	*
822	CTTTTAAACCCATTCTGTAATACTGAACATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAAC	225
AJ438991	TTTTTAAACCCATTCTGTAATACTGAATATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAAC	239

822	TAGATAGCAACTTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAA	285
AJ438991	TAGATAGCAACTTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAA	299

822	CTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTGAGTCTAGTCTCGAAATTTTGAACGCATATT	345
AJ438991	CTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTGAGTCTAGTCTCGAAATTTTGAACGCATATT	358

822	GCACCTCCGGGTTAGTCTCGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTGGCT	405
AJ438991	GCACCTCCGGGTTAGTCTCGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTGGCT	418

822	CTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGAGGTGCCAGACGTGAGGTGTCTTGC GGCGGT	465
AJ438991	CTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGAGGTGCCAGACGTGAGGTGTCTTGC GGGTGG--	477
	*****	*
822	CTTCGGACTGGC-TGTGAGTCCCTTGAAATGTAAGTGAAGTGTACTTCTTTGCTCGAAA	524
AJ438991	CTTCGGGCTGCCCTGCGAGTCCCTTGAAATGTAAGTGAAGTGTACTTCTTTGCTCGAAA	537

822	AGCGTGACGTGCTGGTTGTGGAGGCTGCTGTATGGCCAGTCCGGGACCGGTTTGTCTG	584
AJ438991	AGCGTGACGTGCTGGTTGTGGAGGCTGCTGTATGGCCAGTCCGGGACCGGTTTGTCTG	597

	DC5	
822	CTGCGGCGTTTAAATGGAGGAGTGTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAAAG	644
AJ438991	CTGCGGCGTTTAAATGGAGGAGTGTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAAAG	657
	*****	*

```

822      CGCTTATTGGATGTTCTTCTGCTGTGGCGGTACGGATCGGTGAACCGTAGCTGTGCTAG 704
AJ438991 CGCTTATTGGACGTTCTTCTGCTGTGTGGCGGTACGGATCGGTGAACCGTAGCTGTGCGAG 717
*****
822      GCTTGGCGTTTGAACCGGCGGTGTTG-TTGCGAAGTAGGGTGGCGGCTTCGGCTGTGCGAG 763
AJ438991 GCTTGGCCTTTGAACCGGCGGTGTTGGTCGCGAAGTAGGGTGGCGGCTTCGGCTGTGCGAG 777
*****
822      GG-TCGATCCATTGGGAACTCTGTGTCTCTGCGGCGCACTT--GTGTGCTTGTGGTGGC 820
AJ438991 GGGTCGATCCATTGGGAACT-TGTGTCTCTGCGGCGCGCTTCGGTGTGTGCTGCGGGTGGC 836
** *****
822      ATCTCAA----- 827
AJ438991 ATCTCAATTGCCCTTG 852
*****

```

Figura 19 – Similaridade (ClustalW) da região ITS1, 5.8S e ITS2 amplificada pelos primers ITS6 (Cooke & Duncan, 1997) e ITS4 (White *et al.*, 1990) das espécies *P. cinnamomi* (822) e *P. cambivora* (101= AJ438991). A inexistência de * assinala as diferenças na sequência de nucleótidos. Nucleótidos a azul correspondem à sequência de nucleótidos do gene 5.8S rRNA. Estão ainda assinalados os primers DC5 (SRCI) e DC4, DC9 (Cacciolla *et al.*, 2001) a utilizar em “Nested” PCR.

O programa introduziu cinco deleções em *P. cinnamomi* e uma em *P. cambivora* para alinhamento dos nucleótidos da região ITS1, 5.8S e ITS2 das duas espécies.

A região ITS1 evidencia 21 diferenças, nove dessas diferenças situam-se entre a posição 52 e 67 o que confere a esta região maior variabilidade, apresentando cinco transições C-T, três transversões G-C e uma T-A. As restantes 12 diferenças encontram-se dispersas ao longo desta região genómica.

A região codificante 5.8S não apresentam alterações sendo perfeitamente homologas nas duas espécies.

A região ITS2 apresenta 25 diferenças dispersas por toda a região com seis transições C-T e cinco G-A três transversões G-C e três T-G.

Na Figura 19 foram assinalados os primers DC5 (SRCI), DC4 e DC9 de Cacciolla *et al.* (2001) que serão utilizados em “Nested PCR” neste trabalho.

A sequência de bases da região genómica amplificada por PCR com os primers ITS6 (Cooke & Duncan, 1997) e ITS4 (White *et al.*, 1990) correspondente à região ITS1, 5.8S e ITS2 dos isolados de *P. cinnamomi*, 817, isolada de castanheiro e do isolado 210 obtido em noqueira e ainda o isolado 101 obtido de castanheiro mas da espécie *P. cambivora* foram depositados na base de dados EMBL tendo-lhe sido atribuído o número de acesso AJ421265, AJ457835, AJ 438991 respectivamente.

No Quadro 13 está assinalada a identificação ao nível da espécie dos diferentes isolados de *Phytophthora* obtidos em castanheiro assim como o tipo de restrição enzimática obtido com a enzima *Msp* I (**M1**, **M2**) nos isolados de *P. cinnamomi*.

Quadro 13 – Identificação dos Isolados de *Phytophthora* obtidos em castanheiro (*Castanea sativa*) ao nível de espécie e padrão de restrição da enzima *Msp* I em *P. cinnamomi*.

Isolado	Local	Concelho	Técnica de isolamento	Espécie de <i>Phytophthora</i>	Padrão de restrição <i>Msp</i> I (M1, M2)
801	Rossas	Bragança	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
802	Rossas	Bragança	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
803	Rossas	Bragança	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
804	Rossas	Bragança	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
806	Rossas	Bragança	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
807	Rossas	Bragança	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
808	Rossas	Bragança	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
809	Rossas	Bragança	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
810	Rossas	Bragança	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
811	Sobreiró	Vinhais	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
812	Agrochão	Vinhais	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M2
813	Agrochão	Vinhais	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M2
814	Espinhoso	Vinhais	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
816	Pinela	Bragança	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
817	Pinela	Bragança	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
818	Pinela	Bragança	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
819	Penhas Juntas	Vinhais	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M2
820	Penhas Juntas	Vinhais	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M2
821	Amarante	Amarante	Diagnóstico	<i>P. cinnamomi</i>	M1
822	Amarante	Amarante	Diagnóstico	<i>P. cinnamomi</i>	M1
823	Amarante	Amarante	Diagnóstico	<i>P. cinnamomi</i>	M1
824	Amarante	Amarante	Diagnóstico	<i>P. cinnamomi</i>	M1
825	Amarante	Amarante	Diagnóstico	<i>P. cinnamomi</i>	M1
826	Amarante	Amarante	Diagnóstico	<i>P. cinnamomi</i>	M1
827	Amarante	Amarante	Diagnóstico	<i>P. cinnamomi</i>	M1
828	Agrochão	Vinhais	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M2
831	Penhas Juntas	Vinhais	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M2
202	Bornes	M. Cavaleiros	Diagnóstico	<i>P. cinnamomi</i>	M2
609	Bornes	M. Cavaleiros	Diagnóstico	<i>P. cinnamomi</i>	M1
610	Bornes	M. Cavaleiros	Diagnóstico	<i>P. cinnamomi</i>	M2
704	Rossas	Bragança	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M2
709	Agrochão	Vinhais	Planta Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M2
112	Paredes	Bragança	Diagnóstico	<i>P. cinnamomi</i>	M1
115	Paredes	Bragança	Diagnóstico	<i>P. cinnamomi</i>	M1
120	Paredes	Bragança	Diagnóstico	<i>P. cinnamomi</i>	M1
122	Paredes	Bragança	Tecido Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M2
123	Paredes	Bragança	Tecido Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
124	Paredes	Bragança	Tecido Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
125	Paredes	Bragança	Tecido Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
128	Paredes	Bragança	Tecido Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
129	Paredes	Bragança	Tecido Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
130	Paredes	Bragança	Tecido Armadilha	<i>P. cinnamomi</i>	M1
135	Paredes	Bragança	Tecido Armadilha	<i>P. cambivora</i>	
101	Arufe	Bragança	Diagnóstico	<i>P. cambivora</i>	
102	Arufe	Bragança	Diagnóstico	<i>P. cambivora</i>	
105	Rossas	Bragança	Diagnóstico	<i>P. cinnamomi</i>	M1
106	Rossas	Bragança	Diagnóstico	<i>P. cinnamomi</i>	M1
107	Rossas	Bragança	Diagnóstico	<i>P. cambivora</i>	
108	Rossas	Bragança	Diagnóstico	<i>P. cinnamomi</i>	M1

4.4. Caracterização molecular por RAPD-PCR das espécies de *Phytophthora* associadas com a doença da tinta do castanheiro

4.4.1. Selecção dos primers “10-mer”

Para seleccionar os primers que proporcionavam amplificações polimórficas nas diferentes espécies de *Phytophthora* e nos diferentes isolados de *P. cinnamomi*, testaram-se 40 primers “10-mer”, 20 da série OPO e 20 da série OPU.

Depois de determinadas as condições químicas e físicas que permitiram a amplificação de fragmentos RAPD seleccionaram-se por análise visual os primers “10-mer” que originavam amplificação no maior número de espécies de *Phytophthora* e os que indicavam polimorfismo nos isolados referência de *P. cinnamomi*. Numa segunda fase avaliaram-se com estes primers a diversidade genotípica dos isolados de *Phytophthora* isolados de castanheiro.

Com esta metodologia seleccionaram-se 5 primers da série OPU (1, 3, 15, 16, e 18). Nesta série (OPU 01-20) 50% dos primers não amplificaram qualquer tipo de produto, cinco evidenciaram polimorfismo e os restantes cinco proporcionaram amplificações em apenas alguma das espécies de *Phytophthora*, razão pela qual não foram considerados adequados para os objectivos pretendidos.

Na série OPO (01-20), cinco primers não deram origem a produtos de amplificação, nove originaram amplificação em apenas algumas espécies e seis primers OPO (10, 11, 12, 15, 19, 20) originaram polimorfismo nos isolados de *P. cinnamomi*.

O primer OPO-08 e OPO-09 evidenciaram um padrão de amplificação com um fragmento único e com aproximadamente 700 pb em *P. cinnamomi*, não estando presente em mais nenhuma das espécies de *Phytophthora* incluídas neste estudo. Estes fragmentos de amplificação por serem característicos de *P. cinnamomi* foram considerados com potencial para o desenvolvimento de um marcador molecular (SCAR) para detecção e identificação de *P. cinnamomi* em tecidos vegetais e na água do solo que se concretizou em termos experimentais e será apresentado mais adiante neste trabalho.

4.4.2. Análise do polimorfismo RAPD

4.4.2.1. Espécies de *Phytophthora* e culturas de referência de *P. cinnamomi*

Nas espécies de *Phytophthora* de referência (Quadro 3) *P. cactorum*, *P. quercina*, *P. nicotiana*, *P. citricola*, *P. capsici*, *P. cryptogea*, *P. syringae*, *P. cambivora* e seis culturas de referência de *P. cinnamomi* (Quadro 3) avaliou-se o polimorfismo RAPD com os primers anteriormente seleccionados a que se adicionou nesta fase o critério da reprodutibilidade do padrão de amplificação.

Com os primers da série OPU (1, 3, 15, e 18) e o primer 20 da série OPO obtiveram-se 58 bandas com as características indicadas no Quadro 14.

Quadro 14 – Fragmentos de amplificação obtidos com cada um dos primers “10-mer” (Diferentes espécies de *Phytophthora*)

Primer “10-mer”	Número de Fragmentos de amplificação	Variação da dimensão dos fragmentos (pb)
OPO-20 (5'CCTCCAGTGT 3')	10	818 – 265
OPU-01 (5'ACGGACGTCA3')	10	1239 – 276
OPU-03 (5'CTATGCCGAC3')	12	1151 – 211
OPU-15 (5'ACGGGCCAGT3')	13	832 – 231
OPU-18 (5'GAGGTCCACA3')	13	1167 - 335

Cada fragmento de amplificação foi considerado uma característica diferente e analisado como presente ou ausente no programa de análise de imagem Diversity Database (Bio-Rad).

O padrão de amplificação obtido com o primer OPU-1 e OPU-18 em todos os isolados em estudo está apresentado na Figura 20, a e b.

O padrão de amplificação dos isolados de *P. cinnamomi* 626 (A1) e 629 (A2) cordialmente cedidos pela Dra Werres do Federal Biological Research Center da Alemanha, os isolados 101 e 102 de *P. cambivora* e 270 de *P. cinnamomi* não foram considerados na análise final por não terem sido considerados com o primer OPO-20.

O isolado *P. cinnamomi* var. *parvispora* (coluna 6 dos géis) evidenciou um padrão de amplificação diferente dos isolados de *P. cinnamomi* com todos os primers em estudo.

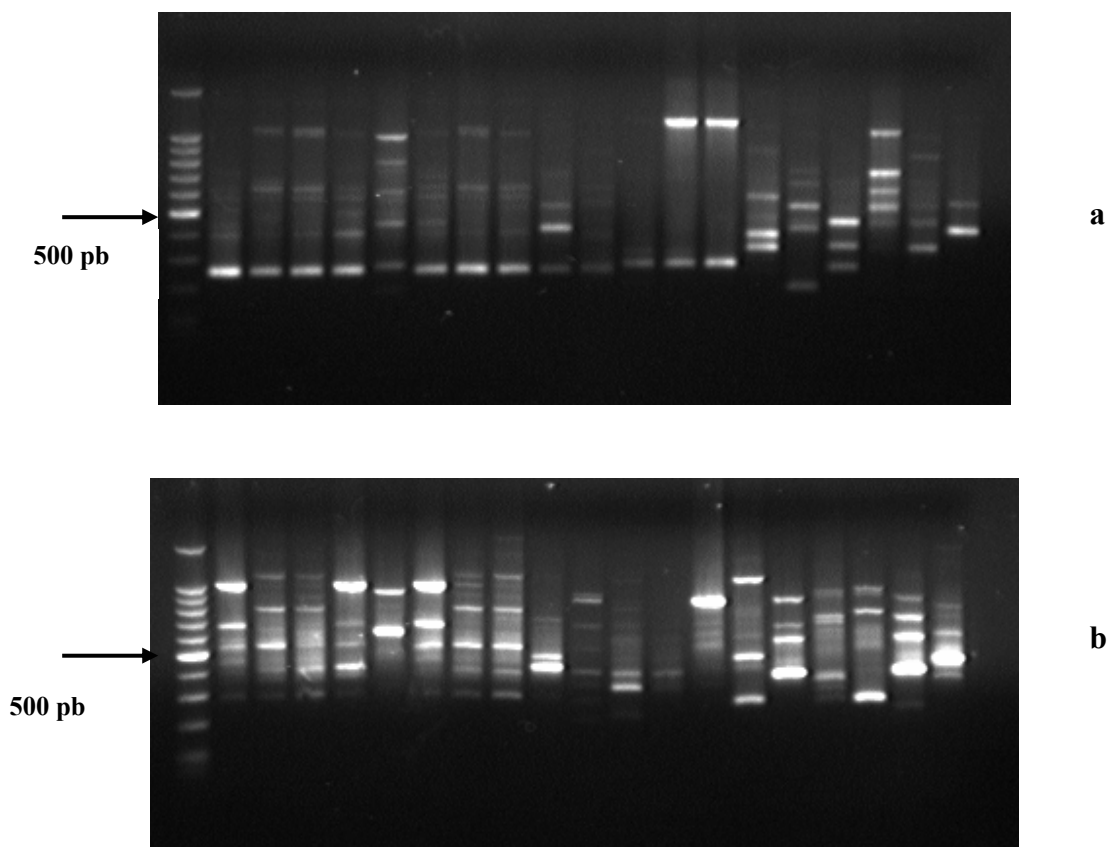


Figura 20 a, b - Fragmentos de amplificação dos primers “10-mer”; a) OPU-1, b) OPU-18 obtidos no DNA genómico de diferentes isolados de *P. cinnamomi* (culturas referência) e de diferentes espécies de *Phytophthora*. Coluna 1 – Marcador molecular (100 bp Ladder, Promega); Coluna (2-10) – Isolados referência de *P. cinnamomi* (690, 626, 822, 80, 411, 341, 342, 2965, 270); Coluna (11-20) – diferentes espécies de *Phytophthora*, (*P. cambivora* (101, 102), 248, 304, 789, 535, 221, 521, 307, 2351). Igual identificação das colunas na parte inferior da Figura 20 b.

O grau de similaridade entre os isolados foi determinado no programa “Diversity database” (Bio-Rad) pelo coeficiente de Dice e representado na forma de dendrograma pelo método de Ward’s (Figura 21). A similaridade é elevada entre os isolados de *P. cinnamomi* (51 - 82%) com excepção de *P. cinnamomi* var. *parvispora* que apresenta uma similaridade entre os 24,9 – 34,8 % com os outros isolados de *P. cinnamomi*.

A similaridade entre as diferentes espécies de *Phytophthora* variou de 3,6 a 35,6%.

A utilização de outros métodos previstos no programa de análise para o cálculo da similaridade, como o coeficiente de Jaccard, proporcionou dendrogramas semelhantes ao obtido pelo método de Ward's.

Os isolados de *P. cinnamomi*, com excepção de *P. cinnamomi* var. *parvispora*, ficam agrupados num único cluster reflectindo assim elevada similaridade entre os diferentes isolados desta espécie.

Os valores de similaridade de *P. cinnamomi* var. *parvispora* com *P. cinnamomi* (24,9 - 34,8 %) situam-se na gama de valores existente entre as espécies diferentes.

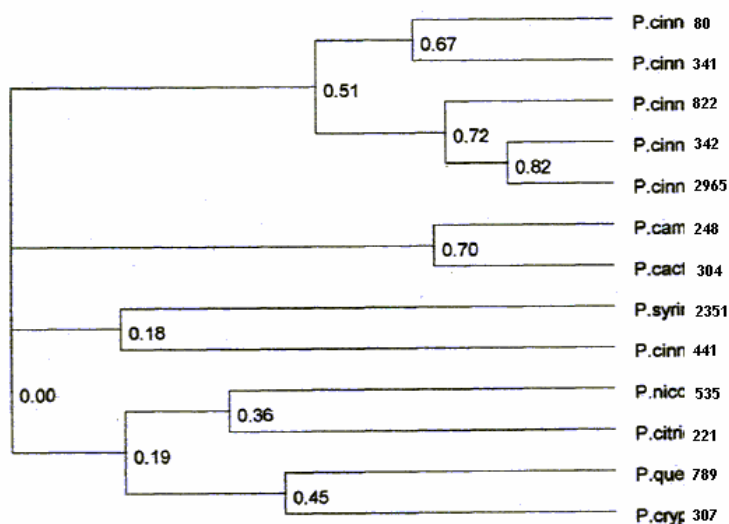


Figura 21 – Dendrograma Ward's baseado no coeficiente de Dice resultante da análise numérica dos fragmentos de amplificação dos primers OPO-20 e OPU-01; OPU-03; OPU-15, OPU-18 no DNA genómico de diferentes espécies de *Phytophthora* e diferentes isolados de *P. cinnamomi* (análise conjunta).

4.4.2.2. Espécies de *Phytophthora* isoladas de castanheiro (*Castanea sativa*)

Para avaliar o polimorfismo nos perfis de amplificação nos isolados de *Phytophthora* obtidos em castanheiro utilizaram-se os primers OPU-01, OPU-03, OPU-15 e OPU-19 nos isolados obtidos em Paredes que incluía um isolado de *P. cambivora*.

Os perfis de amplificação evidenciaram grande uniformidade (Figura 22) com um número de fragmentos de amplificação que variaram de três a oito por primer conforme o indicado no Quadro 15.

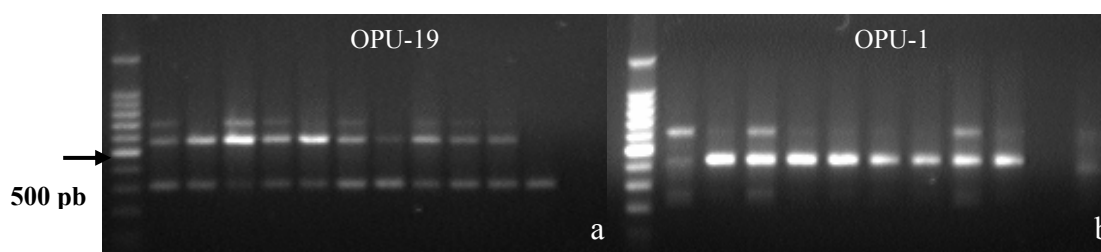


Figura 22 (a, b) – Fragmentos de amplificação por PCR com o primer OPU-19 (a) e OPU-1 (b) no DNA genômico de diferentes isolados de *Phytophthora* obtidos em castanheiro (*Castanea sativa*). Coluna 1 – Marcador molecular (100 bp Ladder, Promega) seguido sequencialmente dos seguintes isolados de *Phytophthora* 112, 115, 120, 122, 123, 124, 125, 128, 129, 130, 135. Igual identificação das colunas na parte (b) da figura.

Quadro 15 – Fragmentos de amplificação obtidos com cada um dos primers “10-mer” em isolados de *Phytophthora* obtidos em castanheiro

Primer “10-mer”	Número de Fragmentos amplificados	Varição da dimensão dos fragmentos (pb)
OPU-01 (5’ACGGACGTCA3’)	3	615 – 268
OPU-03 (5’CTATGCCGAC3’)	7	1377 – 273
OPU-15 (5’ACGGGCCAGT3’)	8	873 – 257
OPU-16 (5’CTGCGCTGGA3’)	7	789 – 489
OPU-19 (5’GTCAGTGCGG3’)	3	718 – 327

A análise conjunta dos resultados obtidos com os cinco primers “10-mer” pelo coeficiente de Dice evidenciaram similaridade muito elevada (> 57%) entre os isolados de *P. cinnamomi* obtidos em castanheiro como pode ser constatada na matriz de similaridade obtido pelo coeficiente de Dice (Quadro 16).

O isolado 135, classificado como *P. cambivora*, apresenta similaridade reduzida com os isolados da espécie *P. cinnamomi*.

Quadro 16 – Coeficiente de similaridade (Dice) (%) entre os diferentes isolados de *Phytophthora* obtidos em castanheiro (Paredes)

Isolados		Similaridade (Dice) (%)									
112	100.0										
115	67.9	100.0									
120	73.6	69.3	100.0								
122	77.3	79.2	77.3	100.0							
123	77.7	78.0	73.1	84.1	100.0						
124	71.3	68.7	85.9	75.4	69.5	100.0					
125	62.3	65.9	57.1	75.2	73.7	59.4	100.0				
128	75.0	73.3	79.4	75.6	77.3	76.4	58.1	100.0			
129	71.9	71.2	88.4	79.6	70.9	93.6	61.6	77.1	100.0		
130	74.3	72.1	67.9	73.2	68.4	69.8	59.8	71.9	71.7	100.0	
135	29.1	22.9	22.4	18.9	16.5	18.1	25.0	24.7	22.0	25.6	100.0

O dendrograma proporcionado pelo método Ward's separa os isolados em estudo em dois "clusters" ou grupos, um constituído apenas pelo isolado de *P. cambivora* (135) e outro com todos os isolados de *P. cinnamomi* (Figura 23).

Os isolados de *P. cinnamomi* obtidos de plantas de castanheiro com sintomas da doença da tinta ou do solo pelo método de tecido armadilha em Paredes ficaram agrupados em dois grupos. No grupo RAPD 2-a ficam incluídos os isolados 120, 129 e 124, no grupo RAPD 2-b os isolados 130, 128, 112, 125, 115, 123, 122.

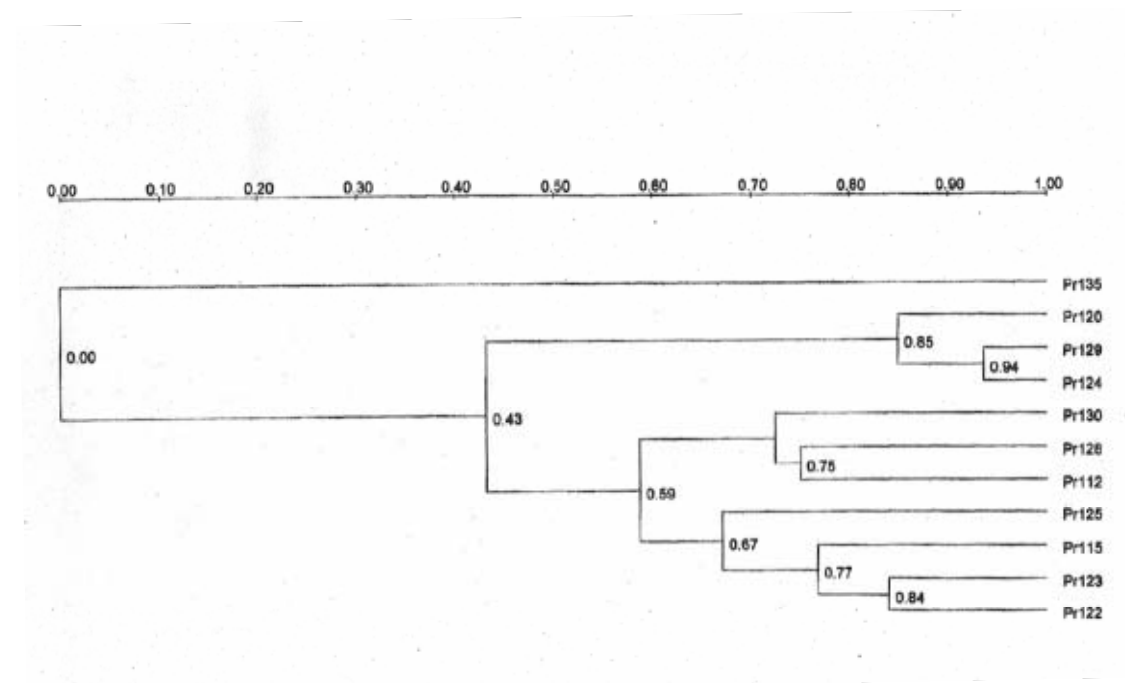


Figura 23 – Dendrograma Ward's baseado no coeficiente de Dice resultante da análise numérica dos fragmentos de amplificação dos primers OPU-01; OPU-03; OPU-15, OPU-16 e OPU-19 obtidos no DNA genómico de diferentes isolados de *Phytophthora* obtidos de castanheiro (análise conjunta).

Resultados semelhantes foram obtidos com a utilização de outros coeficientes do programa Diversity database (Bio-Rad).

Os padrões de amplificação nos diferentes isolados de *P. cinnamomi* evidenciaram com alguma surpresa uma uniformidade muito elevada e a variabilidade entre os isolados foi associada, em quase todos os casos, à não amplificação de uma determinada banda. De referir que com a aplicação desta técnica obtivemos padrões distintos com a utilização de DNA dos mesmos isolados estando a variação associada à não amplificação de bandas consideradas características por estarem presentes em amplificações anteriores como pode ser constatado na Figura 24.

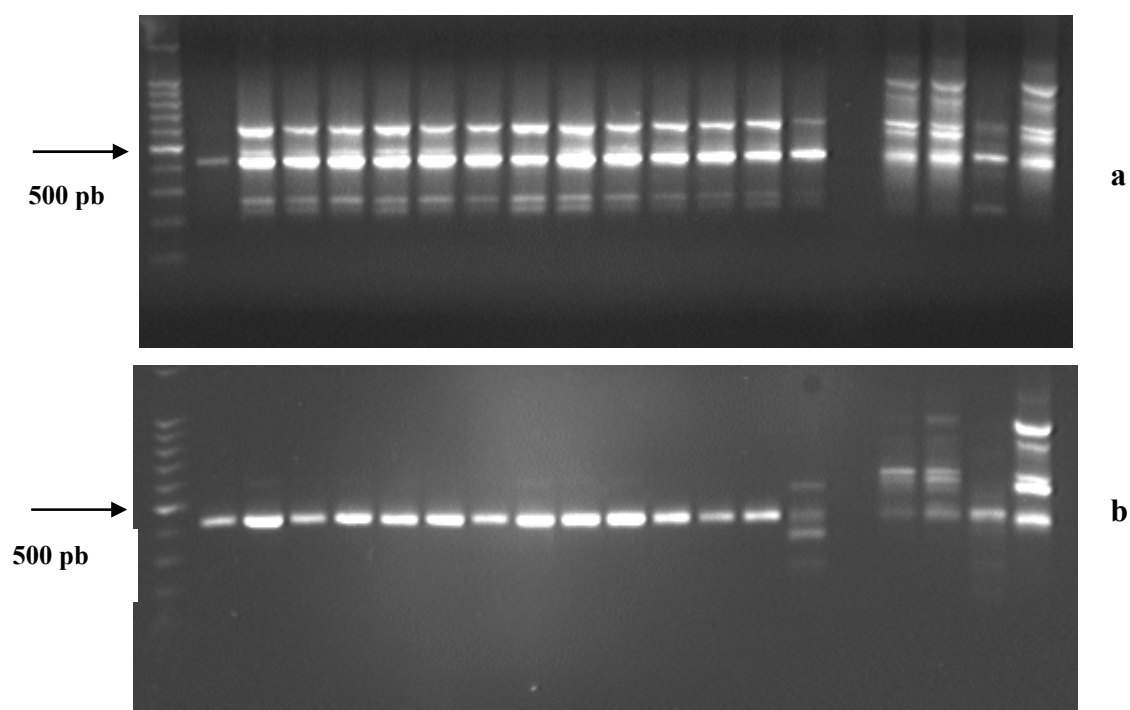


Figura 24 a, b– Fragmentos de amplificação por PCR com o primer OPU-01 nos isolados de *Phytophthora* patogénicos em castanheiros (Rossas) obtidos em experiências independentes com a utilização do mesmo DNA genómico. Coluna 1 – Marcador molecular (100 bp Ladder, Promega); Coluna (2-20) – Isolados de *Phytophthora* (801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 105, 106, 108, 107, 901, 101, 102, 103, 104). Igual identificação das colunas na parte inferior da Figura 24 (b).

4.5. Sensibilidade dos Isolados de *P. cinnamomi* e *P. cambivora* ao metalaxil “*in vitro*”

Do conjunto dos isolados indicados no Quadro 2, 37 % evidenciaram crescimento à concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de metalaxil. Todos os isolados identificados como *P. cambivora* cresceram a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de metalaxil enquanto na espécie *P. cinnamomi* apenas 14 isolados (31 %) evidenciaram crescimento.

Para avaliar a capacidade de crescimento a concentrações mais elevadas de metalaxil os isolados que evidenciaram crescimento na primeira fase do teste foram posteriormente avaliados em dois ensaios independentes na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de metalaxil.

Dos 14 isolados de *P. cinnamomi* testados na segunda fase de avaliação (Quadro 17) apenas 50 % cresceram à concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de metalaxil. Os resultados do crescimento dos isolados à concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de metalaxil não são concordantes nos dois ensaios realizados. Nenhum dos isolados cresceu à concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ no ensaio E1 enquanto no ensaio E2 quatro isolados evidenciaram crescimento a esta concentração.

Todos os isolados de *P. cambivora* (4 isolados) cresceram à concentração de 10 e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de metalaxil com exceção do isolado 101 que não cresceu na concentração mais elevada nos dois ensaios realizados.

A sensibilidade dos isolados ao metalaxil é diferente nas duas espécies de *Phytophthora* associadas com a doença da tinta do castanheiro. *P. cinnamomi* apresenta maior sensibilidade ao metalaxil e também maior variabilidade de crescimento nas diferentes concentrações: 69 % dos isolados não crescem à concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de metalaxil enquanto 15 % dos isolados crescem a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os isolados de *P. cambivora* evidenciaram menor sensibilidade ao metalaxil e uma maior uniformidade de crescimento nas diferentes concentrações estudadas.

Quadro 17 – Redução do crescimento (%) dos isolados de *P. cinnamomi* e *P. cambivora* a diferentes concentrações de metalaxil nos ensaios (E1) e (E2)

Concentração de metalaxil ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ensaio	Isolados de <i>Phytophthora</i>										
		823	826	811	801	108	107	101	102	135	122	125
1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	E1	74,2	68,6	20,9	65,8	64,0	29,5	51,4	***	34,7	***	***
10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	E1	96,6	96,5	53,8	96,0	81,0	50,0	45,9	***	50,0	***	***
20 $\mu\text{g mL}^{-1}$	E1	—	—	—	—	—	—	—	***	56,0	***	***
1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	E2			0,5	75,3	++	72,4	56,0	70,5	++	28,2	29,6
10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	E2	—	—	59,6	84,4	++	77,9	12,2	67,1	++	84,9	50,0
20 $\mu\text{g mL}^{-1}$	E2	—	—	66,6	94,6	++	73,9	—	77,6	++	91,2	50,0

*** Infecção por bactérias

— Sem crescimento

++ Não incluído

A sensibilidade dos isolados ao metalaxil pode ser avaliada pela determinação do valor do EC_{50} .

No ensaio E1 todas as rectas foram definidas com os valores de redução do crescimento obtidos a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de metalaxil, uma vez que nenhum isolado de *P. cinnamomi* cresceu a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ desta substância activa. No ensaio E2 os valores de EC_{50} foram determinados com base no crescimento obtido nas três concentrações estudadas.

No ensaio E2 não se determinou o valor do EC_{50} nas espécies de *P. cambivora* por se ter obtido uma percentagem de inibição muito semelhante em todas as concentrações de metalaxil estudadas e nos isolados 101 e 102 obteve-se mesmo uma menor redução do crescimento a maiores concentrações de metalaxil o que retira sentido biológico ao valor calculado nesta circunstância, tendo ocorrido igual situação no isolado 101 de *P. cambivora* no ensaio E1.

Os valores de EC_{50} (Quadro 18) evidenciam uma diferença acentuada na sensibilidade ao metalaxil dos isolados de *P. cinnamomi* e *P. cambivora* necessitando esta última espécie maiores concentrações de metalaxil para se obter o mesmo nível de redução do crescimento.

Em *P. cinnamomi* os valores calculados de EC_{50} apresentam, como era esperado, grande variabilidade. Dos sete isolados com capacidade de crescimento a

concentrações de metalaxil superiores a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, quatro dos isolados apresentam um valor do EC_{50} inferior a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e três isolados, cerca de 7 % dos isolados de *P. cinnamomi*, apresentam valores superiores como pode ser constatado no Quadro 18. O valor de EC_{50} no isolado 811 é semelhante nos dois ensaios realizados e indica uma menor sensibilidade ao metalaxil em cerca de 14 – 25 vezes em relação aos outros isolados em análise. O isolado 122 apresenta ainda valores superiores, o que é indicativo da variabilidade intrínseca de *P. cinnamomi* em relação a este fungicida e igualmente indicativo da possibilidade do aparecimento da resistência num curto período de tempo, por efeito da pressão de selecção do metalaxil.

Quadro 18 – Parâmetros da recta e valores do EC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos diferentes isolados de *Phytophthora* nos ensaios E1 e E2

Isolado	Ensaio E1		Isolado	Ensaio E2	
	Parâmetros da recta	EC_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$		Parâmetros da recta	EC_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$
823	$y = 1,174 x + 5,658$	0,275	823	+++	—
826	$y = 0,698 x + 5,490$	0,198	826	+++	—
811	$y = 0,958 x + 4,188$	7,040	811	$y = 1,596 x + 3,479$	8,960
801	$y = 1,342 x + 5,405$	0,499	801	$y = 0,611 x + 5,629$	0,093
108	$y = 0,521 x + 5,359$	0,204	108	—	—
122	+++	—	122	$y = 1,513 x + 4,441$	2,337
125	+++	—	125	$y = 0,439 x + 4,485$	14,801
101	$y = - 0,139 x + 5,037$	(*)	101	$y = - 1,323 x + 5,152$	(*)
102	***	—	102	$y = 0,106 x + 5,497$	(*)
107	$y = 0,534 x + 4,466$	10,00	107	$y = 0,070 x + 5,609$	(*)
135	$y = 0,413 x + 4,601$	9,220	135	—	—

+++ Sem crescimento a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$

*** - Infecção do isolado por bactérias

— - Não incluído no ensaio

(*) – Valor de EC_{50} não calculado

4.6. Marcador SCAR

4.6.1. Fragmento RAPD-PCR Característico de *P. cinnamomi*, Clonagem no p-GEM[®]-T, Transformação e Multiplicação em *E. coli*

O desenvolvimento de um marcador SCAR baseado na caracterização RAPD das espécies de *Phytophthora* exige que se teste a reprodutibilidade dos fragmentos de amplificação e se utilizem isolados de *Phytophthora* identificados de forma fiável.

Os resultados de amplificação com primers “10-mer” indicaram os primers OPO-08, e OPO-09 com perfis de amplificação que permitiriam o desenvolvimento do marcador molecular. Os primers anteriormente referidos apresentaram em *P. cinnamomi* uma banda única com aproximadamente 650 pb e diferente das outras espécies de *Phytophthora* de referência em estudo.

O primer OPO-08 proporcionou perfis de amplificação estáveis e com características que se mantiveram quando se incluiu um maior número de espécies de *Phytophthora*.

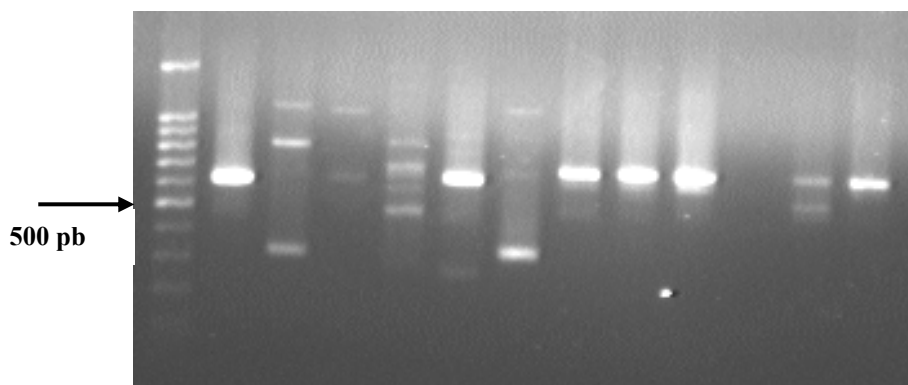


Figura 25 – Perfil de amplificação obtido com o primer “10-mer” OPO-08 em algumas espécies de *Phytophthora* de referência. Coluna 1 – Marcador molecular (100 bp Ladder, Promega); Coluna (2-13) – *P. cactorum*, *P. nicotiana*, *P. citricola*, *P. cryptogea*, *P. syringae*, *P. capsici*, *P. cinnamomi* (341), *P. cinnamomi* (342), *P. cinnamomi* (2965), *P. cambivora* (101), *P. cinnamomi* (80), *P. cinnamomi* (822).

O fragmento considerado característico de *P. cinnamomi*, com aproximadamente 650 pb, foi purificado a partir de reacções de amplificação com o primer OPO-08 no genoma dos isolados de *P. cinnamomi* referenciados como 822 e 120 e posteriormente

clonado no vector p-GEM[®]-T e multiplicado na estirpe DH5 α de *E. coli* em meio LB com ampicilina, IPTG e X-Gal conforme metodologia descrita em Material e Métodos.

Seleccionaram-se 11 colónias, de cor branca e verificou-se a presença de plasmídios recombinantes (Figura 26).

A presença de plasmídios recombinantes com o fragmento pretendido foi confirmada nas colónias identificadas como 822-1 e 120-5 e que se denominaram pG822 e pG120.



Figura 26 – DNA plasmídico das colónias de *E. coli* (estirpe DH5 α) com plasmídios recombinantes. Coluna 1 – Marcador molecular (1Kb, Promega); Coluna 2 – pGEM[®]-T; Coluna (3-13) – DNA plasmídico das colónias identificadas como: 822 (1), 822 (2), 120 (3), 120 (4), 120 (5), 120 (6), 822 (7), 822 (8), 120 (9), 822 (10), 120 (12).

A presença do inserto nos plasmídios recombinantes foi confirmada por digestão com as enzimas *Apa* I e *Sal* I (Figura 27).

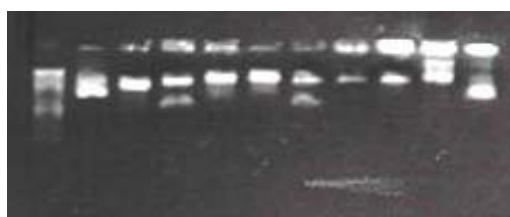


Figura 27 – Digestão enzimática com as enzimas *Sal* I e *Apa* I para confirmar a presença do fragmento de DNA pretendido. Coluna 1 – Marcador molecular (1Kb, Promega); Coluna 2 – pGEM-T; Coluna 3 – pGEM[®]-T digerido; Coluna (4-11) – 120 (5) (*Sal* I + *Apa* I); 120 (5) (*Sal* I); 120 (5) (*Apa* I); 822 (1) (*Sal* I + *Apa* I); 822 (3), 822 (8), 822 (10); DNA plasmídico.

O plasmídio recombinante obtido na colónia 120(5) que se denominou pG120 (Figura 28) depois de purificado e quantificado foi sequenciado nas duas direcções (directa e reversa) no sequenciador automático da Universidade de Salamanca.

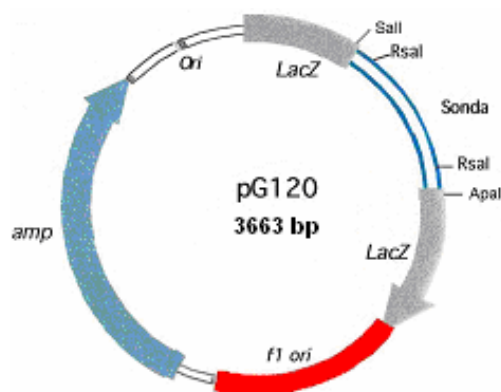


Figura 28 – Plasmídeo recombinante pG120 resultante da clonagem do fragmento de DNA amplificado mediante RAPD-PCR (OPO-08) em DNA genómico de *P. cinnamomi* (120).

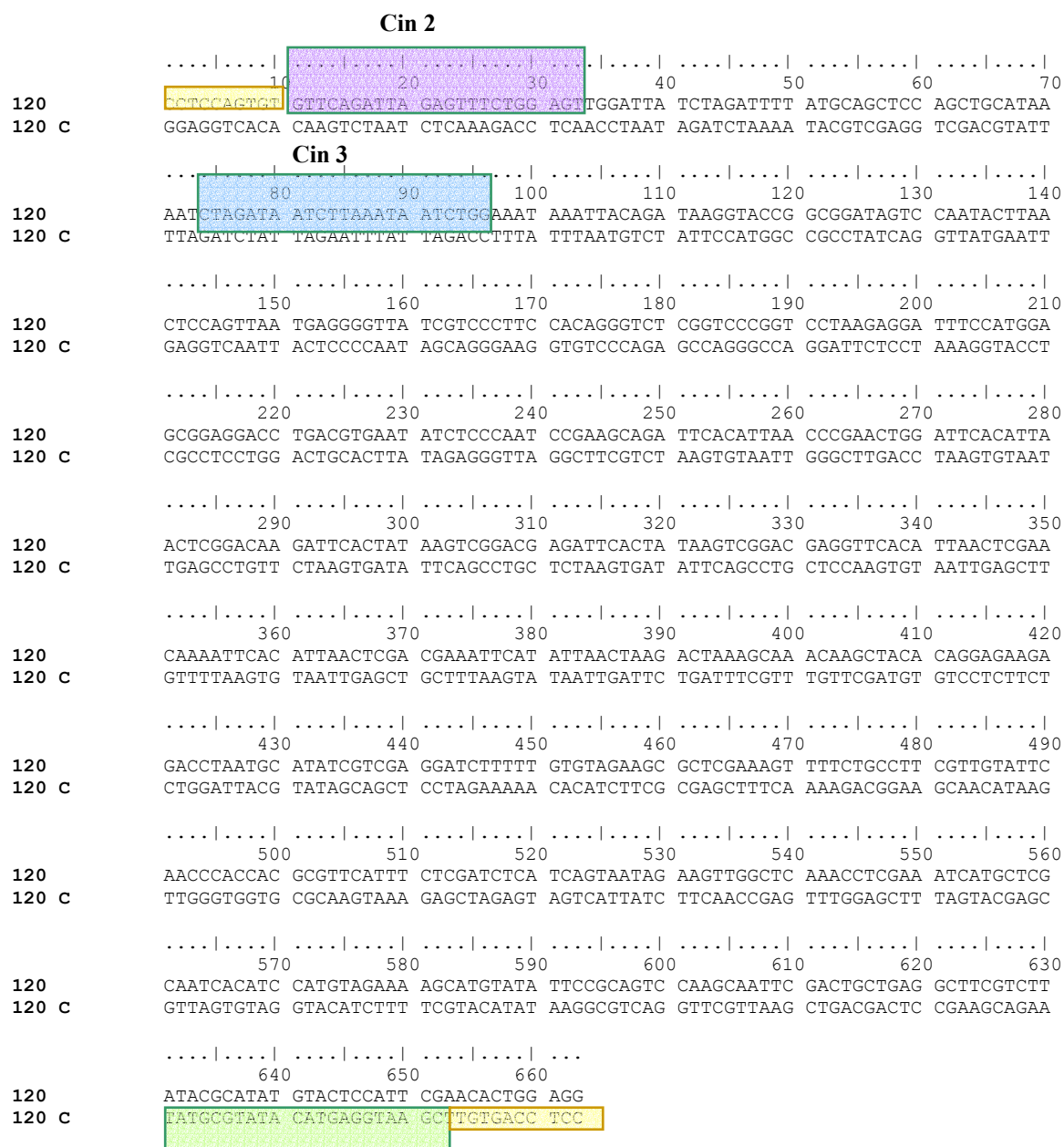
4.6.2. Sequência e Análise do Fragmento (OP120)

A sequenciação evidenciou um fragmento com 663 bp com a sequência do primer OPO-08 (CCTCCAGTGT) presente nas duas extremidades e que passamos a designar por OP120. Na Figura 29 está indicada a sequência dos nucleótidos do fragmento clonado, a sequência dos nucleótidos do primer “10-mer” (OPO-08) e os primers desenhados no fragmento específicos para detecção e identificação de *P. cinnamomi* que utilizaremos em PCR-Diagnóstico (Cin1, Cin2 e Cin3).

A sequência dos nucleótidos do fragmento OP120 foi analisado no programa BioEdit quanto à composição em ácidos nucleicos e aminoácidos (fases de leitura aberta - ORF) com mais de 50 codões nas duas cadeias de DNA.

O fragmento OP120 com 663 pb tem uma composição de nucleótidos de G+C de 42,53 % com percentagens de A – 30,62, C – 22,78, G – 19,76 e T – 26,85 e uma ORF com codão de iniciação ATG de 52 aminoácidos.

A sequência de 52 amonoácidos foi analisada no programa FASTA (Pearson & Lipman, 1988) que permite determinar a homologia com proteínas já existentes nas bases de dados de proteínas.



Cin 1

Figura 29 – Sequência de nucleótidos (cadeia directa e reversa) do fragmento de DNA característico de *P. cinnamomi* (OP120) amplificado no isolado 120 por RAPD-PCR com o primer OPO-08. Os primers Cin1, Cin2 e Cin3 desenhados na sequência serão utilizados em PCR-Diagnóstico. O primer “10-mer” OPO-08 está indicado na extremidade 5’ e 3’ da sequência.

No Quadro 19 indica-se a homologia do fragmento com proteínas da base de dados Swiss-Prot assim como o código de acesso e sua denominação.

Quadro 19 – Comparação do fragmento de DNA – OP120 com proteínas da base de dados Swiss-Prot pelo algoritmo FASTA

Código de acesso	Denominação	Nº de aminoácidos	Homologia (%)
CYCG	Diheme cytochrome	296	40,000
LQLB	Outer-membrane lipoprotein 1	217	40,385
NANA	N-acetylneuraminate lyase	292	44,118

O programa BioEdit identificou ainda outras sequências de aminoácidos, quando não se considera o codão de iniciação ATG, que analisadas no programa de bioinformática FASTA evidenciaram percentagens de homologia com proteínas da base de dados Swiss-Prot inferiores às indicadas no Quadro anterior. Uma das sequências identificadas pelo BioEdit sem codão de iniciação ATG com 110 aminoácidos evidenciou 30,8 % de homologia com “Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase”.

4.6.3. Hibridação de Ácidos Nucleicos (“Southern-blot”)

A hibridação DNA/DNA (“Southern-blot”) foi realizada para se avaliar a especificidade desta região genómica em *P. cinnamomi* e avaliar a natureza única ou de múltipla repetição no genoma.

A escolha da enzima de restrição para digestão do DNA genómico baseou-se no estudo da restrição enzimática da sequência dos nucleótidos da sonda molecular OP120 realizada no programa de bioinformática BioEdit.

A restrição enzimática da sequência de nucleótidos da sonda molecular OP120 permitiu a escolha da enzima de restrição *Rsa* I que corta o fragmento na posição 116 e 638 dando origem a fragmentos de 116, 547 e 6 pb respectivamente. Os fragmentos de menor dimensão serão menos adequados para a detecção do sinal de hibridação no entanto o fragmento de 567 pb possibilitaria a detecção do sinal de forma adequada.

O DNA genómico de *P. cambivora* (102), *P. cinnamomi* (120 e 341.72), *P. cactorum*, *P. quercina*, *P. nicotiana*, *P. citricola*, *P. capsici*, *P. cryptogea* da levedura *R. mucilaginosa* e castanheiro (*Castanea sativa*) foi digerido com *Rsa* I.

O DNA de cada um dos organismos foi inicialmente quantificado de forma a utilizar-se 10 µg de DNA em cada uma das reacções de restrição.

A hibridação “Southern-blot” com o fragmento OP120 marcado com digoxigenina (Figura 30) conforme descrito em (3.9.6.) deu origem a sinais de hibridação em todas as espécies de *Phytophthora* na região dos 3000 pb com excepção da espécie *P. quercina*.

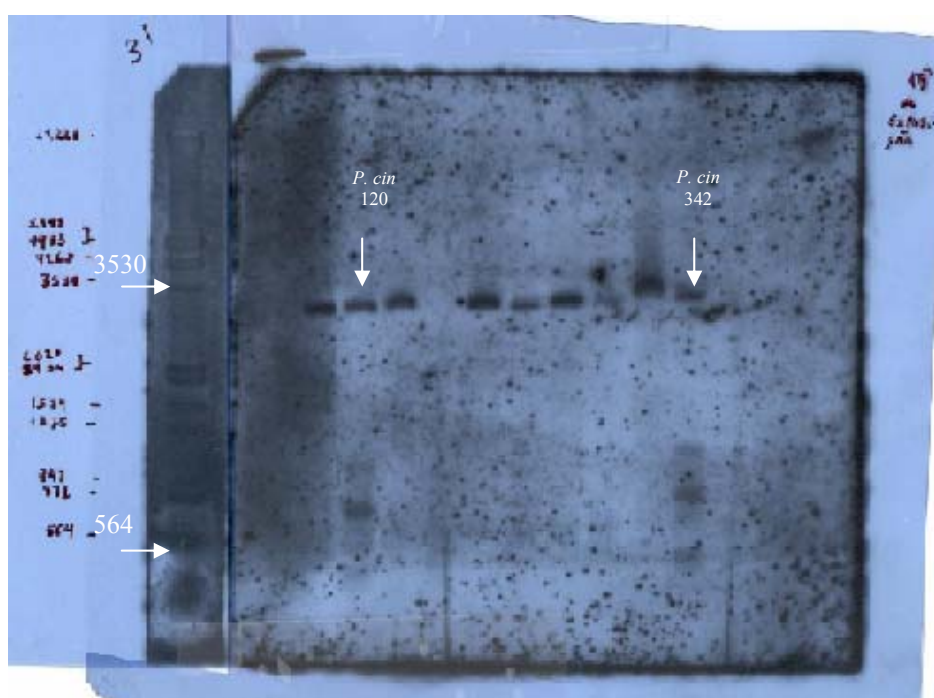


Figura 30 – “Southern-blot” de DNA genómico digerido com *Rsa* I de diferentes espécies de *Phytophthora*, *Rhodoturula mucilaginosa* e *Castanea sativa*, com a sonda molecular OP120 marcada com digoxigenina. Coluna 1 – Marcador molecular; Coluna 2 – *P. cambivora* (102); Coluna 3 – *P. cinnamomi* (120); Coluna 4 – *P. cactorum*; Coluna 5 – *P. quercina*; Coluna 6 – *P. nicotiana*; Coluna 7 – *P. citricola*; Coluna 8 – *P. capsici*; Coluna 9 – *P. cryptogea*; Coluna 10 – *P. syringae*; Coluna 11 – *P. cinnamomi* (342); Coluna 12 – *R. mucilaginosa*; Coluna 13 – *Castanea sativa*.

Na espécie *P. cinnamomi* (120, 342) detectaram-se ainda sinais de hibridação na região dos 550 pb e na região dos 900 pb.

Em *R. mucilaginosa* e *C. sativa* não se detectou nenhum sinal de hibridação.

4.7. Desenho de Primers Específicos para a Detecção e Identificação de *P. cinnamomi*

Na sequência dos nucleótidos da sonda molecular OP120 desenharam-se três primers com 23 pb (Cin1, Cin2 e Cin3) tendo em consideração os princípios referidos em 3.10.. O primer designado Cin1 foi desenhado na extremidade 3', o primer Cin3 na extremidade 5' e o primer Cin2 foi desenhado no interior da sequência de nucleótidos com maior proximidade da extremidade 5', como foi assinalado na Figura 29.

A sequência de nucleótidos, temperatura de emparelhamento (T_m) e percentagem de nucleótidos (G+C) em cada um dos primer é a que se indica no Quadro 20.

Quadro 20 – Primer Cin1, Cin2 e Cin3 – sequência dos nucleótidos, temperatura de emparelhamento e percentagem G+C

Primer	Sequência de nucleótidos	Temperatura de emparelhamento (T_m)	G+C %
Cin1	5'TCG AAT GGA GTA CAT ATG CGT AT 3'	57.1	39.1
Cin2	5'GTT CAG ATT AGA GTT TGT GGA GT 3'	57.1	39.1
Cin3	5'CTA GAT AAT CTT AAA TAA TCT GG 3'	51.7	26.1

Os primers foram sintetizados na empresa de biotecnologia MWG – Biotech da Alemanha e posteriormente utilizados em todas as reacções de amplificação para determinar a selectividade, sensibilidade e reprodutibilidade do método baseado na técnica PCR para a detecção e identificação de *P. cinnamomi* em cultura pura tecidos vegetais e água do solo.

4.8. PCR-Diagnóstico de *P. cinnamomi* Baseada nos Primers Específicos “Cin2/Cin1” e Cin3/Cin1”

4.8.1. Condições Químicas e Físicas da PCR-Diagnóstico (Culturas Puras de *Phytophthora*)

As condições químicas e físicas da reacção PCR foram empiricamente determinadas alterando-se apenas um parâmetro da reacção em cada experiência. Com esta metodologia e utilizando DNA dos isolados de *P.cinnamomi* 341, 822 e 80 e o par de primers Cin2/ Cin 1 e Cin3/ Cin1 testou-se a concentração em MgCl₂, dNTPs e dos primers assim como o ciclo de temperaturas mais adequadas para amplificação com os primers em estudo.

As condições químicas com que se obtiveram resultados consistentes foram iguais, nos dois pares de primers e nas concentrações que a seguir se indicam: 100 mM de cada dNTPs, 2 mM de MgCl₂, buffer da enzima (buffer B) na concentração final de 1 x, BSA na concentração final de 0,1 mg mL⁻¹, 0,5 µM de cada primer e uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Promega).

As condições físicas que possibilitaram amplificação foram diferentes nos dois pares de primers. O ciclo de amplificação com o par de primers Cin2/Cin1 iniciou-se com um período de desnaturação do DNA a 94 °C durante 60 segundos a que se seguiram 35 ciclos de 94 °C – 30 segundos; 50 °C – 60 segundos; 72 °C – 30 segundos, finalizando a reacção com um período de extensão final de 5 minutos a 72 °C.

Com o par de primers Cin3/Cin1 foi necessário modificar a temperatura de emparelhamento o período de extensão assim como o número de ciclos da reacção de amplificação. O ciclo de amplificação ficou assim determinado: 94 °C durante 60 segundos a que se seguiram 39 ciclos de 94 °C – 30 segundos; 48 °C – 40 segundos; 72 °C – 60 segundos, finalizando a reacção com um período de extensão final de 5 minutos a 72 °C.

Depois de determinadas as condições de amplificação testou-se a necessidade da presença dos dois primers para que ocorra a reacção de amplificação (Figura 31 e 32). O controlo negativo da reacção foi testado em reacções onde se substituiu o DNA por igual quantidade de água ultra pura esterilizada.

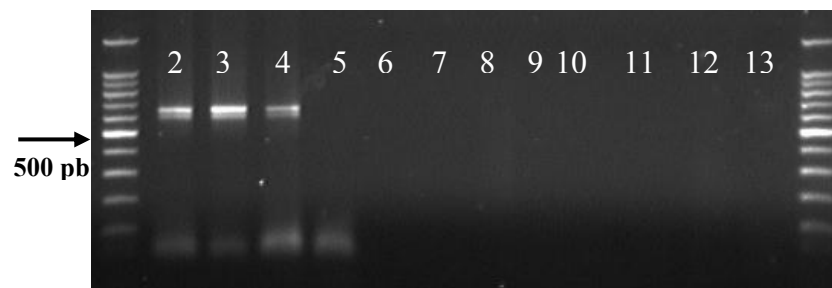


Figura 31 – Amplificação PCR com os primers Cin2/Cin1 em DNA extraído de micélio de *P. cinnamomi* (341, 822, 80, controlo negativo). Coluna (1 e 14) – Marcador molecular (100 bp Ladder, Promega); Coluna (2-5) – Reacção PCR com os primers Cin2/Cin1 (341, 822, 80, controlo negativo); Coluna (6-9) – Reacção PCR apenas com o primer Cin1 (341, 822, 80, controlo negativo); Coluna (10-13) – Reacção PCR apenas com o primer Cin2 (341, 822, 80, controlo negativo).

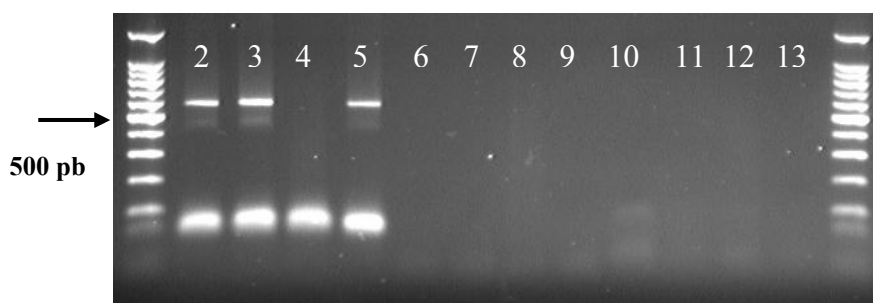


Figura 32 – Amplificação PCR com os primers Cin3/Cin1 em isolados puros de *P. cinnamomi* (341, 822, controlo negativo, 80). Coluna (1 e 14) – Marcador molecular (100 bp Ladder, Promega); Coluna (2-5) – Reacção PCR com os primers Cin3/Cin1 (341, 822, controlo negativo, 80); Coluna (6-9) – Reacção PCR apenas com o primer Cin1 (341, 822, controlo negativo, 80); Coluna (10-13) – Reacção PCR apenas com o primer Cin3 (341, 822, controlo negativo, 80).

4.8.2. Especificidade e Sensibilidade da PCR-Diagnóstico

4.8.2.1. Especificidade da Reacção de Amplificação com os Primers Cin2/Cin1 e Cin3/Cin1

Com os primers Cin2/Cin1 e Cin3/Cin1 e nas condições referidas em 4.8.1. testaram-se as diferentes espécies de *Phytophthora* incluídas neste estudo. Obtiveram-se fragmentos de amplificação PCR com a dimensão esperada apenas em *P. cinnamomi* como pode ser constatado na Figura 33 e 34.

O par de primers Cin2/Cin1 originou em *P. quercina* um produto de amplificação com aproximadamente 800 pb.

Não se obtiveram fragmentos de amplificação PCR com os primers Cin2/Cin1 e Cin3/Cin1 em *Pythium* sp. e *C. parasitica* conforme evidenciado nas figuras anteriormente referidas e também não se obteve qualquer produto de amplificação quando se utilizou DNA de *Castanea sativa*.

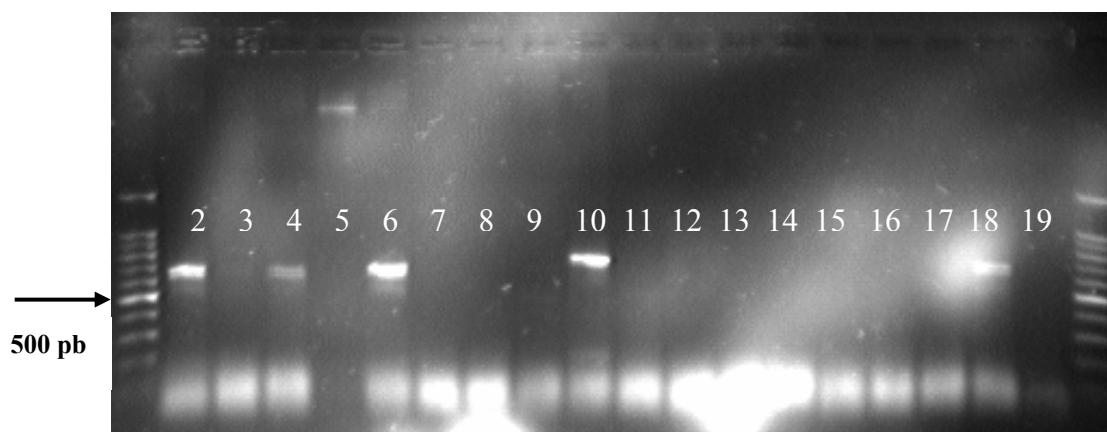


Figura 33 – Especificidade do primer Cin2/Cin1 na detecção de *P. cinnamomi*. Coluna (1 e 20) – Marcador molecular (100 bp Ladder, Promega); Coluna (2-6) – diferentes isolados de *P. cinnamomi* (819, 822, 120, 341, 342); Coluna (7-15) – diferentes espécies de *Phytophthora* (*P. cambivora*, (248, 102), *P. cryptogea*, *P. quercina*, *P. nicotiana*, *P. citricola*, *P. capsici*, *P. syringae*, *P. cactorum*); Coluna 16 – *Pythium* sp.; Coluna 17 – *C. parasitica*; Coluna 18 – *P. cinnamomi* (2965), Coluna 19 – controlo negativo.

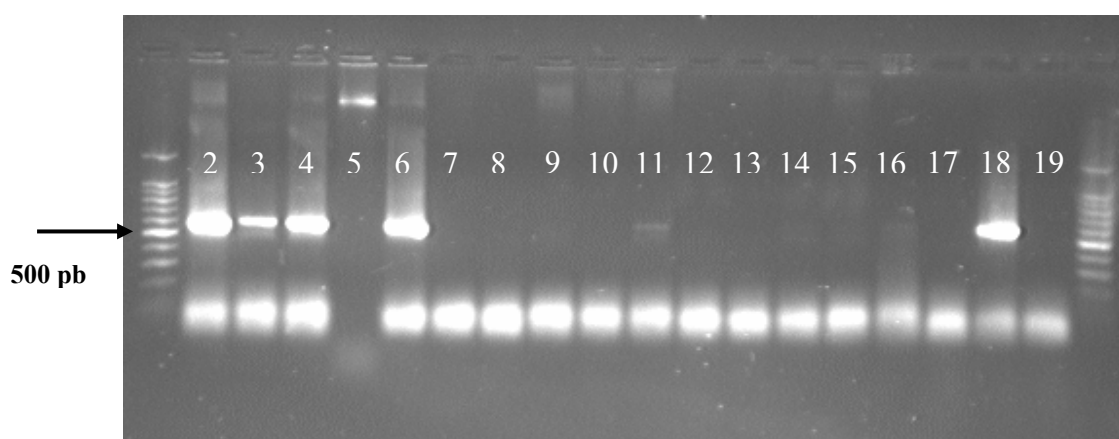


Figura 34 – Especificidade do primer Cin3/Cin1 na detecção de *P. cinnamomi*. Coluna (1 e 20) – Marcador molecular (100 bp Ladder, Promega); Coluna (2-6) – diferentes isolados de *P. cinnamomi* (819, 822, 120, 341, 342); Coluna (7-15) – diferentes espécies de *Phytophthora*: *P. cambivora* (248, 102), *P. cryptogea*, *P. quercina*, *P. nicotiana*, *P. citricola*, *P. capsici*, *P. syringae*, *P. cactorum*; Coluna 16 – *Pythium* sp.; Coluna 17 – *C. parasitica*; Coluna 18 – *P. cinnamomi* (2965); Coluna 19 – controlo negativo.

A especificidade e reprodutibilidade da detecção de *P. cinnamomi* por PCR foi avaliada em 18 isolados de *P. cinnamomi*, obtidos em castanheiro, com os dois pares de primers Cin2/Cin1 e Cin3/Cin1 (Figura 35 e 36).

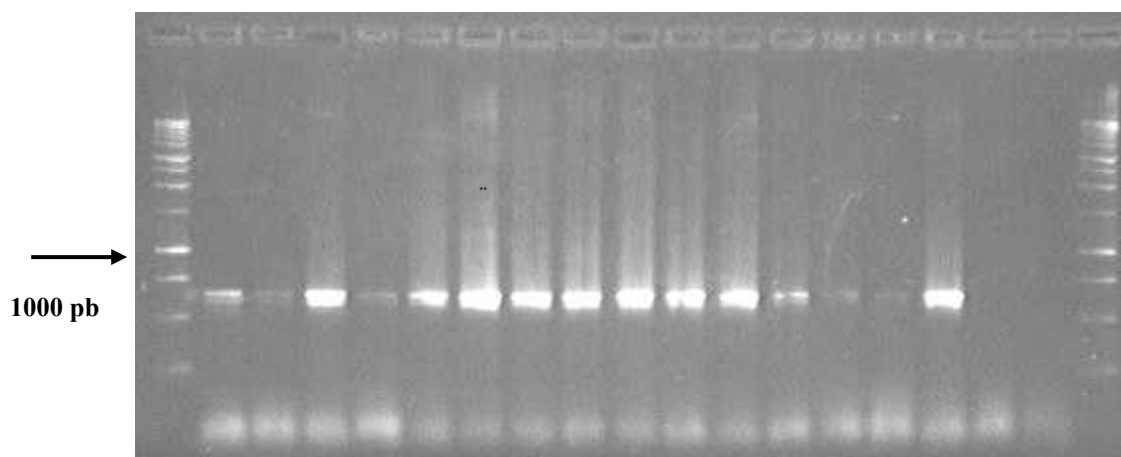


Figura 35 – Amplificação PCR do fragmento de 663 pb nos 18 isolados de *P. cinnamomi* obtidos de castanheiro com a utilização dos primers específicos Cin2/Cin1. Coluna 1 – Marcador molecular (1Kb, Promega); Coluna (2-16) – *P. cinnamomi* (80, 811, 812, 813, 814, 816, 817, 818, 819, 820, 822, 831, 120, 130); Coluna 17 – *P. cambivora* (135); Coluna 18 – controlo negativo; Coluna 19 – Marcador molecular (1Kb, Promega).

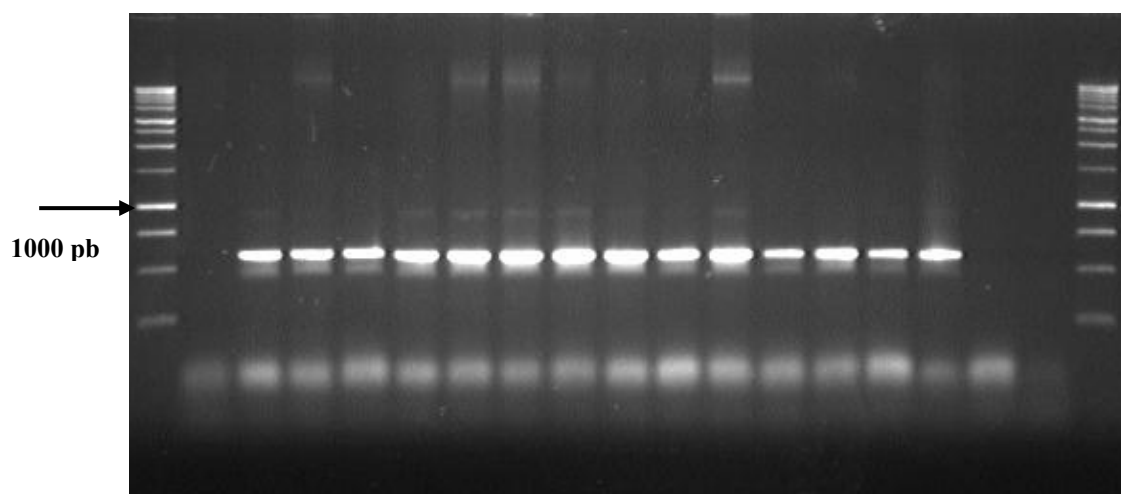


Figura 36 – Amplificação PCR do fragmento de 663 pb nos 18 isolados de *P. cinnamomi* obtidos de castanheiro com a utilização dos primers específicos Cin3/Cin1. Coluna 1 e 19 – Marcador molecular (1Kb, Promega); Coluna (2-16) *P. cinnamomi* (80, 811, 812, 813, 814, 816, 817, 818, 819, 820, 822, 831, 120, 130); Coluna 17 – *P. cambivora* (135); Coluna 18 – controlo negativo.

Com o par de primers Cin2/Cin1 (Figura 35) obtiveram-se amplificações em todos os isolados de *P. cinnamomi* apresentando alguns deles uma intensidade mais reduzida que não foi constante nas diferentes repetições.

Com os primers Cin3/Cin1 (Figura 36) obtiveram-se produtos de amplificação em todos os isolados de *P. cinnamomi*. Na figura anteriormente apresentada *P. cinnamomi* (80) não evidenciou produtos de amplificação. No entanto, neste isolado obteve-se o fragmento com a dimensão esperada em muitas outras reacções de amplificação uma vez que foi um dos isolados utilizados nas PCR teste para determinar as condições químicas e físicas de amplificação.

4.8.2.2. Sensibilidade da Reacção PCR-Diagnóstico

A sensibilidade da reacção PCR foi testada em soluções de DNA de concentração conhecida do isolado de *P. cinnamomi* (120). O DNA foi quantificado por comparação visual com um marcador molecular de quantidade conhecida em geis de agarose e por determinação da absorvância a 260 nm. A quantificação do DNA determinou pelo método visual 70 a 75 ng μL^{-1} valores que foram confirmados com os resultados obtidos no espectrofotómetro.

O DNA foi diluído em água na proporção de: 1:2; 1:5; 1:10; 1:20; 1:30; 1: 50, 1:100; 1:150; 1:200; 1:250; 1:300; 1:400; 1:500; 1:650; 1:850; 1:1000 e utilizou-se 1 μL de cada uma das diluições em reacções de PCR nas condições químicas e físicas de amplificação com o par de primers Cin2/Cin1.

A reacção de amplificação ocorreu até à diluição 1:100 o que determina como limite de detecção 0,70-0,75 ng de DNA.

A intensidade do fragmento amplificado é muito acentuada na diluição de DNA na proporção 1:2, mantendo-se praticamente com a mesma intensidade nas diluições subsequentes até à diluição 1:50. Na diluição 1:100 a intensidade do fragmento amplificado diminui acentuadamente, não ocorrendo sinal de amplificação visível na diluição 1:150 (Figura 37).

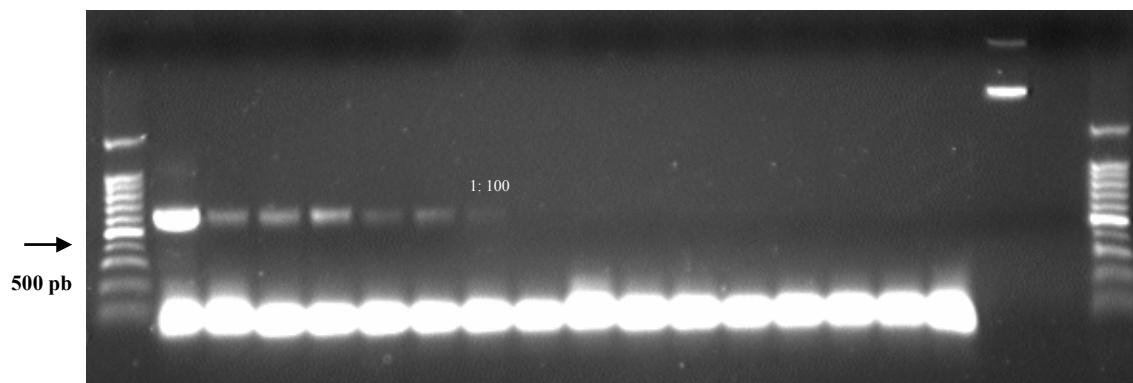


Figura 37 – Sensibilidade da reacção PCR com a utilização de diluições crescentes de DNA (DNA do isolado 120 previamente quantificado). Coluna 1 – Marcador molecular (100 bp Ladder, Promega) seguido sequencialmente das seguintes diluições de DNA: 1:2; 1:5; 1:10; 1:20; 1:30; 1:50; 1:100; 1:150; 1:200; 1:250; 1:300; 1:400; 1:500; 1:650; 1:850; 1:1000, marcador de 125 ng, controlo negativo.

4.9. PCR-Diagnóstico em Plantas com Sintomas da Doença da Tinta, Tecidos Armadilha e Água do Solo (zoósporos)

4.9.1. DNA Molde

4.9.1.1. DNA de Tecidos da Raiz de Castanheiro

Das 12 plantas de castanheiro com sintomas da doença da tinta na parte aérea (5.1, 5.2, 5.3, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 7.1, 7.2 7.3) extraiu-se o DNA dos tecidos radiculares (um grama de tecidos radiculares por planta) pela utilização do DNeasy Plant Mini kit (Qiagen). Com este método obtiveram-se soluções de DNA com intensa cor castanha, tendo-se optado por fazer purificação do DNA pelo método Wizard® Plus Minipreps (Promega) antes de se testarem as condições químicas e físicas de amplificação PCR. Ensaio preliminares de extracção de DNA de tecidos do caule inoculados com *P. cinnamomi* tinham evidenciado a necessidade deste procedimento para obtenção de resultados positivos de amplificação PCR.

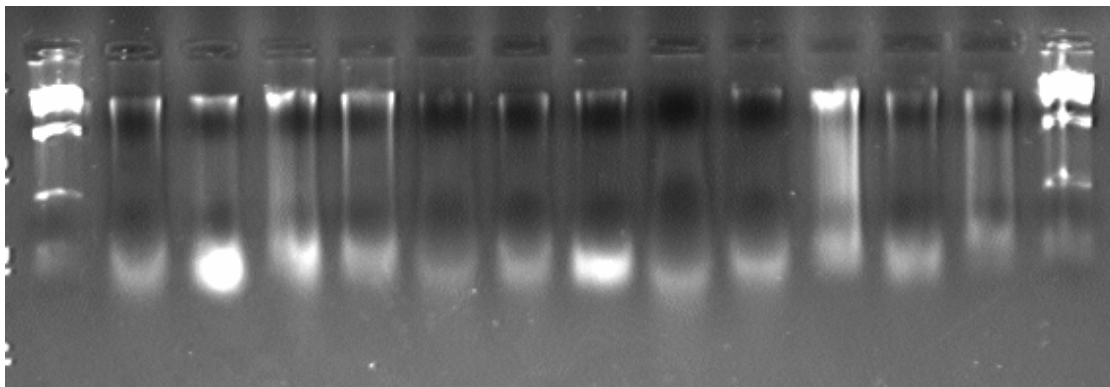


Figura 38 –DNA extraído de raízes de castanheiro (*Castanea sativa*) que cresceram em substrato de terra vegetal inoculado com 0.5 % (v/v) de *P. cinnamomi* (*P. cinnamomi* 80 - IMI-335492) Coluna 1 e 14 – Marcador molecular (*Lambda/Hind III*, Promega) seguido sequencialmente do DNA das plantas de castanheiro: 5.1, 5.2, 5.3, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 7.1, 7.2, 7.3.

4.9.1.2. DNA de Tecidos armadilha

A extracção do DNA dos tecidos armadilha foi realizado por maceração dos tecidos vegetais em NaOH (0,5 M) conforme descrito em 3.11.2.2. e diluição em água para diminuir a quantidade de produtos inibidores da reacção PCR.

O DNA extraído por este método foi usado directamente na reacções (1 µL por reacção PCR) sem que se tenha quantificado e visualizado a sua qualidade.

4.9.1.3. DNA da Água do Solo (zoósporos)

O método de extracção do DNA dos zoósporos baseou-se no aumento da temperatura da suspensão onde se encontram os zoósporos. Os zoósporos quando expulsos dos esporângios e durante algum tempo não possuem parede celular o que os torna mais sensíveis à elevação da temperatura.

A extracção do DNA a partir da água com zoósporos foi realizada às 24, 48, 72 e 96 horas do ensaio conforme o descrito em 3.11.2.3., tendo-se utilizado 1 µL por reacção PCR.

4.9.2. PCR-Diagnóstico em Plantas com Sintomas da Doença da Tinta

Como referência positiva da presença de *P. cinnamomi* nas raízes do castanheiro utilizou-se o método de isolamento em meio selectivo P₁₀VPH de Taso & Guy (1997).

Nos tecidos radiculares de cada uma das plantas fez-se o isolamento de *P. cinnamomi* tendo-se confirmado a presença de *P. cinnamomi* em oito das doze plantas em análise (Quadro 21).

A detecção de *P. cinnamomi* baseada na PCR com a utilização dos primers específicos Cin3/Cin1 foi concretizada nas condições físicas e químicas da reacção PCR obtidas nas culturas puras de isolados de *Phytophthora* anteriormente apresentadas. Realizaram-se reacções de amplificação PCR com a utilização de DNA extraído de tecidos radiculares de castanheiros jovens que cresceram em substrato inoculado com *P. cinnamomi* (80 – IMI335 492).

Quadro 21 – Detecção de *P. cinnamomi* nas raízes das plantas de castanheiro que cresceram em substrato inoculado com 0.5 % (v/v) de *P. cinnamomi* (80 - IMI 335 492) em Meio P₁₀VPH

Planta	Isolamento	Planta	Isolamento	Planta	Isolamento
	<i>P. cinnamomi</i>		<i>P. cinnamomi</i>		<i>P. cinnamomi</i>
5.1	Positivo	6.1	Positivo	7.1	Positivo
5.2	Negativo	6.2	Positivo	7.2	Positivo
5.3	Negativo	6.3	Positivo	7.3	Negativo
		6.4	Negativo		
		6.5	Positivo		
		6.6	Positivo		

Os resultados da amplificação PCR utilizando 1 µL de DNA por reacção estão indicados na Figura 39. A reacção PCR amplificou um fragmento da dimensão esperada em todas as plantas onde se detectou em meio selectivo a presença de *P. cinnamomi*. Exceptua-se a esta situação a planta 7.2 onde nem sempre ocorreu reacção de amplificação e tinha sido detectada pelos métodos clássicos a presença do parasita.

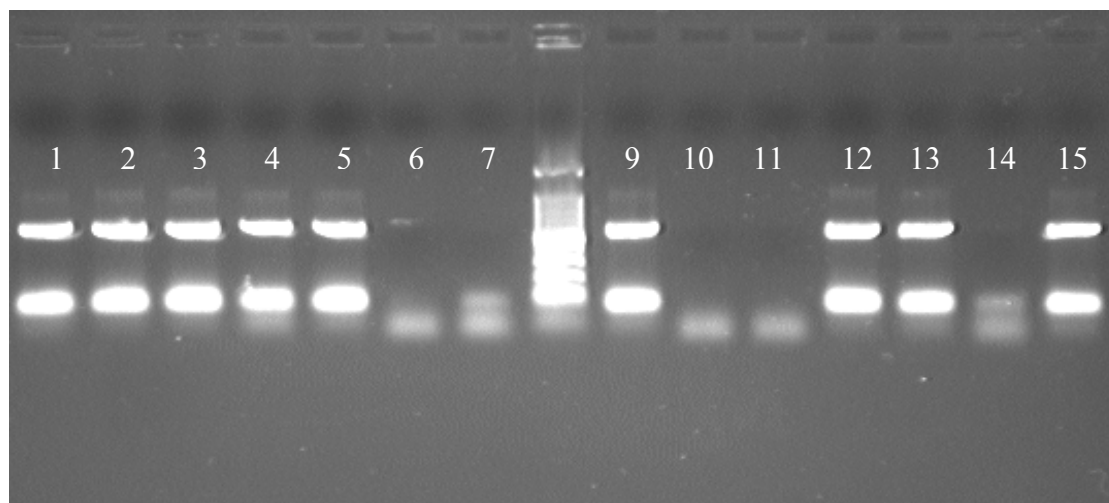


Figura 39 – Detecção de *P. cinnamomi* por PCR com os primers específicos Cin3/Cin1 em raízes de castanheiros jovens que cresceram em terra vegetal inoculada com *P. cinnamomi*. Coluna (1-6) – Planta 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6 respectivamente; Coluna 7 – Controlo negativo; Coluna 8 – marcador molecular (100 bp Ladder, Promega); Coluna (9-14) – Planta 5.1, 5.2, 5.3, 7.1, 7.2, 7.3 respectivamente; Coluna 15 – controlo positivo (*P. cinnamomi*, 120).

Na planta 6.4 onde os métodos clássicos, com a utilização do meio selectivo P₁₀VPH, não detectaram *P. cinnamomi* ocorreu no entanto reacção de amplificação PCR com amplificação de um fragmento de dimensão semelhante à das outras plantas em estudo.

Repetições da reacção PCR confirmam os resultados obtidos. No entanto, na planta 7.2 verificou-se alguma instabilidade nos resultados originado por vezes amplificações e outras vezes não.

4.9.3. PCR-Diagnóstico em Tecidos Armadilha e Água do Solo (zoósporos)

A detecção de *P. cinnamomi* nos “tecidos armadilha” nas quatro repetições foi positiva às 24 horas de manutenção do ensaio em meio selectivo P₁₀VPH.

A água da diluição do solo não foi testada pelos métodos clássicos uma vez que os zoósporos só têm capacidade de germinar depois de enquistados e por não existir uma metodologia de detecção que pudesse constituir um padrão de referência.

A PCR diagnóstico com os primers específicos Cin3 /Cin1 às 24 e 48 horas com os tecidos armadilha e na água onde estarão os zoósporos estão representadas na

Figura 40 e os resultados obtidos às 72 e 96 horas na Figura 41 e Figura 42, respectivamente.

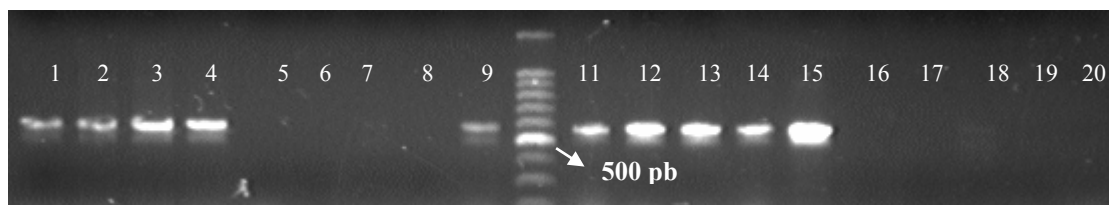


Figura 40 – PCR diagnóstico de *P. cinnamomi* em “tecidos armadilha” e água do solo com os primers específicos Cin3/Cin1 às 24 e 48 horas (uma reacção por repetição). Coluna (1-4): “tecido armadilha” às 24 horas; Coluna 5 – controlo negativo; Coluna (6-9) – água do solo às 24 horas; Coluna 10 – marcador molecular (100 bp Ladder, Promega); Coluna (11-14) – “tecido armadilha” às 48 horas; Coluna 15 – controlo positivo (*P. cinnamomi*, 80); Coluna (16-19) – água do solo às 48 horas; Coluna 20 – DNA de castanheiro.

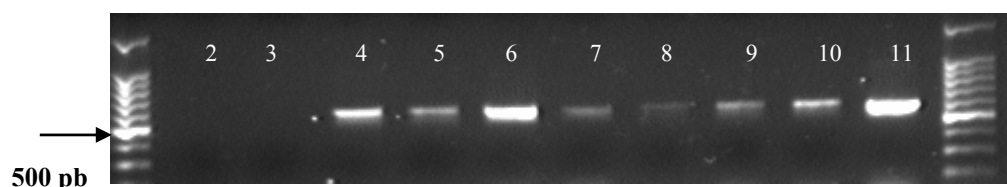


Figura 41 – PCR diagnóstico de *P. cinnamomi* em “tecidos armadilha” e água do solo com os primers específicos Cin3/Cin1 às 72 horas (uma reacção por repetição). Coluna (1 e 12): Marcador molecular (100 bp Ladder, Promega); Coluna 2 – Controlo negativo; Coluna (3-6) – água do solo às 72 horas; Coluna 7 – Controlo positivo (*P. cinnamomi*, 120); Coluna (8-11) – tecido armadilha às 72 horas.

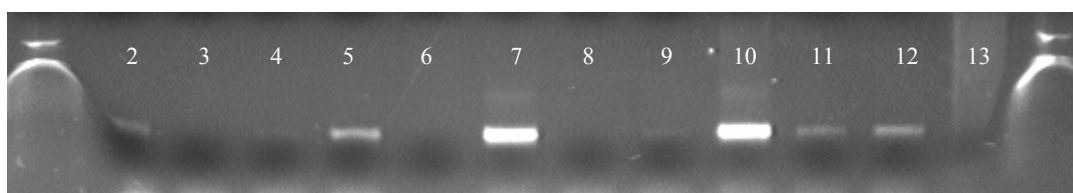


Figura 42 – PCR diagnóstico de *P. cinnamomi* em “tecidos armadilha” e água do solo com os primers específicos Cin3/Cin1 às 96 horas (uma reacção por repetição). Coluna (1 e 14) – Marcador molecular (100 bp Ladder, Promega, com anomalias na separação dos fragmentos); Coluna (2-5) – água do solo às 96 horas; Coluna 6 – controlo negativo; Coluna 7 – controlo positivo (*P. cinnamomi*, 120); Coluna 8 – DNA de castanheiro são; Coluna (9-12) – Tecido armadilha às 96 horas; Coluna 13 – DNA de castanheiro são.

4.10. “Nested” PCR

A técnica molecular designada “Nested”PCR permite aumentar a sensibilidade em muitos sistemas de detecção molecular baseados na PCR desde que a especificidade dos primers seja garantida e se eliminem as condições do aparecimento de falsos positivos muitas vezes associados com a manipulação das amostras.

Cacciola *et al.* (1999) publicaram primers específicos para detecção em “nested” PCR de *P. cinnamomi* e *P. cambivora*. Os primers foram desenhados na região do ITS1 utilizando como primer reverso o DC5 (SRCI) nas duas espécies como foi apresentado na Figura 19.

As condições químicas e físicas indicadas na bibliografia para as duas reacções consecutivas de PCR não originaram fragmentos de amplificação e foi necessário ajustar as condições de reacção.

Obtiveram-se resultados consistentes nas seguintes condições químicas da reacção PCR: 100 mM de cada dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, buffer da enzima (buffer B) na concentração final de 1 x, BSA na concentração final de 0,1 mg mL⁻¹, 0.5 µM de cada primer e uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Promega) e com ciclos de amplificação cujos parâmetros se especificam: 94 °C - 3 minutos seguidos de 35 ciclos de amplificação de 94 °C - 30 segundos, 60 °C - 45 segundos e 72 °C - 60 segundos, a que se seguiu um período de extensão final de cinco minutos a 72 °C. As condições físicas das reacções de amplificação específicas para *P. cinnamomi* e para *P. cambivora* foram as referidas anteriormente com excepção da temperatura de anilhamento dos primers que foi de 61 °C no par de primers DC9/DC5 e de 60 °C no par de primers DC4/DC5.

Com a utilização do primer DC4/DC5, específico para *P. cambivora*, é esperado um fragmento de amplificação de 512 pb, e com o par de primers DC9/DC5 específico de *P. cinnamomi* é esperado um fragmento de 405 pb, como pode ser constatado na Figura 19.

Para testar esta metodologia de detecção utilizou-se DNA obtido de culturas puras de diferentes espécies de *Phytophthora* e DNA extraído de plantas de castanheiro com sintomas da doença da tinta que em experiências anteriores tinham originado fragmentos de amplificação característicos de *P. cinnamomi*. Na reacção de amplificação com os primers específicos utilizou-se como DNA molde 1 µl do produto de amplificação da primeira reacção PCR realizada com os primers DC6/ITS4.

Os resultados da reacção de amplificação com os primers DC4/DC5 específicos para *P. cambivora* e DC9/DC5 específicos para *P. cinnamomi* estão representados na Figura 43 e Figura 44.

Com o par de primers DC4/DC5 obteve-se uma banda de amplificação com a dimensão esperada nos isolados de *P. cambivora* que aparece com igual intensidade e dimensão em todas as espécies de *Phytophthora* incluídas neste estudo. São ainda visíveis fragmentos de amplificação com dimensão diferente da esperada tanto em *P. cambivora* (coluna 12 e 13 da Figura 43) como em todas as outras espécies de *Phytophthora* em estudo.

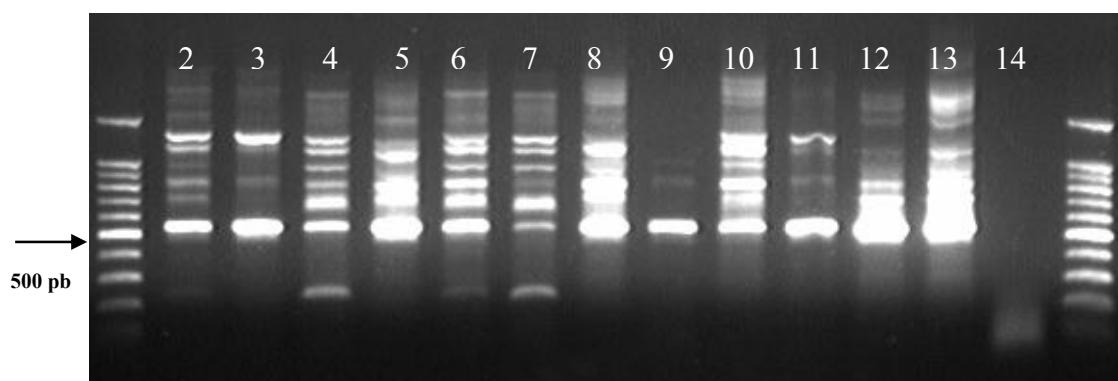


Figura 43 – Fragmentos de amplificação PCR com os primers DC4 (Cacciola *et al.*, 1999) e DC5 (SRCI) específicas de *P. cambivora* em diferentes espécies de *Phytophthora*. Coluna 1 e 15 Marcador molecular (100pb Ladder, Promega); Coluna (2-13) – Espécies de *Phytophthora* (*P. quercina*; *P. nicotianae*; *P. citricola*; *P. capsici*; *P. cryptogea*; *P. syringae*; *P. cinnamomi* var. *parvispora*; *P. cinnamomi* (341, 80); *P. cactorum*; *P. cambivora* (102, 248) respectivamente); Coluna 14 – Controlo negativo.

Com o par de primers DC9/DC5 específico para *P. cinnamomi* testaram-se diferentes espécies de *P. cinnamomi*, *P. cambivora*, *Pythium* sp. e *C. parasitica*. Os resultados obtidos (Figura 44) evidenciam uma vez mais a não especificidade da amplificação PCR uma vez que o produto de amplificação esperado com 405 pb está presente em todos os isolados incluindo o isolado de *Pythium* sp. e *C. parasitica* (coluna 14 e 15 da Figura 44).

O aparecimento de reacções cruzadas com outras espécies de *Phytophthora* e mesmo com outros organismos, nomeadamente *Pythium* e *Armillaria*, foram

igualmente detectados por Schubert *et al.* (1999) quando testaram vários primers específicos para *P. cambivora* desenhados nesta mesma região genómica.

A não especificidade do método “nested” PCR levou estes autores a desenvolver um marcador SCAR seleccionado por RAPD-PCR e o desenho de primers específicos para a detecção de *P. cambivora* (CAMB3 e CAMB4). Estes primers, específicos de *P. cambivora*, serão utilizados em “Multiplex” PCR com os primers Cin3/Cin1 (deste trabalho) específicos de *P. cinnamomi*, para a detecção em simultâneo das duas espécies de *Phytophthora* associadas com a doença da tinta do castanheiro numa única reacção de amplificação.

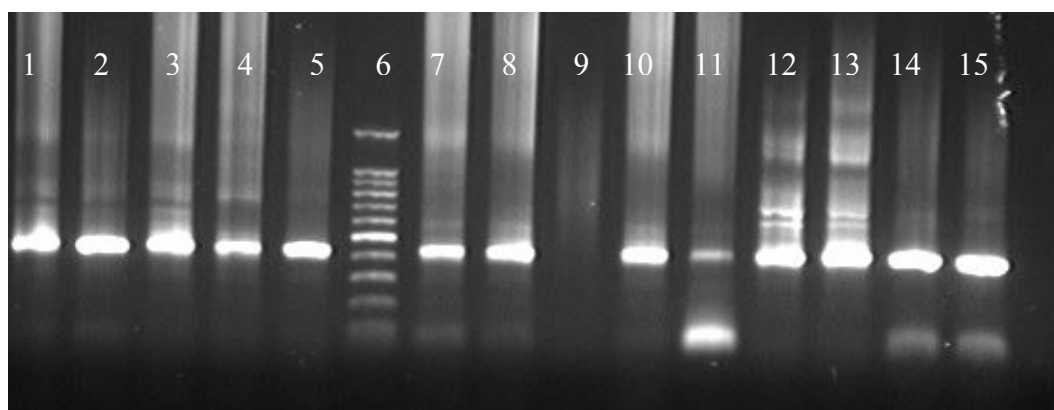


Figura 44 – Fragmentos de amplificação PCR com os primers DC9 (Cacciola *et al.*, 1999) e DC5 (SRCI) em diferentes isolados de *P. cinnamomi*, *P. cambivora*, *Pythium sp* e *C. parasitica*. Coluna (1-4) – Isolados de *P. cinnamomi* (342, 80, 120, 822); Coluna 5 – *P. cambivora* (102); Coluna 6 – Marcador molecular (100 pb Ladder, Promega); Coluna 7 – *P. cambivora* (101); Coluna 8 – *P. cambivora* (102); Coluna 9 – controlo negativo; Coluna (10-13) – isolados de *Phytophthora* spp. (104, 103, 111, 11B); Coluna 14 – *Pythium* sp.; Coluna 15 – *C. parasitica*.

4.11. “Multiplex” PCR

A possibilidade de detecção das duas espécies de *Phytophthora*, *P. cinnamomi* e *P. cambivora*, associadas com a doença da tinta do castanheiro, em simultâneo e numa única reacção PCR pode ser concretizada com a técnica “multiplex” PCR que permite a amplificação de diversos *locus* em simultâneo.

Para determinar as condições de uma reacção “multiplex” PCR é necessário conhecer as condições de amplificação de cada par de primers e testar as condições de amplificação conjunta com uma quantidade “equimolar” de todos os primers.

As condições químicas e físicas da reacção que proporcionaram fragmentos de amplificação com o primer CAMB3/CAMB4 são as que a seguir se explicitam.

Num volume final de 25 µl utilizaram-se 100 µM de cada dNTPs, 2.5 mM de MgCl₂, buffer da enzima (buffer B) na concentração final de 1 × , BSA na concentração final de 0,1 mg mL⁻¹, 0,5 µM de cada primer e uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Promega), tendo-se utilizado água ultra pura e esterilizada para perfazer o volume final da reacção.

As condições térmicas de amplificação constam de um ciclo de desnaturação inicial de 94 °C – 180 segundos, seguido de 35 ciclos de amplificação de 94 °C – 30 segundos, 55 °C – 60 segundos, 72 °C – 120 segundos, tendo a reacção terminado com um período de extensão final de 300 segundos a 72 °C.

Nestas condições de amplificação obteve-se o fragmento de amplificação esperado, 1100 pb, em todos os isolados identificados como *P. cambivora*.

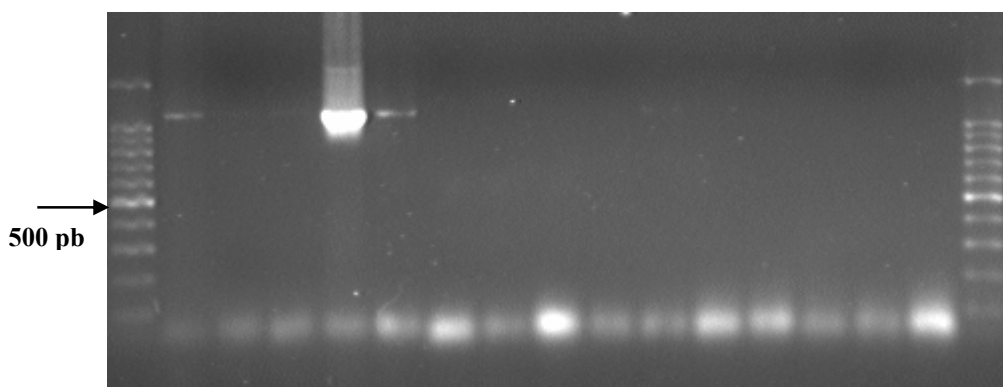


Figura 45 – Fragmento de amplificação PCR com o par de primers CAM3/ CAMB4 (Schubert *et al.*, 1999) específico para detecção de *P. cambivora* em diferentes espécies de *Phytophthora*. Coluna 1 e 17 – Marcador molecular (100 pb Ladder, Promega); Coluna (2-12) – diferentes espécies de *Phytophthora* (*P. cambivora* (101); *P. cinnamomi* (120, 342); *P. cambivora* (248, 102); *P. cryptogea*; *P. quercina*; *P. nicotianae*; *P. citricola*; *P. capsici*; *P. syringae*; *P. cactorum*); Coluna 13 – *Pythium* sp.; Coluna 14 – *C. parasitica*; Coluna 15 – controlo negativo.

Para a amplificação conjunta com os dois pares e primers (CAMB3/CAMB4 e Cin3/Cin1) foi necessário ajustar as condições químicas da reacção. Obtiveram-se resultados positivos quando se aumentou a concentração dos dNTPs para 200 µM e a concentração do MgCl₂ para 2.5 mM e para 1 µM a concentração de cada primer. As

condições físicas de amplificação que proporcionaram produtos de amplificação foram as utilizadas na reacção PCR com o primer CAMB3/CAMB4.

A amplificação “multiplex” (Figura 46), utilizando 1 µl de DNA extraído de culturas puras de *P. cinnamomi* e *P. cambivora*, assim como mistura de DNA das duas espécies deu origem aos produtos de amplificação esperados, ou seja, 1100 pb em *P. cambivora* (102, 248) e de aproximadamente 700 pb e *P. cinnamomi* (341). Com o isolado 120 de *P. cinnamomi* não se obteve nenhum produto de amplificação que se associou a um provável erro de manipulação das amostras.

Quando se utilizou como DNA molde a mistura de DNA de *P. cambivora* e *P. cinnamomi* são evidentes os dois fragmentos de amplificação com 1100 pb característico de *P. cambivora* e de 700 pb em *P. cinnamomi*. Uma vez mais na mistura do DNA que incluía o isolado 120 não se obteve o fragmento de amplificação característico de *P. cinnamomi*.

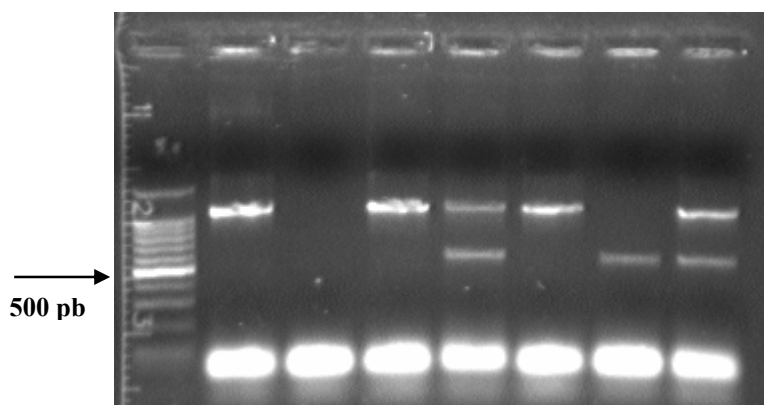


Figura 46 – “Multiplex” PCR com os primers CAMB3/CAMB4 e Cin3/Cin1 para detecção em simultâneo de *P. cambivora* (fragmento de amplificação de 1100 pb) e *P. cinnamomi* (fragmento de amplificação de 663 pb). Coluna 1 – Marcador molecular (100 pb Ladder, Promega); Coluna 2 – *P. cambivora* (102); Coluna 3 – *P. cinnamomi* (120); Coluna 4 – *P. cambivora* (248) e *P. cinnamomi* (120); Coluna 5 – *P. cambivora* (102) e *P. cinnamomi* (341); Coluna 6 – *P. cambivora* (248); Coluna 7 – *P. cinnamomi* (341); Coluna 8 – *P. cambivora* (248) e *P. cinnamomi* (341).

A selectividade da amplificação “multiplex” PCR foi igualmente testada em todas as espécies de *Phytophthora* incluídas neste estudo. Obtiveram-se fragmentos de amplificação característicos de *P. cinnamomi* apenas nos isolados desta espécie, embora com reduzida intensidade em alguns deles. O fragmento de amplificação

característico de *P. cambivora* apareceu com acentuada intensidade nos isolados desta espécie (Figura 47).

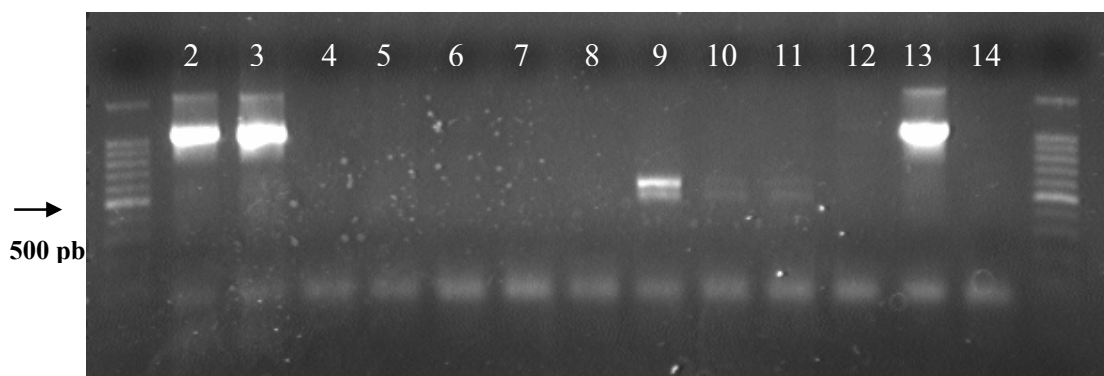


Figura 47 – “Multiplex” PCR com os primers CAMB3/CAMB4 e Cin3/Cin1 em diferentes espécies de *Phytophthora*. Coluna 1 e 15 – Marcador molecular (100 pb Ladder, Promega); Coluna (2-13) – diferentes isolados de *Phytophthora* (*P. cambivora* (248, 101), *P. quercina*, *P. nicotiana*, *P. citricola*, *P. cryptogea*, *P. syringae*, *P. cinnamomi* (341, 342, 2965), *P. cinnamomi* var. *parvispora*, *P. cambivora* 102, respectivamente); Coluna 14 – controlo negativo.

A intensidade dos fragmentos amplificados é nitidamente diferente nas duas espécies com uma intensidade reduzida em *P. cinnamomi*. Estes resultados eram de certa forma esperados dado que as condições de amplificação são mais próximas das condições ótimas de amplificação com o par de primers CAMB3/CAMB4 tendo inclusivamente o mesmo perfil térmico de amplificação.

5. DISCUSSÃO

O isolamento em cultura pura e a identificação das espécies do género *Phytophthora* que se desenvolvem no ambiente solo e atacam as raízes das plantas, actividades iniciais em qualquer processo de diagnóstico, é unanimemente considerado por fitopatologistas e micologistas como particularmente difícil.

Os métodos de microbiologia clássica quando aplicados no isolamento das espécies de *Phytophthora* que atacam as raízes apresentam uma série de dificuldades de natureza prática que apenas manipulações biológicas muito específicas permitem ultrapassar. Métodos tradicionais e de rotina laboratorial, como colocar os tecidos com sintomas em água ou soluções salinas, ou ainda, a utilização das vulgares técnicas de isolamento em meio de cultura, permitem a detecção de *Phytophthora* que atacam as raízes, em tecidos recentemente infectados e com micélio em activo crescimento. No entanto, o isolamento de *Phytophthora* de tecidos em avançado estado de infecção, degradados ou secos, situações vulgares neste tipo de doença, ou de solos naturalmente infectados, é com estas técnicas extremamente difícil (Eckert & Tsao, 1962; Fernandes, 1966; Tsao & Ocana, 1969; Zentmyer, 1980) ou mesmo impossível (Tsao, 1987; Tsao, 1990). Este aspecto é salientado na bibliografia mais recente pela maioria dos autores e justifica o desenvolvimento de métodos moleculares de detecção em *Phytophthora* que atacam as raízes (Liew *et al.*, 1998; Winton & Hansen, 2001; Ippolito *et al.*, 2002).

Os métodos de microbiologia clássica utilizados na detecção e isolamento das espécies do género *Phytophthora* que atacam as raízes baseiam-se nos meios de cultura selectivos e nas técnicas “armadilha”.

Os métodos de detecção e isolamento baseados nos meios selectivos são utilizados no isolamento de *Phytophthora* desde o início do seu desenvolvimento, a década de 60. Este facto está directamente associado às dificuldades de obtenção destes parasitas em cultura axénica pelos métodos de rotina laboratorial, devido à interferência dos microrganismos da micoflora secundária dos tecidos infectados e do solo. Estes meios contêm além do meio de cultura base, antibióticos e fungicidas em proporções criteriosamente estudadas e testadas, uma vez que *Phytophthora* e outros *Peronosporales* reagem toxicologicamente como procariotas aos antibióticos (Tsao, 1987).

Do conjunto das substâncias inibidoras utilizadas nos meios selectivos para *Phytophthora*, salienta-se o facto dos agentes fungicidas representarem um papel importante na selectividade destes meios. Salientam-se os fungicidas pimaricina, nistanina e benomil pela sua reduzida toxicidade em *Phytophthora* e elevada eficácia na diminuição da micoflora secundária de crescimento mais rápido e o 5-methyl-isoxazol-3-ol, fungicida de síntese com o nome vulgar hymexazol que inibe os fungos de género *Pythium* mas que não é tóxico para *Phytophthora* spp. contribuíram de forma decisiva para a selectividade destes meios.

O meio selectivo que nos tem proporcionado resultados mais consistentes nas mais variadas situações de detecção e isolamento foi o meio P₁₀VPH de Tsao & Guy (1977) e que foi utilizado em todos os isolamentos realizados ao longo deste trabalho.

As técnicas “armadilha”, único método selectivo conhecido até aos anos 60 no isolamento de *Phytophthora*, tiveram uma aplicação limitada depois da utilização em rotina laboratorial dos meios selectivos. Recentemente esta técnica readquiriu um papel importante como técnica selectiva no isolamento e detecção de espécies de *Phytophthora* que atacam as raízes e todo o ciclo ocorre no ambiente solo.

Esta técnica baseia-se na utilização de determinados órgãos de plantas susceptíveis (frutos, sementes, cotilédones, radículas ou folhas) que funcionam como meio privilegiado de desenvolvimento dos propágulos e possibilitam o isolamento selectivo das espécies de *Phytophthora*.

A eficiência destas técnicas depende, da susceptibilidade do material vegetal utilizado como armadilha, do desenvolvimento de lesões características e das condições de incubação que maximizam as hipóteses de formação e libertação de zoósporos – os propágulos de colonização dos tecidos vegetais.

Esta metodologia de detecção de *Phytophthora*, apresenta como principal desvantagem o facto dos tecidos armadilha poderem ser infectados por outros organismos do solo que impedem a esporulação de *Phytophthora*, tornando quase impossível a sua detecção. Apresenta ainda a desvantagem de dependerem das condições ambientais de incubação, como a temperatura, a luz e a humidade que determina que a não detecção do fungo não seja indicativo da ausência de inóculo. Em termos práticos esta situação traduz-se num elevado número de métodos adaptados aos diferentes hospedeiros envolvidos no processo de patogénese, *Phytophthora*/raízes das plantas hospedeiras. Zentmyer (1980), Tsao (1987) e Erwin & Ribeiro (1996) apresentam de forma detalhada e exaustiva excelentes compilações dos métodos de

detecção e isolamento de *Phytophthora* através da utilização de meios selectivos e por técnicas de “tecido-armadilha”.

O método de tecido-armadilha com a utilização de discos de folha de castanheiro, utilizado neste trabalho revelou ser muito eficaz na detecção de espécies de *Phytophthora* associadas com a doença da tinta e poderá mesmo, depois de determinados os parâmetros do teste, ser utilizado como método de detecção e de avaliação semi-quantitativa dos propágulos de *Phytophthora* em solos de viveiro ou em solos destinados a novas plantações de castanheiro.

Nas acções de prospecção de *Phytophthora* nos soutos da região Bragança/Vinhais com sintomas da doença da tinta o método de isolamento utilizado pode ser considerado como um método de armadilha de planta inteira, uma vez que se baseou no isolamento a partir de plantas jovens de castanheiro existentes na área de influência de um castanheiro adulto com sintomas evidentes da doença da tinta. Este método foi muito eficiente na detecção de *Phytophthora* tendo-se obtido isolados de *P. cinnamomi* em todos os locais amostrados permitindo ainda o isolamento de *P. cambivora* em três dos locais em estudo.

Os resultados obtidos quanto às espécie de *Phytophthora* associadas com a doença da tinta estão de acordo com o referido por Fernandes (1966) que refere terem obtido apenas três isolados de *P. cambivora* entre largas dezenas de isolados identificados como *P. cinnamomi*, razão que levou este autor a considerar esta última espécie como a espécie preponderante na doença da tinta em Portugal. Em Itália a espécie associada com a doença da tinta é predominante *P. cambivora* (Vettraino *et al.*, 2001) e na bibliografia mais antiga da especialidade é atribuída a uma ou outra espécie sem que se conheça a espécie envolvida por razões de sinonímia seguida por autores como White em 1937, Day em 1938 e Crandall em 1936 (Crandall, 1950), que consideraram apenas uma espécie – *P. cambivora*.

P. cinnamomi e *P. cambivora* são espécies heterotáticas e necessitam da presença de micélio de compatibilidade sexual oposta (A1, A2) para que ocorra a reprodução sexual. Conhecer o tipo de compatibilidade presente nos isolados de *Phytophthora* patogénicos em castanheiro é um aspecto importante em termos de caracterização da população, permitindo ainda colocar hipóteses para o estudo dos mecanismos associados à variabilidade ou uniformidade genética da população.

Todos os isolados em estudo evidenciaram ser do grupo de compatibilidade A2 e nenhum deles é auto compatível.

O grupo de compatibilidade A2, em *P. cinnamomi*, é o mais frequente e o mais distribuído geograficamente, aparecendo na maioria das situações como único grupo de compatibilidade. Linde *et al.* (1997) referem, citando outros autores, a presença de micélio de compatibilidade sexual A1 na Austrália, Taiwan e África do Sul, regiões que foram associadas a centros de origem desta espécie mas sem que qualquer delas preencha as características aceites para centro de origem de uma espécie. Linde *et al.* (1997) concluíram com base em diferentes parâmetros de genética de populações que a multiplicação sexual não ocorria ou seria muito rara nestas populações. Goodwin (1997) refere como causas associadas a este facto, e que seria necessário continuar a estudar, as relacionadas com a preferência distinta de hospedeiros que limitaria as hipóteses de contacto do micélio, a incompatibilidade genética entre os isolados (com ploidia diferente) ou que a migração do tipo de compatibilidade A1 fosse tão recente que não fossem ainda detectados, por amostragem, os isolados resultantes do cruzamento sexual.

Em termos de classificação e identificação das espécies de *Phytophthora* a morfologia das estruturas de origem sexuada possuem um valor taxonómico reduzido por serem muito semelhante em todas as espécies deste género. O tipo de anterídio (anfigíneo ou paragíneo) é no entanto uma característica primária na definição dos grupos morfológicos na chave de Waterhouse (1963). A morfologia dos oósporos e do oogónio é muito semelhante em todas as espécies de *Phytophthora* como foi anteriormente referido e por essa razão não possibilitam a diferenciação das espécies dentro deste género. Exceptua-se a esta situação a ornamentação das paredes do oogónio em *P. cambivora*, que é considerado como a principal característica diferenciadora em relação à espécie *P. cinnamomi*. Estas ornamentações aparecem também em *P. katsurae* e *P. verrucosa* mas não de forma tão estável e em todos os isolados.

Brasier (1974) refere que em pareamentos intra-específicos de espécies heterotáticas com micélio de compatibilidade adequada, A1 ou A2, resultam estruturas sexuais com características mistas ou híbridas não apropriadas para objectivos taxonómicos. Esta situação parece ter ocorrido nos pareamentos dos isolados de *P. cambivora* com micélio de tipo A2 de *P. cinnamomi*, dos quais resultaram oósporos não característicos de *P. cambivora* e que não permitiriam com base nesta característica morfológica a identificação e diferenciação dos isolados ao nível da espécie.

Em relação à morfologia dos anterídios observamos a existência de anterídios com uma e duas células nos isolados em estudo. Esta característica dos anterídios foi referida pela primeira vez por Ho & Zentmyer (1977) em *P. cinnamomi* que referem igualmente a existência do mesmo tipo de anterídios em *P. cambivora* não estando referenciada em mais nenhuma espécie de *Phytophthora*.

A presença desta característica particular dos anterídios em *P. cinnamomi* e *P. cambivora* e ainda o facto de serem espécies morfologicamente muito próximas levaram Ho *et al.* (1977) a considerar que se trataria apenas de uma espécie, como aliás tinha sido igualmente considerado por outros autores e já anteriormente referidos. Estudos posteriores realizados nestas duas espécies baseados em marcadores moleculares vieram mostrar que tal sinonímia não se justificava uma vez que estas espécies são geneticamente distintas embora possuam características morfológicas semelhantes (Oudemans & Coffey, 1991).

Em relação ao processo sexual em *P. cinnamomi*, Zentmyer (1980) verificou a formação de oósporos por acção do extracto de raízes de abacate em isolados com micélio de tipo de compatibilidade sexual A2 e Brasier (1974) observou a formação de oósporos por estímulo de substâncias voláteis produzidas por diferentes espécies de *Trichoderma*. Desta forma *P. cinnamomi* produz os oósporos sem que seja necessário a presença de micélio de compatibilidade oposta. *Trichoderma* induz o mesmo efeito em *P. cambivora* e de forma mais irregular e errática em *P. arecea*, *P. infestans*, *P. nicotiana*, *P. dreschleri* e *P. cryptogea*.

A formação de oósporos em *P. cinnamomi* e *P. cambivora* sem necessidade da presença de micélio compatível por indução inter-específica, por acção de estímulos químicos e por acção de *Trichoderma* constitui por si só um processo adicional de sobrevivência mas também um mecanismo de variabilidade que será necessário ter em consideração em estudos de variabilidade genética e populacional destas espécies. Irwin *et al.* (1995) considera mesmo que uma das maiores falhas no conhecimento da biologia de *P. cinnamomi* está relacionada com o conhecimento da estrutura genética da população e da importância relativa dos mecanismos de variabilidade genética envolvidos.

A identificação dos isolados de *Phytophthora* pelos métodos clássicos baseia-se em caracteres morfológicos, conseguidos com a aplicação de manipulações laboratoriais muito específicas e pela observação de caracteres morfológicos que muitas vezes se sobrepõem. Exige conhecimentos taxonómicos e experiência para se

concretizar a identificação ao nível da espécie. Estas exigências dificultam e por vezes impossibilitam a sua utilização na identificação dos isolados obtidos em acções de prospecção e mesmo em acções de detecção e diagnóstico.

Os métodos moleculares de identificação baseados na reacção PCR com a utilização de primers universais como o ITS1 e ITS4 de White *et al.* (1990) ou primers baseados nos anteriores mas modificados para aumentar a especificidade em *Pythiales* e *Peronosporales* como o ITS6 e ITS4 de Cooke & Duncan (1997) permitem a amplificação da região genómica ITS1, 5.8S e ITS2. Esta região genómica utilizada em estudos de evolução e filogenia está muito bem caracterizada no género *Phytophthora* e permite por sequenciação directa, pelo polimorfismo de restrição enzimática (ITS-RFLP) ou pelo desenho da primers específicos identificar as espécies de *Phytophthora*.

O método ITS-RFLP ou também designado REA (Restriction Enzymatic Analysis) foi testado pela primeira vez por Cooke & Duncan (1997) em *Phytophthora* como método de identificação dos isolados ao nível da espécie. Esta técnica fácil de implementar em laboratórios de biologia molecular foi desenvolvido no SCRI (Scottish Crop Research Institute) e disponibilizaram, com acesso livre na Web, a base de dados do polimorfismo de restrição enzimática obtida com as enzimas *Alu* I, *Msp* I e *Taq* I que permite identificar os isolados de *Phytophthora* por comparação com o padrão de restrição obtido localmente com estas enzimas.

Este método exige apurada técnica de resolução de bandas de restrição enzimática uma vez que o método se baseia no tamanho das bandas obtidas. Com a enzima *Taq* I, que origina fragmentos de dimensão reduzida, este aspecto é particularmente sensível exigindo géis de elevada concentração de agarose o que dificulta e encarece o método de identificação. No entanto, na maioria das situações o padrão de restrição obtido com as enzimas *Alu* I e *Msp* I permitem a identificação dos isolados.

Com este método foi possível a identificação de *P. cambivora* no conjunto dos isolados em estudo que pelos métodos morfológicos seria difícil de concretizar de forma fiável e só a identificação realizada em institutos internacionais de micologia permitiria confirmar a sua presença.

Os resultados obtidos pelo método ITS-RFLP, ou seja, a introdução dos valores das diferentes dimensões de fragmentos de restrição enzimática no programa da base de dados do CABI Bioscience para identificação das espécies em estudo, quando

aplicados directamente e sem ponderação das características de patogenicidade e da biologia dos organismos em estudo podem conduzir a identificações erróneas mesmo com a utilização de dimensões de bandas correctamente estimadas. Na nossa situação concreta obtivemos com o padrão de restrição dos isolados identificados como *P. cambivora* um grau de similaridade de igual valor em *P. fragariae* var. *fragariae*. Este resultado evidencia uma das dificuldades deste método de identificação directamente associada à natureza dos organismos em estudo uma vez que esta região genómica é muito semelhante nestas duas espécies. De referir que Cooke *et al.* (2000) concluem, no trabalho considerado de referência do estudo da região ITS1, 5.8S e ITS2 em *Phytophthora*, que “é necessário ponderação e experiência quando se utiliza a região ITS em diagnóstico” uma vez que nem sempre as espécies definidas pelos caracteres morfológicos apresentam regiões ITS suficientemente diferentes para permitir a sua separação.

Os isolados de *P. cinnamomi* analisados neste trabalho evidenciaram dois padrões distintos de restrição com a enzima *Msp* I como foi apresentado em 4.3.1.3.. A existência dos dois padrões de restrição com a enzima *Msp* I não inviabilizou em qualquer dos casos a identificação dos isolados em estudo uma vez que a maior percentagem de similaridade ocorria com *P. cinnamomi*, mas colocou no imediato algumas dúvidas na aplicação dos protocolos experimentais que as repetições e também a sequenciação confirmaram como infundadas.

A sequenciação da região ITS1, 5.8S e ITS2 em nove isolados de *P. cinnamomi* evidenciou que o polimorfismo na região ITS revelada pelo método ITS-RFLP se concretizou em três pontos de diferenciação na sequência de nucleótidos. O programa Bio-Edit introduziu no emparelhamento das sequências duas deleções de bases, uma na posição 543 e outra na posição 571 e alteração da base citosina por tiamina na posição 570 na região do ITS2 passando a sequência de “CCGG” correspondente a uma sequência de corte da enzima *Msp* I a “T – GG” que assim origina um perfil de restrição diferente nesta sequência.

Em *P. cambivora* apenas foi sequenciada neste estudo a região ITS1, 5.8S e ITS2 de um único isolado e tal variabilidade não pôde consequentemente ser detectada. No entanto, a variabilidade desta região está referida na base de dados do CABI Bioscience aparecendo como *P. cambivora* “rare pattern” por ter evidenciado variabilidade nos perfis de restrição enzimática *Msp* I nos isolados então estudados.

Cooke & Duncan (1997) detectaram idêntica situação em *P. capsici* e *P. drechsleri*, estando previstas na base de dados como “rare pattern” como anteriormente referido para *P. cambivora*.

A sequenciação da região amplificada por PCR é o método com maior fiabilidade uma vez que a identificação é realizada por homologia das sequências. Tem ainda a vantagem da base de dados poder ser ampliada com a inclusão de novas sequências desta região genómica obtida de isolados dos mais variados hospedeiros e condições ecológicas sem necessidade de uniformização de protocolos entre laboratórios.

As sequências de nucleótidos da região ITS1, 5.8S e ITS2 dos isolados de *P. cinnamomi* obtidas neste trabalho apresentaram homologia de 100 %, com muitas das sequências de *P. cinnamomi* depositadas na base de dados o que nos permitiu confirmar a identificação dos isolados em estudo. A sequência de bases da região ITS1, 5.8S e ITS2 do isolado de *P. cambivora* apresentou homologia muito elevada com as sequências de *P. cambivora* existentes na base de dados apresentando, no entanto, o mesmo grau de similaridade com *P. fragariae*.

A identificação dos isolados não será possível se não existirem sequências disponíveis na base de dados das espécies em estudo ou a semelhança desta região genómica for muito elevada em espécies com epítetos diferentes que não permita a separação das espécies. De referir que Cooke *et al.* (2000) no estudo de filogenia de todas as espécies do género *Phytophthora* verificaram que a região ITS1, 5.8S e ITS2 era similar em espécies diferentes e concluíram que esta região nem sempre permite a separação ao nível da espécie.

Cooke & Duncan (1996) tinham igualmente detectado similaridade muito elevada nesta mesma região genómica em três espécies do Grupo I de Waterhouse, *P. cactorum*, *P. ideae* e *P. pseudotsugae* concluindo que esta região genómica poderia não ser suficiente para identificar os organismos ao nível da espécie.

Os métodos de sequenciação, quando aplicados a outras regiões genómicas bem caracterizadas, poderão esclarecer e estabelecer relações de filogenia e delimitação das espécies que terão um valor fundamental na estabilização da classificação e identificação neste complexo e importante género de parasitas vegetais.

O desenvolvimento de técnicas de identificação fiáveis e estáveis, por métodos moleculares, depende do conhecimento da diversidade genética presente na espécie ou na população em estudo. Lee & Taylor (1992) obtiveram em 15 isolados de

P. cinnamomi com a utilização da sequenciação da região rDNA reduzida variabilidade intra específica, tendo Drenth & Irwin (2001) com base em RAPDs e RFLPs concluído que esta espécie evidenciava elevados índices de diversidade genotípica na Austrália.

Os métodos moleculares de caracterização genotípica por serem independentes da morfologia poderão contribuir para o estudo da diversidade genética em *Phytophthora* e contribuir para o conhecimento dos mecanismos que a determinam.

Os marcadores moleculares baseados nos RAPDs por não necessitarem do conhecimento prévio da região genómica a amplificar foram utilizados neste trabalho para caracterizar molecularmente as espécies de referência de *Phytophthora* e dos isolados de *Phytophthora* obtidos em castanheiro.

Os “clusters” ou agrupamentos obtidos pela análise numérica do conjunto de fragmentos amplificados por PCR pelo conjunto dos cinco primers seleccionados entre os 40 inicialmente testados permitem a separação das diferentes espécies de *Phytophthora*.

Todos os isolamentos referência de *P. cinnamomi* ficam agrupados no mesmo cluster com excepção do isolado referência de *P. cinnamomi* var. *parvispora* que fica agrupada num outro cluster.

P. cinnamomi var. *parvispora* foi descrita como unidade taxonómica por Kröber & Marwitz (1993) por possuir esporângios e clamidósporos de menores dimensões que os de *P. cinnamomi*. Todos os primers “10 mer” utilizados neste estudo originaram em *P. cinnamomi* var. *parvispora* um padrão de amplificação diferente dos restantes isolados de *P. cinnamomi*. Os valores de similaridade obtidos pela análise numérica apresentam valores semelhantes aos obtidos com as outras espécies de *Phytophthora* analisadas neste trabalho.

Esta metodologia não nos permitiu, no entanto, caracterizar os isolados de *P. cinnamomi* isolados de castanheiro, dado que ficam agrupados no mesmo cluster, embora tenha proporcionado a separação das espécies *P. cambivora* e *P. cinnamomi* presentes no conjunto dos isolados em estudo.

O reduzido polimorfismo detectado nos isolados *P. cinnamomi* obtidos em castanheiro, com a utilização dos cinco primers “10-mer” seleccionados entre os 40 testados, não deixará de estar relacionado com a proximidade taxonómica dos isolados em estudo e ao facto de todos os isolados em estudo terem sido obtidos no mesmo

hospedeiro ao contrário do que acontecia quando se seleccionarem os primers “10-mer” a utilizar.

A técnica RAPD poderá ter maior aplicabilidade na caracterização dos isolados de *P. cinnamomi* se o polimorfismo for associado a características específicas dos isolados e não em termos globais como foi realizado neste trabalho. O polimorfismo associado a determinada característica necessitará que se testem maior número de primers “10 mer” dos 1000 comercializados pela Operon Technologies.

Os marcadores moleculares baseados nos RAPDs têm tido uma aplicação reduzida na caracterização molecular de *P. cinnamomi* ao nível infra-específico. Na bibliografia apenas encontramos Chang *et al.* (1996) que utilizaram esta metodologia para caracterizar isolados de compatibilidade sexual A1 e A2 em *P. cinnamomi*. Os resultados, no entanto, não permitiram caracterizar os isolados em estudo, indicando mesmo ser esta metodologia mais adequada para diferenciar os isolados obtidos de hospedeiros diferentes.

A técnica RAPD tem sido igualmente pouco utilizada noutras espécies do género *Phytophthora*. *P. infestans* é a espécie de *Phytophthora* melhor caracterizada em termos de variabilidade genética e populacional, devido à introdução na Europa, na década de 70, do “mating type” A2 e do aparecimento da resistência ao fungicida metalaxil na década de 80. Os marcadores RAPDs não tiveram em *P. infestans* uma utilização frequente apesar das aplicações iniciais indicarem o interesse desta técnica na caracterização molecular das diferentes populações (Punja *et al.*, 1998). Carlisle *et al.* (2001) além dos marcadores proteicos (glucose-6- phosphato isomerase (*Gpi*) e a aloenzima peptidase (*Pep*) sempre utilizados na caracterização das populações de *P. infestans* estudaram a diversidade genética das diferentes populações da Inglaterra, Irlanda e Europa continental utilizando a técnica RAPD. Esta técnica permitiu detectar variabilidade genética entre as diferentes populações em estudo tendo os autores atribuído a variabilidade entre as populações à deriva genética “founder effect” e ao reduzido intercâmbio de material vegetal entre as regiões em estudo. A variabilidade genética em cada população foi atribuída a mecanismos associados à multiplicação assexuada. Mahuku *et al.* (2000) que também tinham aplicado esta metodologia em populações de *P. infestans* de diferentes locais no Canadá não detectaram variabilidade entre as populações das diferentes regiões e atribuíram a variabilidade genética da população à ocorrência de mutações ou mesmo

à sensibilidade da técnica RAPD que permite detectar pequenas alterações ao nível do genoma.

A técnica RAPD por necessitar de quantidades reduzidas de DNA genómico, pela facilidade de implementação prática e rapidez na obtenção de fragmentos de amplificação num número elevado de indivíduos aliado à simplicidade da análise binária dos resultados foi utilizada com muita frequência na caracterização molecular dos mais diversos organismos. No entanto, os RAPD são muito sensíveis às condições laboratoriais nomeadamente às condições de extracção do DNA genómico e condições físicas e químicas da reacção PCR que alteram os perfis de amplificação e consequentemente a reprodutibilidade da técnica tanto entre repetições do mesmo estudo como entre laboratórios diferentes. Estas limitações dificultam a uniformização dos protocolos e dos padrões de amplificação tornando esta técnica pouco adequada ao estudo da variabilidade populacional ao longo do tempo. A falta de reprodutibilidade dos perfis de amplificação RAPD foi também a maior dificuldade com que nos deparamos na utilização desta técnica razão pela qual não a utilizamos em todos os isolados de *Phytophthora* obtidos em castanheiro e incluídos neste estudo.

Outro parâmetro sempre avaliado em termos do estudo populacional de *Phytophthora* é a sensibilidade ao fungicida metalaxil. O metalaxil é um fungicida selectivo para os *Oomycetes* que inibe a síntese do RNA dos ribossomas (rRNA) interferindo no crescimento micelial. É efectivo em todas as espécies de *Phytophthora* a concentrações muito baixas (inferiores a 1 ppm), apresentando valores de EC_{50} que se situam entre os 2 – 30 ng mL⁻¹ em *P. boehmeriae* a 200 ng mL⁻¹ em *P. cactorum* (Erwin & Ribeiro, 1996). Os mesmos autores referem valores do EC_{50} que variam entre 7 – 90 ng mL⁻¹ em *P. cinnamomi*.

Os isolados em estudo foram obtidos em locais onde o metalaxil não foi ainda utilizado e poderá, assim, ser um bom indicador da sensibilidade intrínseca dos isolados de *P. cinnamomi* e *P. cambivora* a esta substância.

Em *P. cinnamomi* 69 % dos isolados não evidenciam crescimento a 1 µg mL⁻¹ de metalaxil. Dos isolados que evidenciaram crescimento a 1 µg mL⁻¹ apenas sete isolados (15,5 %) evidenciaram crescimento a 10 µg mL⁻¹, e quatro isolados, (8,8 % dos isolados) cresceram a 20 µg mL⁻¹ o que evidencia a variabilidade intrínseca dos isolados de *P. cinnamomi* em relação ao metalaxil. Os isolados que evidenciaram crescimento a 10 µg mL⁻¹ foram isolados nos concelhos de Vinhais, Amarante e

Bragança, o que demonstra uma vez mais a natureza intrínseca desta característica em *P. cinnamomi*, aparecendo em todas as grandes regiões da amostragem.

P. cambivora, apesar do menor número de isolados em estudo, evidenciou menor sensibilidade ao metalaxil, tendo todos os isolados crescido a 1 e 10 µg mL⁻¹ tendo mesmo 75 % dos isolados desta espécie crescido a 20 µg mL⁻¹.

O metalaxil, com um modo de acção muito específico, determina que a resistência a este fungicida surja muito rapidamente. A resistência ao metalaxil é governada por um único gene com dominância incompleta. Esta característica possibilita, em espécies com elevadas taxas de esporulação, como *P. infestans* em batateira, que os biótipos com resistência se tornem dominantes num período de tempo muito curto.

Na Europa a resistência ao metalaxil apareceu no mesmo ano em que foi introduzido como fungicida comercial para o combate de *P. infestans* tornando este fungicida ineficaz no combate do míldio da batateira.

A utilização do metalaxil em espécies de *Phytophthora*, que se desenvolvem no ambiente solo, quando aplicado formulado em grânulos ou na água de rega, foi considerada menos propícia ao rápido desenvolvimento da resistência. No entanto, em termos práticos a aplicação ao solo proporciona de igual forma a selecção dos biótipos menos sensíveis ao metalaxil como aconteceu com *P. parasitica* em tabaco (Shew, 1985).

A detecção de biótipos com menor sensibilidade ao metalaxil em ensaios laboratoriais não significa que o aparecimento da resistência a esta substância seja iminente no entanto coloca algumas limitações na utilização desta substância que deve ser utilizada em conjunto com substâncias activas com modo de acção menos específica e com um número reduzido de aplicações por ciclo vegetativo (Shew, 1995).

O metalaxil não está homologado em Portugal para a tinta do castanheiro e as alterações ao nível da população de *Phytophthora* quanto ao grau de sensibilidade a esta substância não se colocam em termos da população no seu conjunto. Os resultados de EC₅₀ obtidos nos isolados 811, 122 e 125 de *P. cinnamomi*, com redução da sensibilidade ao metalaxil na ordem dos 24 – 30 vezes evidenciam a sensibilidade diferencial dos isolados e a possibilidade da selecção dos biótipos menos sensíveis com o consequente aparecimento da resistência a esta substância activa.

A não inclusão do metalaxil no anexo 1 da Directiva 91/414/CEE implica directamente a não comercialização a nível europeu dos produtos com metalaxil, podendo, como data limite ser utilizadas até Novembro de 2004, considerando a existência de produtos em stock. Esta situação inviabiliza uma das estratégias de luta utilizadas no combate às doenças provocadas por *Phytophthora* tanto na parte aérea como radicular e evidencia a dificuldade em combater as doenças associadas com estes parasitas vegetais baseadas na utilização de produtos químicos. As estratégias de luta baseadas nos meios preventivos, desde sempre considerados importantes, mantêm a actualidade e efectividade na prevenção da introdução deste tipo de doenças em áreas cada vez mais alargadas.

A utilização de material de propagação isento de propágulos assim como a plantação em solos não infestados é assim um requisito básico de combate a estas doenças que só pode ser concretizado pela disponibilidade de métodos rápidos e fiáveis de detecção e diagnóstico.

As técnicas de detecção e identificação específicas e com elevados níveis de sensibilidade são assim ferramentas fundamentais para garantir a qualidade sanitária do material de propagação e tornar efectivas as medidas de quarenta assim como possibilitar o rápido diagnóstico fitopatológico e contribuir para o estudo epidemiológico e de patogénese destes importantes parasitas dos vegetais.

Os métodos clássicos de detecção e identificação das espécies de *Phytophthora* que atacam as raízes das plantas, já analisados ao longo deste trabalho, são difíceis de aplicar, muito morosos, exigem elevado grau de especialização técnica e na maioria das situações não se conhece o grau de sensibilidade dos métodos utilizados.

Os métodos imunoenzimáticos com elevada especificidade e sensibilidade de detecção em vírus, fitoplasmas e bactérias fastidiosas dos vegetais, não tiveram grande aplicação em *Phytophthora* dada a falta de especificidade mesmo com a utilização de anticorpos monoclonais (Drenth & Irwin, 2001).

Os métodos moleculares baseados na técnica PCR constituem actualmente novas áreas de desenvolvimento das técnicas de diagnóstico em todas as áreas da microbiologia e também em *Phytophthora*. Henson & French (1993) referem como vantagens desta técnica de diagnóstico a de não ser necessário isolar em cultura pura os organismos patogénicos; possuir elevada especificidade e sensibilidade; ser possível desenhar primers com diferentes graus de especificidade, ao nível do género, da espécie ou mesmo da estirpe e poder ser utilizada a custos relativamente baixos.

A especificidade da técnica PCR, primeiro requisito exigido a qualquer método de diagnóstico é obtida pelo desenho de primers específicos em regiões genómicas características do organismo em estudo. A região genómica que codifica para o RNA dos ribossomas (rDNA) está bem caracterizado no género *Phytophthora* sendo a região genómica na qual se baseiam as técnicas moleculares de identificação de *Phytophthora* e uma grande parte das estratégias moleculares para a detecção e diagnóstico das espécies dentro deste género.

“Nested” PCR é uma estratégia de detecção muito utilizada em espécies de *Phytophthora* sendo os primers específicos desenhados no interior da região rDNA. Estes primers são utilizados numa segunda reacção PCR cujo DNA molde é a região mais alargada da região do rDNA amplificada numa primeira reacção PCR com primers universais.

A aplicação prática desta estratégia de detecção nem sempre conduz a resultados de amplificação com a especificidade pretendida. Com a utilização desta estratégia Nechwatal *et al.* (1999), não obtiveram primers específicos para *P. cambivora* e *P. quercina* apesar de terem testado vários pares de primers.

Neste trabalho, com a utilização dos primers DC9 e DC4 (Cacciola *et al.*, 1999) e DC5 (SCRI) desenhados nesta mesma região genómica para a detecção de *P. cinnamomi* e *P. cambivora*, não obtivemos produtos de amplificação específicos tendo aparecido reacções cruzadas com todas as espécies de *Phytophthora* testadas neste estudo e mesmo com *Pythium* sp. e *C. parasitica*.

O desenho de primers específicos para aplicação da técnica PCR de diagnóstico pode ser concretizado em qualquer região genómica característica de determinado organismo desde que seja conhecida a sequência de nucleotídios dessa mesma região.

A caracterização RAPD-PCR realizada neste trabalho permitiu detectar fragmentos de amplificação únicos em *P. cinnamomi* com características adequadas para o desenvolvimento de um marcador SCAR. Esta estratégia de detecção foi também utilizada por Schubert *et al.* (1999) para a obtenção de primers específicos para *P. cambivora* e *P. quercina* e por muitos outros autores com o mesmo objectivo mas aplicados a outras situações de detecção, Hermosa *et al.* (2001) na detecção de *Thrichoderma atroviride* 11 utilizado como agente de bio controlo, Catara *et al.* (2000) para detecção de *Pseudomonas corrugata* e Zijlstra (2000) para identificação de nemátodes do género *Meloidogyne*.

A transformação do fragmento de amplificação RAPD característico de *P. cinnamomi* num marcador SCAR foi realizada pela aplicação das técnicas moleculares consideradas adequadas.

A especificidade do marcador SCAR foi avaliada por “Southern-blot” utilizando-se DNA genómico de diferentes espécies de *Phytophthora* de referência: *P. cambivora*, *P. cinnamomi* (342, 120), *P. quercina*, *P. nicotiana*, *P. citricola*, *P. capsisi*, *P. syringae*, DNA genómico de castanheiro (*Castanea sativa*) e de uma levedura isolada do mel *R. mucilaginosa* digeridos com a mesma enzima de restrição (*Rsa* I) para garantir a identificação do fragmento em análise. O “Southern-blot” evidenciou o aparecimento de sinal de hibridação DNA/DNA na região dos 500 pb apenas na espécie *P. cinnamomi* (342.72 e 120), aparecendo um forte sinal de hibridação na região dos 3000 pb em todas as espécies de *Phytophthora*. Na espécie *P. cinnamomi* aparece ainda um outro sinal de hibridação na região dos 900 pb. O aparecimento dos diferentes sinais de hibridação pode estar associado a digestões parciais do genoma pela enzima de restrição ou a repetições desta sequência no genoma.

Os resultados obtidos com o “Southern-blot” validam a utilização do marcador SCAR como região genómica característica de *P. cinnamomi*, objectivo imediato pretendido, constituindo ainda uma ferramenta importante para perspectivar estratégias para alargar o conhecimento da região genómica que inclui o fragmento SCAR.

A natureza da técnica SCAR não permite conhecer, à partida, as características da região genómica amplificada da sua variabilidade nas diferentes espécies de *Phytophthora* e mesmo na espécie *P. cinnamomi* para a qual foi desenvolvido, assim como saber se é uma região codificante de um gene ou uma região não transcrita. Conhecer as características da região genómica é importante não só em termos do genoma de *P. cinnamomi* mas também para garantir a estabilidade dos métodos de detecção com base nesta região genómica.

Os primers para a detecção específica de *P. cinnamomi* desenhados na extremidade do fragmento amplificado, Cin1, Cin3 com 23 nucleótidos não incluem a sequência do primer OPO-08 que lhe deu origem. O primer Cin1 é um primer desenhado no sentido reverso na extremidade 3' e o primer Cin3 no sentido directo desenhado próximo da extremidade 5'. O primer Cin2 foi desenhado no sentido directo e próximo da extremidade 5' com o objectivo de constituir uma nova hipótese de

especificidade para detecção de *P. cinnamomi* e não com o objectivo de utilização em “Nested” PCR.

Schubert *et al.* (1999) incluíram a sequência de nucleótidos do primer “10-mer” nos primers por eles desenhados mas outros autores optam por não a incluir. Com a utilização dos primers que incluíam a sequência de nucleótidos do primer “10-mer” OPO-08, obtivemos o fragmento de amplificação esperado tendo aparecido um fragmento de amplificação de menor intensidade com aproximadamente 400 pb que por vezes também apareceu com a utilização do primer OPO-08 em DNA genómico de alguns isolados.

Todos os testes de especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade foram realizados com os primers desenhados na sequência dos nucleótidos sem incluir a sequência dos nucleótidos do primer “10-mer”.

A especificidade dos primers foi avaliada em reacções PCR utilizando o par de primers Cin3/Cin1 e Cin2/Cin1 em DNA obtido de culturas puras das espécies de referência utilizadas neste estudo que incluem cinco isolados de referência de *P. cinnamomi*. Os dois pares de primers proporcionaram resultados semelhantes. Com o primer Cin2/Cin1 obteve-se um fragmento de amplificação em *P. quercina* que no entanto não invalida nem dificulta a aplicação desta metodologia uma vez que a dimensão do fragmento com aproximadamente 800 pb é perfeitamente diferenciável do fragmento característico de *P. cinnamomi*. O fragmento com 663 pb é característico de *P. cinnamomi* tanto do tipo de compatibilidade A1 (341.72) como A2 (342.72) não ocorrendo amplificação em *P. cinnamomi* var. *parvispora*.

A reprodutibilidade e robustez da técnica foi avaliada pela utilização de DNA de 18 isolados de *P. cinnamomi* obtidos em castanheiro e incluídos neste estudo, tendo-se obtido fragmentos de amplificação em todos os isolados de *P. cinnamomi*.

A sensibilidade do método de detecção foi realizada com diluições do DNA molde de *P. cinnamomi* a partir de uma solução de DNA com 65-75 ng/μl. Os resultados da reacção PCR com 35 ciclos de amplificação indicam a diluição 1/100 como limite de detecção por PCR.

A sensibilidade do método de detecção baseado na PCR pode ser aumentada utilizando variantes desta técnica. Com a utilização da variante designada “Nested” PCR, Grote *et al.* (2000) referem um aumento da sensibilidade do método de detecção da ordem da unidade de milhar em *P. nicotiana* e Baudry (1999) refere um aumento da sensibilidade do método na ordem das 100 unidades em *P. fragariae* var. *fragariae*

com a utilização de soluções de DNA mais complexas por terem resultado de extracção de tecidos infectados. Valores da mesma ordem de grandeza são igualmente referidas por Ippolito *et al.* (2002) em *P. nicotiana* e *P. citrophthora* e por Llop *et al.* (2000) em *Erwinia amylovora*.

Esta variante PCR permite o aumento da sensibilidade do método de detecção por PCR sem necessidade de aplicação de novas metodologias e equipamentos, apresenta a desvantagem de necessitar de uma segunda reacção PCR que pode originar um aumento dos falsos positivos devido à inerente utilização do DNA amplificado na primeira reacção PCR. Llop *et al.* (2002) desenvolveram uma técnica que permite a realização das duas reacções de amplificação no mesmo tubo para diminuir as contaminações resultantes da manipulação das amostras. Esta metodologia está validada para aplicação em *Erwinia amylovora* e em CTV / Citrus Tristeza Vírus organismos de quarentena da lista A2 – OEPP (Projecto DIAGPRO).

A técnica de diagnóstico por PCR apresenta algumas limitações de ordem prática na detecção dos produtos de amplificação por electroforese quando é necessário avaliar elevado número de amostras. Esta limitação levou ao desenvolvimento de outras estratégias para a rápida detecção do DNA amplificado. Os métodos imunoenzimáticos de detecção do DNA: PCR-ELISA e os métodos de transferência por ressonância de fluorescência – PCR em Tempo Real são os métodos de mais frequente utilização. Em PCR-ELISA é incorporado um marcador químico (digoxigenina) nos produtos PCR durante a amplificação seguido de hibridação dos produtos amplificados numa microplaca com uma sonda complementar da sequência amplificada. O marcador imobilizado na placa é detectado por ELISA pela adição do conjugado da enzima específico para digoxigenina e adição do substrato colorimétrico seguido da leitura a 405 nm. Bailey *et al.* (2002) utilizaram esta técnica no desenvolvimento de uma sonda específica por PCR-ELISA para detecção de *Phytophthora* e *Pythium* e Nolasco *et al.* (2003) para a detecção de vírus com o desenvolvimento da técnica “Asymetric PCR-ELISA” para facilitar a aplicação da técnica e diminuir os custos da sua aplicação.

A PCR em Tempo Real é uma técnica em que o DNA amplificado é quantificado medindo a intensidade da fluorescência na fase exponencial de amplificação. Esta tecnologia utiliza uma sonda (TaqMan®) marcada com pigmentos fluorescentes nas duas extremidades que hibridam no interior da região a amplificar por PCR. A fluorescência é originada pela actividade 5' nuclease da *Taq* polimerase que ao retirar

um dos pigmentos fluorescentes resulta num aumento da fluorescência emitida. A fluorescência é quantificada em equipamentos específicos e pode ser associada à quantidade de DNA presente nas amostras iniciais se incluído no ensaio quantidades estandardizadas de DNA para a determinação de uma curva de calibração e quantificação. A quantidade de DNA presente na amostra pode assim ser determinada sem necessidade de qualquer manipulação posterior da amostra.

Esta metodologia muito utilizada em diagnóstico médico de vírus e bactérias tem tido uma aplicação cada vez mais alargada em diagnóstico fitopatológico. Böhm *et al.* (1999) testaram esta metodologia em *P. infestans* e *P. citricola* tendo desenvolvido primers e sondas para detectar e monitorizar estes patógenos em plantas hortícolas e florestais, respectivamente. Schena *et al.* (2002) aplicaram esta mesma metodologia na detecção de *Rosellinia necatrix*, (Cullen *et al.*, 2001) em *Helminthosporium solani* e (Graaf *et al.*, 2003) em *Spongospora subterranea*.

A eficiência da reacção PCR em Tempo Real é maior se os produtos a amplificar tiverem entre 50 e 150 pb (Böhm *et al.*, 1999). Estes autores propõem mesmo o desenvolvimento de primers que satisfaçam esta exigência do método, uma vez que com os primers até agora desenvolvidos que pretendiam amplificar regiões genómicas de maiores dimensões não é possível aplicar esta nova metodologia de diagnóstico.

A região genómica sequenciada neste trabalho pelas sua especificidade em *P. cinnamomi* pode ser utilizada para o desenvolvimento desta nova metodologia que pela automatização inerente ao desenvolvimento desta técnica facilita o processo de detecção e identificação quando é necessário processar elevado número de amostras.

Ultrapassadas com sucesso as etapas de avaliação da especificidade e sensibilidade do método de detecção com a utilização de DNA extraído de culturas puras e de referência para as diferentes espécies de *Phytophthora* utilizou-se o método baseado na PCR com os primers Cin3/Cin1 ou Cin2/Cin1 em situações de aplicação em diagnóstico: plantas com sintomas da doença da tinta, tecidos vegetais e água da diluição do solo utilizada nas técnicas armadilha.

A utilização de amostras de DNA molde de composição complexa como a que se obtêm de tecidos vegetais ou do solo originam com frequência inibição das reacções de amplificação ou reduzem drasticamente a sensibilidade dos métodos baseados na PCR. Os fenóis, polissacáridos ou outros constituintes celulares ou os ácidos húmicos existentes no solo inibem as reacções de amplificação do DNA por inibirem a acção da enzima de polimerização, quelatizarem o Mg^{2+} que é um co-factor da enzima de

amplificação ou por se ligarem ao DNA molde (Roose-Amsaleg *et al.*, 2001; Poussier *et al.*, 2002).

A natureza da amostra a analisar determinará o método de extracção a utilizar para que a reacção de amplificação não seja inibida. Estas limitações na obtenção do DNA têm constituído um entrave à utilização generalizada deste método em detecção e diagnóstico fitopatológico. A presença de substâncias inibidoras da reacção PCR foi também por nós constatada uma vez que não se obteve qualquer produto de amplificação PCR quando se utilizou como DNA molde o DNA extraído dos tecidos do caule de castanheiro inoculados com micélio de *P. cinnamomi* pelo método CTAB (Dolye & Dolye, 1990). Esta dificuldade só foi solucionada pela utilização do kit Wizard® para purificação do DNA.

Tendo como referência este ensaio preliminar utilizamos o método DNeasy Plant Mini kit (Quiagene, Germany) para a extracção do DNA das raízes das plantas que cresceram em substrato inoculado com *P. cinnamomi* a que se seguiu a purificação do DNA pelo Kit Wizard® uma vez que as amostras evidenciavam uma intensa cor castanha no final do processo de extracção.

Os resultados obtidos com a utilização da PCR-Diagnóstico confirmaram os resultados obtidos com a utilização do meio selectivo P₁₀VPH, tendo mesmo detectado a presença do parasita em plantas de castanheiro onde os métodos clássicos não tinham evidenciado resultados positivos.

As raízes das plantas utilizadas nesta avaliação encontravam-se em avançado estado de degradação e já muito apodrecidas correspondendo a situações extremas de degradação dos tecidos da raiz sem que a reacção de amplificação tenha sido afectada.

A detecção e identificação, em simultâneo, de *P. cinnamomi* associada com a doença da tinta do castanheiro em tecidos radiculares pela técnica PCR constituem uma metodologia fiável e rápida podendo ainda ser aplicada ao solo e substratos utilizados nos viveiros ou mesmo no solo onde a cultura vai ser instalada. Para a aplicação da técnica PCR ao solo é necessário obter o DNA presente nesse solo. A co-extracção dos ácidos húmicos do solo, a presença do inoculo em estruturas de resistência das quais é mais difícil extrair o DNA e a necessidade de utilizar amostras muito diminutas (1 µL) na reacção PCR constituem dificuldades sucessivas na utilização desta metodologia.

Os métodos armadilha que se baseiam na infecção dos tecidos pelos zoósporos, os propágulos primários de infecção dos tecidos vegetais, foram utilizados em

conjunto com a PCR-Diagnóstico realizada nos tecidos armadilha e à água onde se encontram a flutuar os tecidos vegetais, como método de detecção de *P. cinnamomi* no solo.

A fragilidade estrutural dos zoósporos, que nesta fase não possuem parede celular, a infecção recente dos tecidos vegetais conjugado com a especificidade da reacção PCR, que não é afectada pela presença de outros organismos, permitem ultrapassar algumas das limitações que se colocavam na extracção do DNA do solo.

Os métodos simplificados de extracção do DNA utilizados neste trabalho constituem uma referência da possibilidade da utilização desta metodologia em estudos de epidemiologia e detecção de *P. cinnamomi* no solo e que também Foster *et al.* (1993) consideram importante na aplicação destes metodologias em situações de aplicação prática.

Os resultados obtidos no ensaio de detecção em que se utilizou terra vegetal inoculada com *P. cinnamomi* como “solo problema” evidenciam a eficiência de detecção por PCR-Diagnóstico de *P. cinnamomi* nos tecidos vegetais com resultados positivos a partir das 24 horas e que se mantém às 48 e 72 horas e com menor grau de eficácia às 96 horas.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos na utilização desta técnica em que obtivemos isolamentos positivos nos tecidos da folha do castanheiro a partir das 24 horas mas a maior percentagem de isolamento ocorreu consistentemente às 48 horas de incubação dos tecidos armadilha. Às 72 e 96 horas de incubação dos tecidos armadilha é evidente maior contaminação das placas por organismos de crescimento mais rápido que dificultam a visualização microscópica do micélio de *Phytophthora*

A detecção por PCR-Diagnóstico a partir da água onde flutuam os tecidos armadilha para detecção dos zoósporos apesar de detectar *P. cinnamomi* desde as 24 horas do ensaio não proporciona reacções de amplificação em todas as repetições ensaiadas.

Os resultados negativos da reacção PCR podem estar associados a factores de inibição da enzima de polimerização presentes nas soluções de DNA e a falhas na manipulação dos inúmeros constituintes da reacção que introduzem alguma incerteza na interpretação dos resultados obtidos. Os resultados falsos negativos podem no entanto ser minimizados com a introdução na reacção de amplificação de primers universais que possibilitam a amplificação PCR de regiões características do rDNA como o NS1 e NS2 de White *et al.* (1990) utilizado por Winton & Hansen (2001) que

possibilita a amplificação de um fragmento com 550 pb em plantas, protistas e fungos e que funcionará como um controlo positivo para o funcionamento da enzima de polimerização do DNA tornando a interpretação dos resultados obtidos mais objectiva e fiável.

A técnica PCR de detecção das espécies de *Phytophthora* associadas com a doença da tinta pode ainda ser otimizada pela utilização da técnica “multiplex” PCR que permite detectar numa única reacção PCR, *P. cambivora* e *P. cinnamomi*. Os resultados obtidos com a utilização de DNA extraído de micélio de culturas puras de *Phytophthora* e com os primers CAMB3/CAMB4 e Cin3/Cin1 evidenciaram a especificidade do método de detecção destas duas espécies de *Phytophthora* associadas com a doença da tinta do castanheiro. Os protocolos de “PCR Multiplex” com a utilização de DNA molde extraído de plantas doentes terão ainda de ser testados e ajustados para que a sensibilidade de detecção seja semelhante nas duas espécies de *Phytophthora* associadas com a doença da tinta.

6. CONCLUSÕES

1 – A detecção e isolamento em cultura pura das espécies de *Phytophthora* associadas coma doença da tinta necessita que se ponderem e planeiem as técnicas e métodos a utilizar em cada situação concreta de diagnóstico. Os resultados obtidos permitem concluir que:

- a) O meio selectivo P₁₀VPH de Tsao & Guy (1977) proporciona resultados fiáveis em todas as situações de isolamento.
- b) A técnica de tecido armadilha com a utilização de discos de folha de castanheiro é uma técnica fiável na detecção de *Phytophthora* do solo e de tecidos em avançado estado de degradação.
- c) O método armadilha de planta inteira utilizada na detecção de *Phytophthora* nos soutos com mais de 30 anos de plantação e com sintomas da doença da tinta proporcionou o isolamento de *Phytophthora* em todos os locais amostrados o que valida a utilização desta técnica de detecção de *Phytophthora* em soutos adultos.

2 – A identificação específica dos isolados de *Phytophthora* associados com a doença da tinta, baseada neste trabalho apenas nos critérios morfológicos diferenciadores, evidencia a dificuldade da identificação ao nível da espécie no género *Phytophthora* com base em critérios morfológicos.

3 – Os métodos de identificação molecular baseados na região ITS1, 5.8S e ITS2 proporcionaram a identificação dos isolados de *Phytophthora* ao nível da espécie de forma objectiva e fiável, tanto pelo método ITS-RFLP como pela sequenciação dos nucleótidos desta região genómica. A variabilidade do perfil de restrição com a enzima *Msp* I nos isolados de *P. cinnamomi* ocorreu devido a alterações na sequência de bases na região do ITS2 correspondentes a um dos locais de corte desta enzima.

4 – Identificaram-se duas espécies de *Phytophthora* associadas com a doença da tinta na região Norte de Portugal: *P. cambivora* e *P. cinnamomi*. *P. cinnamomi* foi a espécie

mais frequentemente isolada estando presente em souts jovens e adultos sendo mesmo a única espécie isolada em viveiros florestais. *P. cambivora* (com apenas 4 isolados) foi isolada em souts jovens e adultos e ainda em plantas de castanheiro com 6-8 anos de plantação onde era evidente a degradação dos tecidos do colo em forma de V invertido.

5 – Todos os isolados de *Phytophthora* associados com a doença da tinta são do grupo de compatibilidade sexual A2 e nenhum é auto-compatível.

6 – *P. cinnamomi* apresenta maior sensibilidade ao metalaxil e também maior variabilidade. Alguns isolados (9 %) apresentam sensibilidade reduzida ao metalaxil o que pode indicar o rápido aparecimento da resistência por acção da pressão de selecção resultante da aplicação desta substância activa.

7 – A técnica de caracterização molecular baseada nos RAPD não permitiu avaliar a diversidade genotípica dos isolados de *Phytophthora* associados com a doença da tinta, embora tenha permitido a separação dos isolados ao nível da espécie. A reduzida reprodutibilidade destes marcadores moleculares aconselha a que se utilizem marcadores moleculares mais estáveis como os AFLP para o estudo da variabilidade genotípica.

8 – As técnicas moleculares de detecção baseadas no SCAR – PCR-Diagnóstico, desenvolvido neste trabalho para a espécie *P. cinnamomi*, evidenciaram ser específicas e com um grau de sensibilidade que possibilita a sua utilização na detecção de *P. cinnamomi* nas raízes das plantas de castanheiro, tecidos vegetais e na água dos métodos armadilha.

9 – A PCR-Diagnóstico permite detectar e identificar *P. cinnamomi* numa única reacção PCR o que reduz o número de manipulações das amostras e consequentemente as contaminações sempre indesejáveis em diagnóstico.

10 – A aplicação das técnicas PCR-Diagnóstico pela sua especificidade, sensibilidade e fiabilidade constituirão ferramentas imprescindíveis em quarentena tanto no sentido

lato como restrito, na produção de material de propagação isentos de propágulos destes parasitas e em estudos de patogénese e epidemiologia determinantes para se perspectivarem novas estratégias no desenvolvimento de variedades resistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bailey, A M., Mitchell, D. J., Manjunath, K. L., Nolasco, G. & Niblett, C. L. (2002). Identification to the species level of the plant pathogens *Phytophthora* and *Pythium* by using sequences of the ITS1 region of ribosomal DNA as capture probes for PCR ELISA. *FEMS Microbiology Letters*, **207**:153-158.
- Baudry, C. (1999). *Phytophthora fragariae* du framboisier et du fraisier- Méthodes de dépistage par la biologie moléculaire. *Phytoma - La Défense des Végétaux*, **513** : 48-52.
- Belkhiri, A., Buchko, J. & Klassen, G. R. (1992). The 5S ribosomal RNA in *Pythium* species: two different genomic locations. *Mol. Biol. Evol.*, **9** (6): 1089-1102.
- Böhm, J., Hahn, A., Schubert, R., Bahnweg, G., Adler, N., Nechwaltal, J., Oehlmann, R. & Obwald, W. (1999). Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mossea* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective hosts plants. *J. Phytopathology*, **147**: 409-416.
- Bonants, P. J. M., Carroll, G. C., Weedt, M., Brouwershaven, I. R. & Baayen, R. P. (2003). Development and validation of fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*. *European Journal of Plant Pathology*, **109**: 503-513.
- Bonants, P., Weerdt, M. H.-D., Gent-Pelzer, M. Van, Lacourt, I., Cooke, D. & Duncan, J. (1997). Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymetase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology*, **103**: 345-355.
- Bonants, P., Weerdt, M. H. D., Gent-Pelzer, M., Lacourt, I., Cooke, D. & Duncan, J. (1996). The use of nested PCR for the detection of *Phytophthora fragariae* in strawberry. *PCR Detection of Fungi, Part four*, pp. 105-106. Advances in the detection of plant pathogens by polymerase chain reaction. *COST 823 - New technologies to improve phytodiagnosis. Workshop of the nucleic acid-based technology working group*. Cesk Budejovice, Czech Republic - 20-21 June 1996.
- Brasier, C. M. & Kirk, S. A. (2001). Comparative aggressiveness of standard and variant hybrid alder *Phytophthora*, *Phytophthora cambivora* and other *Phytophthora* species on bark of *Alnus*, *Quercus* and other woody hosts. *Plant Pathology*, **50**: 218-229.
- Brasier, C. M. (1975). Stimulation of sex organ formation in *Phytophthora* by antagonistic species of *Trichoderma*. *New Phytol.*, **74**: 183-194.
- Brasier, C. M. (1987). Problems and prospects in *Phytophthora* research. In: D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P. H. Tsao (Eds.) *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. APS Press: 351-364.

- Brasier, C. M., Cooke, D. E. L., Duncan, J. M. & Hansen, E. M. (2003). Multiple new phenotypic taxa from trees and riparian ecosystems in *Phytophthora gonapodyides* - *P. megasperma* ITS Clade 6, which tend to be high-temperature tolerant and either inbreeding or sterile. *Mycol. Res.*, **107** (3): 277-290.
- Brasier, C. M., Cooke, D. E. L., Duncan, J.M. (1999). Origen of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**: 5878 – 5883.
- Briard, M., Dutertre, M., Rouxel, F. & Brygoo, Y. (1995). Ribosomal RNA sequence divergence within the *Pythiaceae*. *Mycol. Res.*, **99** (9): 1119-1127.
- Buckler IV, E. S., Ippolito, A. & Holtsford, T. P. (1997). The Evolution of Ribosomal DNA: Divergent Paralogues and Phylogenetic Implications. *Genetics*, **145**: 821-832.
- Cacciola, S. O., Williams, N., Cooke, D., E., L., Duncan, J. M. (2001). – Molecular identification and detection of *Phytophthora* species on some important Mediterranean plants including sweet chestnut. *For. Snow Landsc. Res.*, **76** (3): 251-365.
- Carlisle, D. J., Cooke, L. R. & Brown, A. E. (2001). Phenotypic and genotypic characterisation of Northern Ireland isolates of *Phytophthora infestans*. *European Journal of Plant Pathology*, **107**: 291-303.
- Carvalho, M., A., G., (1997). *Inventariação e Avaliação da Sanidade das Áreas de Castanheiro no Parque Natural de Montesinho*. Relatório Final de Estágio. UTAD, Vila Real.
- Catara, V., Arnold, D., Cirvilleri, G. & Vivian, A. (2000). Specific oligonucleotide primers for the rapid identification and detection of the agent of tomato pith necrosis, *Pseudomonas corrugata*, by PCR amplification: evidence for two distinct genomic groups. *European Journal of Plant Pathology*, **106**: 753-762.
- Cavalier-Smith, T. (1986). The kingdom chromista. Origin and systematics. In: Chapman, D. J. *Progress in Phycological Research*. Biopress. Bristol, England.
- Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. **73**: 203-266.
- Chang, T. T., Yang, W. W. & Wang, Y. W. (1996). Use of random amplified polymorphic DNA markers for the detection of genetic variation in *Phytophthora cinnamomi* in Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **37**: 165-171.
- Chen, X. M., Line, R. F. & Leung, H. (1995). Virulence and polymorphic DNA relationships of *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* to other rusts. *Phytopathology*, **85**: 1335-1342.
- Coelho, A. C., Cravador, A., Bollen, A., Ferraz, J. F. P., Moreira, A. C., Fauconnier, A. & Godfroid, E. (1997). Highly specific and sensitive non-radioactive

- molecular identification of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycol. Res.*, **101** (12): 1499-1507.
- Cooke, D. E. L. & Kennedy, D. M. (1997). Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of ribosomal RNA gene repeat. *Mycol. Res.*, **101** (6): 667-677.
- Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G. & Brasier, C. M. (2000). A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, **30**:17-32.
- Cooke, D. E. L., Jung, T., Williams, N. A., Schubert, R., Bahnweg, G., Obwald, W. & Duncan, J. M. (1999). Molecular evidence supports *Phytophthora quercina* as a distinct species. *Mycol. Res.*, **103** (7): 799-804.
- Cooke, D. E. L., Kennedy, D. M., Guy, D. C., Russel, J., & Duncan, M. J. (1996). Relatedness of Group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA. *Mycol. Res.*, **100** (3): 297-303.
- Cooke, D. E. L., Young, V., Birch, P. R. J., Toth, R., Gourlay, F., Day, J. P., Camegie, F. & Duncan, J. M. (2003). Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995-97). *Plant Pathology*, **52** (2), 181.
- Crandall, S. Bowen (1950). The distribution and significance of the chestnut root rot *Phytophthoras*, *P. cinnamomi* and *P. cambivora*. *Plant Disease Reporter*, **34** (6): 194-196.
- Cullen, D. W., Lees, A. K., Toth, I. K. & Duncan, J. M. (2001). Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and on potato tubers. *European Journal of Plant Pathology*, **107**: 387-398.
- Decreto de Lei n.º 517/99 de 4 de Dezembro. *Diário de República n.º 282/99 – I Série A*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- Dick, M. W. (1995). The Straminipilous Fungi. A New Classification for the Biflagellate Fungi and Their Uniflagellate Relatives with Particular Reference to Lagenidiaceous Fungi. C. A. B. Internat. *Mycol. Pap.*, N° 168.
- Dick, Michael W. (1997). Fungi, flagella and phylogeny. *Mycol. Res.*, **101**: 385-394.
- Dobrowolski, M. P., Tommerup, I. C. & O'Brien, P. A (1998). Microsatellites in the mitochondrial genome of *Phytophthora cinnamomi* failed to provide highly polymorphic markers for population genetics. *FEMS Microbiology Letters*, **163**: 243-248.
- Dolye, J. J. & Dolye, J. L., (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**: 13-15.

- Drenth, A. & Irwin, J. A. G. (2001). Routine DNA based Diagnostic tests for *Phytophthora*. Rural Industries Research & Development Corporation (RIRDC).
- Duncan, J. & Cooke, D. (2002). Identifying, diagnosing and detecting *Phytophthora* by molecular methods. *Mycologist*, **16** (2): 59-66.
- Eckert, J. W., Tsao, P. (1962). A selective antibiotic medium for isolation of *Phytophthora* and *Phythium* from plant roots. *Phytopathology*, **52**: 771-777.
- Elena, K. & Paplomatas (1998). *Phytophthora boehmeriae* boll rot: a new threat to cotton cultivation in the Mediterranean region. *Phytoparasitica*, **26** (1).
- Érsek, T., Schoelz, J. E. & English, J. T. (1994). PCR Amplification of Species-Specific DNA Sequences can Distinguish among *Phytophthora* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, **60** (7): 2616-2621.
- Erwin, C. D. & Ribeiro, K. O. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.
- Fernandes, C. T. (1966). A “Doença da Tinta” dos castanheiros. *Parasitas do género Phytophthora* de Bary. Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Alcobaca.
- Flier, W. G., Grünwald, K. J., Kroon, L. P. N. M., Van Den Bosch, T. B. M., Garay-Serrano, E., Lozoya-Saldaña, H., Bonants, P. J. M. & Turkensteen, L. J. (2002). *Phytophthora ipomoeae* sp. nov., a new homothallic species causing leaf blight on *Ipomoea longipedunculata* in the Toluca Valley of central Mexico. *Mycol. Res.*, **106** (7): 848-856.
- Förster, H., Cummings, M. P. & Coffey, M. D. (2000). Phylogenetic relationships of *Phytophthora* species based on ribosomal ITS1 DNA sequence analysis with emphasis on Waterhouse groups V and VI. *Mycol. Res.*, **104**: 1055-1061.
- Foster, L. M., Katherine R. K., Loftus, M. G., Stevens, J. J. & Ross, I. K. (1993). The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. *Mycol. Res.*, **97** (7): 769-781.
- Fry, William E. (1997). Epidemiology. Plant Pathology Department-Cornell University. APSnet- The American Phytopathological Society: <http://www.apsnet.org/online/feature/lateblit/workshop/papers/lb001>. pp. 1-14.
- Galindo, A. J. & Gallegly, M. E. (1960). The Nature of sexuality in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, **50**: 123-128.
- Gallegly, M. E. (1987). New criteria for classifying *Phytophthora* and critique of existing approaches. In: D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P. H. Tsao (Eds.) *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. APS Press: 167-172.

- Gerlach, K., Bentley, S., Moore, N., Pegg, K. & Aitken, E. (2000). Characterisation of Australian isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubenses* by DNA fingerprinting analyses. *Aust. J. Agric. Res.*, **51**: 945-53.
- Goodwin, P. H., Kirkpatrick, B. C. & Duniway, J. M. (1990). Identification of *Phytophthora citrophthora* with Cloned DNA Probes. *Applied and Environmental Microbiology*, **3** (56): 669-674.
- Goodwin, S. B. (1997). The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology*, **87** (4): 462-471.
- Graaf, P. Van, Lees, A. K., Cullen, D. W. & Duncan, J. M. (2003). Detection and quantification of *Spongospora subterranea* in soil, water and plant tissue samples using real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, **109**: 589-597.
- Grente, J. (1961). La maladie de l'encre du chataignier. I-Étiologie et biologie. *Ann. Epiphyties*, **12** (1): 6-24.
- Grote, D., Olmos, A., Kofoet, A., Tuset, J. J., Bertolini, E. & Cambra, M. (2002). Specific and sensitive detection of *Phytophthora nicotianae* by simple and nested-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, **108**: 197-207.
- Hantula, J., Lilja, A. & Parikka, P. (1997). Genetic variation and host specificity of *Phytophthora cactorum* isolated in Europe. *Mycol. Res.*, **101**: 565-572.
- Hawksworth, D. L., Sutton, B. C. & Ainsworth, G., C. (1983). *Ainsworth & Bibb's Dictionary of the fungi*. Seventh Edition, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey.
- Hemmes, D. E. & Bartnicki-Garcia, S. (1975). Electron microscopy of gametangial interaction and oospore development in *Phytophthora capsici*. *Arch. Microbiol.* **103**: 91-112. In: Erwin, C. D. & Ribeiro, K. O. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.
- Hemmes, D. E. (1987). Cytology of *Phytophthora*. In: D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P. H. Tsao (Eds.) *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. APS Press: 9-40.
- Henson, J. M. & French, R. (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Ver. Phytopatol.*, **31**:81-109.
- Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. A., Díaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte, E. & Garcia-Acha, I. (2000). Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (5):1890-1898.
- Hermosa, M. R., Grondona, I., Díaz-Minguez, J. M., Iturriaga, E. A & Monte, E. (2001). Development of strain-specific SCAR marker for the detection of

- Trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Curr Genet.*, **38**: 343-350.
- Ho, H. H. & Zentmyer, G. A. (1977). Morphology of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycologia*, **69**: 701-713.
- Ho, H. H., Zentmyer, G. A. & Erwin D. C. (1977). Morphology of sex organs of *Phytophthora cambivora*. *Mycologia*, **69**: 641-646.
- Huet, J. C. & Pernollet, J. C. (1989). Amino acid sequence of cinnamomin, a new member of the elicitin family, and its comparison to cryptogein and capsicein. *FEBS Letters*, **257**: 302-306.
- Ippolito, A., Schena, L. & Nigro, F. (2002). Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soils by nested PCR. *European Journal of Plant Pathology*, **108**: 855-868.
- Irwin, J. A G., Cahill, D. M. & Drenth, A. (1995). *Phytophthora* in Australia. *Aust. J. Agric. Res.*, **46**: 1311-1337.
- Judelson, H. S. (2002). Sequence Variation and Genomic Amplification of a Family of Gypsy-like Elements in the Oomycete Genus *Phytophthora*. *Mol. Biol. Evol.*, **19** (8): 1313-1322.
- Jung, T., Cooke, D. E. L., Blaschke, H., Duncan, J. M. & Obwald, W. (1999). *Phytophthora quercina* sp. nov., causing root rot of European oaks. *Mycol. Res.*, **103** (7): 785-798.
- Jung, T., Hansen, E. M., Winton, L., Obwald, W. & Delatour, C. (2002). Three new species of *Phytophthora* from European oak forests. *Mycol. Res.*, **106** (4): 397-411.
- Kellam, M. K. & Zentmyer, G. A. (1986). Comparisons of single-oospore isolates of *Phytophthora* species from naturally infected cocoa pods in Brazil. *Mycologia*, **78**: 351-358.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C. & Stalpers, J. A. (2001). *Dictionary of the Fungi*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon. UK.
- Ko, W. H., Chang, H. S. & Su, H. J. (1978). Isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Taiwan as evidence for an Asian origin of the species. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **71**: 496- 499. In: Tsao, H. P. (1987). Factors affecting isolation and quantification of *Phytophthora* from soil. In: D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P. H. Tsao (Eds.) *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. APS Press: 219-236.
- Ko, Wen-Hsiung (1998). Chemical stimulation of sexual reproduction in *Phytophthora* and *Pythium*. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **39**: 81-86.

- Kreisel (1969). Grundzuge eines natuerlichem.systems der pilze. In: Hawksworth, D.L., Sutton, B. C. & Ainsworth, G. C. (1983). *Ainsworth & Bibb's Dictionary of the fungi*. Seventh Edition. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey.
- Kröber, H., & Marwitz, R. (1993). *Phytophthora tentaculata* sp. nov. and *Phytophthora cinnamomi* var. *parvispora* var. nov. Two new fungi from ornamental plants in Germany. *J. Plant. Dis. Prot.*, **100**: 250-258. In: Erwin, C. D. & Ribeiro, K. O. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.
- Lacourt, I., Bonants, P. J. M., Gent-Pelzer, M. P. V., Cooke, D. E. L., Weerdt, M. H. D., Surplus, L. & Duncan, J. M. (1997). The use of nested primers in the polymerase chain reaction for the detection of *Phytophthora fragariae* and *P. cactorum* in strawberry. *Acta Hort.*, **439** (2): 829-838.
- Lee, S. B. & Taylor, J. W. (1992). Phylogeny of five fungus-like protoctistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol. Biol.*, **9** (4): 636-653
- Lee, Y. A. & Wang, C. C. (2000). The desing of especific primers for the detection of *Ralstonia solanacearum* in soil samples by polymerase chain reaction. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **41**: 121-128.
- Liew, E. C. Y., Maclean, D. J. & Irwin, J. A. G. (1998). Specific PCR based detection of *Phytophthora medicaginis* using the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Mycol. Res.*, **102** (1): 73-80.
- Linde, C., Drenth, A., Kemp G. H. J., Wingfield, M., J., & Von Broembsen, S. L. (1997). Population structure of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. *Phytopathology*, **87**: 822-827.
- Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J. & López, M. M. (2000). Development of a highly sensitive Nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (5): 2071-2078.
- Louws, F. J., Rademaker, J. L. W. & Bruijn, F. J. (1999). The three Ds of PCR-based genomic analysis of Phyto bacteria: diversity, detection and disease diagnosis. *Annu. Ver. Phytopathol.* **37**: 81-125.
- Mahuku, G., Peters, R. D. Platt H. W. & Daayf, F. (2000). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Phytophthora infestans* isolates collected in Canada during 1994 to 1996. *Plant Pathology*, **49**: 252-260.
- Man in't Veld, W. A, Cock, A. W., Ilieva, E. & Lévesque, C. A. (2002). Gene flow analysis of *Phytophthora porri* reveals a new species: *Phytophthora brassicae* sp. nov. *European Journal of Plant Pathology*, **108**: 51-62.
- Marques, C. P. (1988). *Inventariação das Áreas e produções dos Soutos em Trás-os-Montes*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.

- Martin, F. N., James, D. & Lèvesques, C. A. (2003). Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia*, **95** (2): 269-284.
- Martins, L., M., Abreu, C. G. & Marques, C. P. (1997). Evolução do estado sanitário do castanheiro do castanheiro numa área limítrofe à Serra da Nogueira (Trás-os-Montes). IRATI 97, I Congresso Florestal Hispano-Luso, II Congresso Florestal Español, Pamplona.
- Mchau, G. R. & Coffey, M. D. (1994). An integrated study of morphological and isozyme patterns found within a worldwide collection of *Phytophthora citrophthora* and a redescription of the species. *Mycol. Res.*, **98** (11): 1291-1299.
- Miller, S. A., Bhat, R. G. & Schmitthenner, A. F. (1994). Detection of *Phytophthora capsici* in pepper and cucurbit crops in Ohio with two commercial immunoassay kits. *Plant Dis.*, **78**: 1042-1046.
- Moore (1980). Recent advances in microbiology. In: Hawksworth, D. L., Sutton, B. C. & Ainsworth, G., C. (1983). *Ainsworth & Bibys's Dictionary of the fungi*. Seventh Edition. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey.
- Nascimento, M. P. (1997). *Estudo da diversidade genética em populações de trigo barbeta pela técnica de AFLPs*. Tese de Mestrado em Recursos Genéticos e Melhoramento de Espécies Agrícolas e Florestais. UTAD, Vila Real.
- Nechwatal, J., Schlenzig, A., Jung, T., Cooke, D. E. L., Duncan, J. M. & Obwald, W. F. (2001). A combination of baiting and PCR techniques for the detection of *Phytophthora quercina* and *P. citricola* in soil samples from oak stands. *For. Path.*, **31**: 85-97.
- Newhook, F. J., Waterhouse, G. M., Stamps, D. J. (1978). *Tabular key to the species of Phytophthora de Barry*. *Micol. pap.*, nº 143. Commomw. Mycol. Inst. Kew, Surrey, England.
- Newton, G. R. & Graham, A. (1997). *PCR*. Bios Scientific Publishers Limited (2.^a Ed.). Eynsham, Oxon, UK.
- Nolasco, G., Sequeira, Z., Soares, C., Mansinho, A., Bailey, A. M. & Niblett, C. L. (2002). Asymmetric PCR ELISA: increased sensitivity and reduced costs for the detection of plant viruses. *European Journal of Plant Pathology*, **108**: 293-298.
- O'Brien, I. G. (1991). Induced homothallism in *Phytophthora cinnamomi*: A bioassay volatile bioactive compounds. *Phytochemistry*, **30** (11): 3545-3548.
- O'Donnell, K. (1992). Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Curr Genet.*, **22**: 213-220.

- Ota, Y., Intini, M. & Hattori, T. (2000). Genetic characterization of heterothallic and non-heterothallic *Armillaria mellea sensu stricto*. *Mycol. Res.*, **104** (9): 1046-1054.
- Oudemans, P. & Coffey, M. D. (1991). Isozyme comparison within and among worldwide sources of three morphologically distinct species of *Phytophthora*. *Mycol. Res.*, **95**:19-30.
- Panabières, F., Ponchet, M., Allasia, V., Cardin, L. & Ricci, P. (1997). Characterization of border species among Pythiaceae: several *Pythium* isolates produce elicitors, typical proteins from *Phytophthora* spp. *Mycol. Res.*, **101**: 1459-1468.
- Pearson, W. R & Lipman, P. J. (1988). Improved tools for biological sequences analysis. *PNAS*, **85**:2444-2448.
- Portaria n.º 106/96 de 9 de Abril. *Diário de República n.º 84/96 – I série B*. Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas. Lisboa.
- Portaria n.º 1485/2002 de 26 de Novembro. *Diário de República n.º 272/02 – I Série B*. Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas. Lisboa.
- Portaria n.º 29/2003 de 14 de Janeiro. *Diário de República n.º 11/03 – I Série B*. Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas. Lisboa.
- Poussier, S., Chéron, J. J., Couteau, A. & Luisetti, J. (2002). Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. *Journal of Microbiological Methods*, **51**(3): 349-359.
- Punja, Z. K., Förster, H., Cunningham, I., & Coffey, M. D. (1998). Genotypes of the late blight pathogen (*Phytophthora infestans*) in British Columbia and other regions of Canada during 1993-1997. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **20**: 274-282.
- Purwantara, A., Drenth, A., Flett, S. P., Guppy, W. & Keane, P. J. (2001). Diversity of *Phytophthora clandestina* isolated from subterranean clover in southern Australia: analysis of virulence and RAPD profiles. *European Journal of Plant Pathology*, **107**: 305-311.
- Reilly, C. C., Hotchkiss, M. W. & Hendrix, F. F. (1998). Phytophthora Shunk and Kernel Rot, a new disease of pecan caused by *Phytophthora cactorum*. *Plant Diseases*, **82**: 234-349.
- Ricci, P. (1997). Induction of the hypersensitive response and systemic acquired resistance by fungal proteins: the case of elicitors. In: *Plant-Microbe Interactions*, vol. 3, (ed. G. Stacey & N. T. Keen). Chapman and Hall. New York.
- Riethmüller, A., Voglmayr, H., Göker, M., Weib, M. & Oberwinkler, F. (2002). Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related

- groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, **94** (5): 834-849.
- Ristano, J. B., Madritch, M., Trout, C. L. & Parra, G. (1998). PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant Pathogen genus *Phytophthora*. *Applied and Environmental Microbiology*, **64** (3): 948-954.
- Roose-Amsaleg, C. L., Garnier-Sillam, E. & Harry, M. (2001). Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil ecology*, **18**: 47-60.
- Saiki, R. K. Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Sambrook, J., Frisch & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. J. Sambrook (Ed). Cold Spring Harbour. New York.
- Samuels, G. J. & Seifert, K. A. (1995). The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **33**: 37-67.
- Sanchez Hernandez, E., Muñoz Garcia, Brasier, M., Trapero Casas, A. (2000). Identity and pathogenicity of two *Phytophthora* taxa associated with a new root disease of olive trees. *Plant. Dis.*, **85**: 411- 416.
- Schena, L., Nigro, F. & Ippolito, A. (2002). Identification and detection of *Rosellinia necatrix* by conventional and real-time Scorpion-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, **108**: 355-366.
- Schubert, R., Bahnweg, G., Nechwatal, J., Jung, T., Cooke. D. E. L., Duncan, J. M., Müller-Starck, G., Langebartels, C., Sandermann Jr, H. & Obwald, W. (1999). Detection and quantification of *Phytophthora* species wich are associated with root-rot diseases in European deciduous forests by species-specific polymerase chain reaction. *Eur. J. For. Path.*, **29**: 169-188.
- Shew, H. H. (1985). Response of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianea* to metalaxil exposure. *Plant Dis.*, **69**: 559-562.
- Sogin, M. L. & Silberman, J. D. (1998). Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *International Journal of Parasitology*, **28** (1): 11-20.
- Stammler, G., Seemüller, E. & Duncan, J. M. (1993). Taxonomic characterisation of *Phytophthora fragariae* and *P. fragariae* var. *rubi* by DNA hybridization and restriction fragment length polymorohism analysis. *Mycol. Res.*, **97**:150-156.
- Stamps, D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J., Hall, G. S. (1990). *Revised Tabular Key to the species of Phytophthora*. *Micological pap.* 162. C.A.B. International, Mycological Institute.

- Themann, K., Werres, S., Lüttmann, R. & Diener, H. A (2002). Observations of *Phytophthora* spp. in water recirculation systems in commercial hardy ornamental nursery stock. *European Journal of Plant Pathology*, **108**: 337-343.
- Tsao, H. P. (1987). Factors affecting isolation and quantification of *Phytophthora* from soil. In: D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P. H. Tsao (Eds.) *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. APS Press: 219-236.
- Tsao, H. P. (1990). Why many *Phytophthora* root rots and crown roots of tree and horticultural crops remain undetected. *Bulletin OEPP/EPPO*, **20**: 11-17.
- Tsao, H. P. & Guy, O. S. (1977). Inhibition of *Mortierella* and *Pythium* in a *Phytophthora* - isolation medium containing hymexazol. *Phytopathology*, **50**: 717-801.
- Tsao, H. P. & Ocana, G. (1969). Selective isolation of species of *Phytophthora* from natural soils on an improved antibiotic medium. *Nature*, **233**: 636-638.
- Vettraino, A. M., Natili, G., Anselmi, N. & Vanini, A. (2001) Recovery and pathogenicity of *Phytophthora* species associated with a resurgence of ink disease in *Castanea sativa* in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, **50**: 90 - 96.
- Waterhouse, G. M. (1963). *Key to the species of Phytophthora de Barry*. Mycol. pap. 92. Commonw. Mycol. Inst., Kew, Surrey, England.
- Waterhouse, G. M., Newhook, F. J. & Stamps, D. J. (1987). Present criteria for classification of *Phytophthora*. In: D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P. H. Tsao (Eds.) *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. APS Press: 139-147.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Ed. By Innis, M. A. M., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J.. Academic Press. San Diego.
- Winton, L. M. & Hansen, E. M. (2001). Molecular diagnosis of *Phytophthora lateralis* in trees, water, and foliage baits using multiplex polymerase chain reaction. *For. Path.*, **31**: 275-283.
- Zentmyer, G. A. (1980). *Phytophthora cinnamomi and Diseases it causes*. Monograph n° 10. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota, USA.
- Zentmyer, G. A. (1987). The World of *Phytophthora*. In: D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P. H. Tsao (Eds.) *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. APS Press: 167-172.

- Zhang, G. X., Zheng, S. G., Han, Y. H., Han, W., Shi, K. C. & Chang, J. C. (2001). RAPD PCR for diagnosis of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology*, **149**: 569-574.
- Zijlstra, C. (2000). Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. *European Journal of Plant Pathology*, **106**: 283- 290.